UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École doctorale 414 : Sciences de la Vie et de la Santé
UMR 1131 SVQV Santé de la Vigne et Qualité du Vin
Institut National de la Recherche Agronomique-Université de Strasbourg

Thèse présentée par
Maud COMBIER
Soutenue le 24 Janvier 2019 au 28 rue de Herrlisheim, Colmar

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Étude des effecteurs de type RXLR de *Plasmopara viticola* pour la recherche de résistances durables au mildiou de la vigne

Thèse dirigée par :
Dr. MESTRE Pere, Chargé de Recherche, INRA (Colmar)

Rapporteurs :
Dr DECROOCQ Véronique, Directeur de Recherche, INRA (Bordeaux)
Dr DUPLESSIS Sébastien, Directeur de Recherche, INRA (Nancy)

Examinateurs :
Pr BAILLIEUL Fabienne, Professeur des Universités, Université de Reims Champagne-Ardenne
Dr ZIEGLER-GRAFF Véronique, Directeur de Recherche, CNRS (Strasbourg)

À ma mère,

À mon grand-père,

passionné d'oenologie

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Decroocq et M. Duplessis d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. J'adresse également mes remerciements à Mme Baillieul et Mme Ziegler-Graff pour leur participation à mon jury de thèse en tant qu'examinateurs. Merci à vous d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie également très sincèrement mon encadrant Pere d'avoir accepté de me confier ce projet en 2015. Tu as été un encadrant très humain, qui m'a laissé la liberté dont j'avais besoin tout en tirant les sirènes d'alarme au niveau des *dead lines* et des priorités. Je pense qu'il va me falloir quelques mois encore pour prendre réellement conscience de tout ce que m'ont apporté cette thèse et ton enseignement. Un grand merci pour ton soutient infaillible dans cette dure épreuve que fut la rédaction …

Un grand merci à Marie-Christine, tu as su rajouter beaucoup d'humain dans ces longues journées de manip à découper des disques dans de toutes petites feuilles de vigne. Tu n'as jamais hésité à proposer ton aide. Sans toi, je me serais écroulée devant tous les repiquages. Tu as même accepté que j'en double le nombre !!! Ton absence sur cette dernière année fut difficile personnellement et je suis profondément heureuse de ton retour aussi rayonnante. Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et ta joulie famille !!! Je te laisse tout plein de graines d'*A.thaliana* pour que tu ne m'oublies pas … désolée !

Je remercie les membres de mes comités de thèse, Philippe Hugueney, Isabelle Fudal et Julie Chong. Merci pour vos conseils précieux au cours de ces trois années et pour votre disponibilité.

Je remercie Sebastien Schornack d'avoir accepté la collaboration, vos conseils furent salutaires. Encore merci Edouard, tu es d'un soutien sans faille depuis mon stage de M2 où tu m'avais laissé m'exercer sur mon premier effecteur, PSE2. Ton aide a été merveilleuse pour ma thèse, les VIGS, les immuno et les corrections ! Toujours positif et entrainant (même pour les bêtises au permanganate de potassium qui auront couté la vie à un mortier (RIP), je me doutais bien que tu n'avais pas pu louper cette jolie flamme rose).

Je remercie EMBO d'avoir financé mon séjour au Danemark. Je remercie Simona Radutoiu et les membres de son équipe pour m'avoir accueillie, j'ai pu avoir la chance de connaitre la recherche dans une équipe internationale et motivée. Merci Jean-Baptiste pour ton aide et ton accueil, malgré ton accident, tu as su trouver quelques moments pour partager ton savoir. Merci à vous, Christel, Manoj, Tank et Alexandra d'avoir rendu cette expatriation dans le froid nordique moins difficile, je ne pourrais jamais oublier ! Merci Effectome d'avoir rendu cette rencontre possible.

Je remercie l'IBMP, Richard Wagner pour votre aide pour la génération des mutants *A. thaliana* (qui hélas n'ont pas pu être valorisés dans ce manuscrit) et Jérôme Mutterer pour votre expertise en microscopie confocale.

Merci à Aline et Gwendal, vous avez été tous deux très motivés, toujours prêt à vous dépasser et d'un grand sérieux. Je vous souhaite une bonne continuation pour vos études et votre future vie professionnelle, quelle qu'elle soit tant que vous êtes bien ! Encore félicitations pour vos très belles soutenances, ce fut un réel plaisir de vous encadrer.

Merci également à tous les membres de l'INRA de Colmar et de l'UHA pour vos aides petites ou grandes, vos dépannages, vos prêts, vos conseils, votre soutien, vos sourires et votre bonne humeur. Merci à Raymonde d'avoir trouvé du temps entre les carottes et les vignes. Merci aux serristes d'avoir été présents pour ma gloutonnerie en Bentha et en vigne. Merci à Gisèle et à l'équipe VIVE d'avoir valorisé mes illustrations pour Pint of Science et la Fête de la Science. Merci aux membres de l'équipe de m'avoir accueillie moi et mes manips en tout genre.

Merci à Murielle Viaud, Eric Galiana, Olivier, Carine et Éloïse d'avoir pris le temps de m'envoyer vos agents pathogènes et de répondre à toutes mes questions concernant leur confort.

Je remercie la Tribu Entre-Colle-à-Rien qui a rendu la vie en Alsace, loin des miens, pleine de vie, de rando et de raclette !

Un gros merci à Morgane d'avoir été là quasiment tous les jours pour m'entendre râler et déblatérer sur les manips, la politique, les galères de vélo, l'écologie, les manifs, la vie zéro-déchet, le froid (oui ça meule ici !), le chaud, la pluie, les jeux, les clopes, le café, les repas végétariens, la récup, les Molkys, … Merci pour avoir essayé de m'expliquer les principes de la sélection, d'avoir pris le temps de relire tous mes documents/mail officiels, de m'avoir suivie à 200% dans l'organisation des soirées rencontre entre non-permanents et des soirées Jeux INRA. Une joie qu'on finisse ensemble cette aventure Colmarienne en janvier, je n'ose pas imaginer si tu étais partie avant moi

Un grand merci à mes collègues de bureau, Jean-Michel et Flo. Héhé merci Jim de m'avoir accueillie dans ce mini bureau il y a trois ans ! Votre sincérité, votre humour, vos dépannages et votre patience ont été des bouffées d'air frais quotidiennes. Je ne le dirais pas tout haut, il ne faut pas exagérer, mais vous allez me manquer !

Merci aux voisins, le fameux bureau des thésards (mais pas que) Isa, Lise, Thuy-Thanh, Lorène, Mickael, Antoine, Myriam et Claire, plus loin aux extrêmes : Guillaume, Noémie, Amandine, Sophie, Camille et Manue, et encore plus, perdue au loin, Rehana. Big up à tous ceux qui m'ont soutenue depuis que je suis arrivée et courage Thuy-thanh pour la fin, profite bien de ton séjour en Allemagne. Trop de choses à dire évidement, merci pour vos coups de pouces, les pauses clopes, vos papotages aux repas, vos conseils, les

ralages, vos gâteaux, tout tout tout ! Merci Lise pour ta poisse contagieuse ;) et pour Lara-LaVominette, elle fut un réel soutien dans ces temps difficiles. Merci Isa pour ta motivation absolue, ta force est entrainante.

Merci aux filles d'en face, Éloïse, Marine et Elodie, d'avoir aussi souvent traversé la route qui nous sépare et de m'avoir inclus dans vos papoteries de filles =). Merci Éloïse, sœur de thèse, je te donne tout mon courage pour la fin qui approche… Nos mercredis à chouchouter Hyalo tout en papotant me manquent, ça fait déjà un bout.

Nos soirées et nos aventures dans les montagnes vosgiennes vont me manquer (larmes, snif, re-larmes et re-snif).

Je remercie également le label EIRA de m'avoir sélectionnée. En plus de vos semaines de séminaires et de votre financement pour partir au Danemark, vous m'avez permis de rencontrer d'autres thésards toutes filières confondues, des personnes merveilleuses. Je tiens à remercier Agathe pour ton amitié et ton aide. Je tiens à remercier la team *Auriculus S :* Gabi la Sirène, Norman le Poète, Stefoune la Joie, Alice d'Amour, Nathan l'Abyssal, Juan le Couillu ; votre compagnie en ligne et IRL était extra … ensemble dans la même galère, ce même néant distordu. Aujourd'hui on en vient enfin à bout chacun notre tour, pour pouvoir se retrouver bientôt !!

Je remercie aussi tous mes anciens collègues de l'INRA de Dijon. Malgré la distance vous avez toujours été d'un grand soutien et de bons conseils <3. Merci David de m'y avoir accueillie et de m'avoir laissé cette liberté formatrice pour la thèse. Merci Agnès, Ian, Lisou, Yukoko, Damien, Popo, Alice, Jerem', Olive, Hoai-Nam, Sylvain, Jéjé, Léo, Charline, Céline, Nicolas, Flo, Anto, Nassima, Hebert, Zerbib, Luiz, Anto, et tous les autres, vous êtes trop nombreux ! Notre aventure, cette page de ma vie, me manque terriblement. Merci Sylvain de t'être occupé de toute la paperasse concernant le brevet durant ces trois ans de thèse. Merci Hoai-Nam et Yuko pour l'INR-ART. Merci le Rézo pour l'expo et toutes vos actions.

Je remercie mon père de m'avoir laissé feuilleter ses *La Recherche* avant même de savoir lire et d'être si fière. Je remercie également ma marraine et sa tribu, d'avoir été patients pour mon absence si longue. Je remercie Lily, Éric, Alicia, Tristan et Valoch pour votre soutien et vos retours à la réalité au cours de quelques WE. Je remercie Jessica, Kevin et Bruno, pour votre soutien, votre aide administrativo-relou-notarienne. Vous vous êtes accrochés vaillamment dans ces temps très difficiles. Finalement petite sœur, c'est amusant, nous soutenons quasiment en même temps. Je suis fière de toi, papa aussi et maman l'aurait été encore plus <3. 2019, l'année des Combier !

Je remercie mon doudou, merci d'avoir accepté mon départ en Alsace, merci de construire un petit nid douillet en Ardèche avec tout plein de super coupins pendant ce temps-là. Merci aussi de l'avoir quitté quelques temps, pour vernir me soutenir sur Colmar et me rendre la vie plus facile. <3

Un grand merci à tous ceux qui ont aidé à la relecture de ce manuscrit, d'avoir essayé de débusquer les fautes dans les moindres recoins !! (Et un presque-merci à la fille en trottinette, qui a permis de rendre Marion super disponible). Oui, il restera toujours des fautes … sinon ce ne serait pas vraiment mon manuscrit de thèse.

Le Pr Éric Karsenti décrit la méthode scientifique comme « un mélange de hasard, d'intuition et de rationalité ». Je n'aurais pas forcement eu ces trois ingrédients avec moi tout au long de ma thèse, mais ne dit-on pas que les échecs sont sources d'apprentissage ?

Abréviations

°C : Celsius

ABA : acide abscissique

ADN ou **DNA** : acide désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

ADNt : ADN de transfert

AOX1 : Alcohol oxidase 1

ARN ou **RNA** : acide ribonucléique

ARNi : interférence par l'ARN

ARNsi : petits ARN interferents (*small interfering RNA*)

Avr : facteur ou gène d'avirulence

BAX : Bcl-2–associated X

BFA : Brefeldin A

cDNA ou **ADNc** : ADN complémentaire

cfu : Colony-forming unit

cm : centimètre

Co-IP : Co-immunoprécipitation

CTPS : Comité Technique Permanent de la Sélection

DAB : 3,3'-diaminobenzidine

dNTP : désoxyribonucléide triphosphate

EHM : Extra Haustorial Matrix

EMBO : Organisation européenne de biologie moléculaire (*European Molecular Biology Organization*)

ETI : Immunité déclenché par les effecteurs (Effector-Triggered Immunity)

F : Farad

g : gramme

GA : acide gibbérellique

GEVES : Groupe d'Étude et de contrôle des Variétés Et des Semences

GFP : green fluorescent protein

GUS : β-glucuronidase

h : heure

HMM : modèle de Markov cache (*hidden Markov model)*

hpa : heure post agroinfiltration

hpi : heure post inoculation

HR : réponse hypersensible (*Hypersensitive response*)

HSP : heat shock protein

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

JA : acide jasmonique

jpa : jours post agroinfiltration

jpi : jours post inoculation

K : Kilo

Kb : Kilobase

KDa : Kilo Dalton

L : litre

LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid chromatography-mass spectrometry)*

LRR : répetition riche en Leucine (Leucine Rich Repeat)

M : Mole par litre

Min : minute

MS : spectrométrie de masse (*mass spectrometry)*

ARNmi : micro ARN

mol : mole

nm : nanomètre

nt : nucléotide(s)

N-ter ou **C-ter** : extrémité amino (NH2) ou carboxi (COOH) terminal

OIV : Organisation mondiale de la Vigne et du Vin

ORF : cadre ouvert de lecture (*Open Reading Frame*)

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PCD ou **MCD** : mort cellulaire programmée (*Programmed Cell Death)*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PM : Poids moléculaire

PPV : Plum pox virus

PR : Pathogenesis-Related protein

PTI : Immunité déclenché par les PAMP (*Pattern-Triggered Immunity*)

PVX : Potato virus X

PVY : Potato virus Y

QTL : locus de caractères quantitatifs (*quantitative trait loci*)

RBOHD : Respiratory burst oxidase homolog protein D

PRR : Motif riche en prolines (*proline rich region*)

R : facteur de résistance

RE : réticulum endoplasmique

RFP : Red fluorescent protein

RISC : RNA-induced silencing complex

RNAse : ribonuclease

RNA-seq : RNA-Sequencing

ROS : espèces reactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)

Rpm : tour par minute (*rotation per minute*)

Rpv : gene de resistance à Plasmopara viticola (Resistance to Plasmopara viticola)

RT : transcription inverse (*reverse transcription*)

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

SA : acide salicylique

SAM : sélection assistée par marqueurs

SC : souche Colmar

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SLIC : Sequence-and Ligation-Independent Cloning

Spp : species pluralis

Subsp : sous-espèce

TMV : Tabacco mosaic virus

TGN : réseau des trans-Golgi

UE : Union Européenne

UTR : région non traduite (*untranslated region*)

UPR : Unfolded Protein Response

UV : Ultra-Violet

V :Volt

VATE : Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale

Vol : volume

W : Watt

Ω : Ohm

Table des figures et tableaux

Contexte bibliographique

Figure 1 : Arbre phylogénétique simplifié des Vitacées.
Figure 2 : Cycle biologique de la vigne.
Figure 3 : Origine de la vigne et de la viticulture.
Figure 4 : Importance de la production viti-vinicole en France.
Tableau 1 : Listes des bioagresseurs de la vigne les plus fréquemment rencontrés.
Figure 5 : Cycle de développement de *P. viticola* sur la vigne avec une phase sexuée et une asexuée.
Figure 6 : Étapes du cyle asexué de *Plasmopara viticola* dans une feuille de vigne.
Figure 7 : Cycles de contamination de la vigne par *P. viticola* et diversité des symptômes occasionnés sur les organes végétatifs.
Figure 8 : Déroulement de la colonisation intercellulaire de *P. viticola* sur *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau.
Tableau 2 : Les 10 premières substances actives contre le mildiou utilisées en France.
Figure 9 : Moyenne des traitements par parcelle en 2010 toutes maladies confondues.
Figure 10 : Pression parasitaire du mildiou ressentie en 2010.
Figure 11 : Nombre de traitements selon la période de l'année 2010.
Figure 12 : Évolution de la proportion de résistance au fongicide de type CAA.
Figure 13 : Modèle simplifié de la comparaison des formes de résistance monogénique et polygénique.
Figure 14 : Comparaison de l'évolution de l'utilisation de tournesol disposant de gènes de résistance *Pl* en France avec le nombre de races virulentes de *Plasmopara halstedii* sur ces gènes entre 1977 et 2004.
Tableau 3 : Facteurs de résistance au mildiou de la vigne identifiés.
Figure 15 : L'isolat Lednice contourne la résistance conférée par le gène *Rpv3* de Bianca.
Figure 16 : Introgression de résistance par rétrocroisements successifs6
Figure 17 : Diversité structurelle des récepteurs PRR.
Figure 18 : Représentation schématique de la mise en place de la PTI.
Figure 19 : Sécrétion des effecteurs dans l'apoplasme et le cytoplasme de la cellule hôte infectée
Figure 20 : Structure protéique des effecteurs cytoplasmiques de type RXLR et CRN.
Figure 21 : Structure des différents récepteurs NLR
Figure 22 : Activation d'un récepteur NLR par un effecteur
Figure 23 : Activation d'un récepteur NLR par un effecteur *via* le modèle de garde ou de leurre.
Figure 24 : Représentation de la succession d'évènements intervenant dans l'interaction moléculaire entre la plante et l'oomycète.
Figure 25 : Le modèle en zigzag illustre le rendement quantitatif du système immunitaire de la plante.
Figure 26 : Identification de couples de gènes *R/Avr*
Figure 27 : Critères d'identification des effecteurs RXLR putatifs de P. viticola
Figure 28 : Critères de séléction des effecteurs RXLR candidats.

Chapitre 1 : Recherche de gènes de résistance au mildiou de la vigne

Tableau 4 : Liste des effecteurs RXLR candidats sélectionnés pour le crible.
Figure 29 : Procédure utilisée pour identifier des vignes qui possèdent un gène de résistance
Tableau 5 : Liste des hybrides utilisés pour le crible.
Tableau 6 : Liste des lignées de vigne utilisées pour le crible.
Figure 30 : Variabilité de la production d'anthocyanine des disques de vigne qui exprime *VvMyba1*.
Figure 31 : L'agroinfiltration de disques foliaires de vigne induit des nécroses à la surface de l'épiderme.
Figure 32 : Suivi de l'expression du gène marqueur de la HR, VvHSR, sur des disques de vigne exprimant les effecteurs candidats Pv70.2 et Pv47.
Figure 33 : Co-expression de *Rpv1* et des effecteurs RXLR de *P. viticola* chez *N. benthamiana.*
Figure 34 : Schéma de la construction de Ppiczα-GFP
Figure 35 : Schéma de la recombinaison de la construction dans la séquence d'AOX1 présente dans le génome de *P. pastoris.*
Figure 36 : Vérification de la production de GFP par *P. pastoris* transformé.
Figure 37 : Infiltration d'une protéine GFP chez *N. benthamiana* produite chez *P. pastoris.*
Figure 38 : Infiltration d'une protéine RXLR-GFP chez *N. benthamiana* produite chez *P. pastoris.*
Figure 39 : Le milieu WM8 est responsable de l'apparition de symptômes nécrotiques sur *V. vinifera* cv. Syrah.

Chapitre 2 : Caractérisation fonctionnelle d'effecteurs RXLR candidats

Figure 40 : Évaluation de l'effet des effecteurs RXLR de *P. viticola* sur *N. benthamiana* et *N. tabacum*
Figure 41 : Évaluation de la capacité de suppression de la HR de Inf1 par les effecteurs RXLR candidats de *P. viticola.*
Figure 42 : Vérification du succès de l'agroiniltration de GFP après Pv44
Figure 43 : Pv44 induit des lésions sur *N. benthamiana* et la production de phytoalexines.
Figure 44 : Localisation de Pv44 dans le cytoplasme et les noyaux de *N. benthamiana*.
Figure 45 : Processus expérimental utilisé pour les tests phytopathologiques.
Figure 46 : Échelle de sporulation et contrôle utilisé dans les tests phytopathologiques sur disques de vigne transformés.
Figure 47 : L'expression transitoire de Pv44 ne semble pas perturber l'infection de *P. viticola*.
Figure 48 : Pv44 ne contribue pas à l'infection de *P. parasitica*.
Figure 49 : Évaluation de la sensibilité de *N. benthamiana* à *Botrytis cinerea* après expression de Pv44.
Figure 50 : L'expression de 44Δsp n'interfère pas avec l'infection de PVX.

Chapitre 3 : Identification d'une famille d'effecteur candidats chez *P. viticola* et analyse fonctionnelle de l'effecteur Pv33

Figure 51 : Procédure pour identifier les interactants de Pv33.
Figure 52 : Identification des interactants candidats de Pv33.
Figure 53 : Pv33 localise au nucléole et aux foyers nucléaires.
Figure 54 : Localisation de Pv33 avec son peptide de sécrétion dans *N. benthamiana.*

Figure 55 : L'inhibition de l'expression de *SUVH1* n'empêche pas la mort cellulaire liée à Pv33 ni sa localisation nucléaire.
Figure 56 : Localisation cellulaire et symptômes des différentes constructions de Pv33 sur *N. benthamiana*.

Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la protéine Pv47, appartenant à la famille WY-*domain* de *P. viticola*

Figure 57 : Expression de l'effecteur candidat Pv47 sur *V. vinifera* cv. Syrah.
Figure 58 : Expression de Pv47 sur *Nicotiana spp*.
Figure 59 : L'agroinfiltration de Pv47 amène des symptômes très variables sur *N. benthamiana*.
Figure 60 : La présence de Pv47 induit une production de ROS sur *N. benthamiana*.
Figure 61 : La présence de Pv47 induit un dépôt de callose sur *N. benthamiana*.
Figure 62 : Évaluation de l'effet de Pv47 sur la mort cellulaire.
Tableau 7 : Cibles recherchées par analyse métabolomique.
Tableau 8 : Ions détectés par l'analyse non ciblée en mode positif : données obtenues pour les ions qui ont un fold supérieur à 2.
Figure 63 : Détection du tryptophane après expression transitoire de Pv47 chez *N. benthamiana.*
Figure 64 : Localisation de Pv47 dans les cellules de *N. benthamiana*.
Figure 65 : Confirmation de la localisation de Pv47 au RE.
Figure 66 : Pv47 perturbe la structure du RE.
Figure 67 : Procédure pour identifier les interactants de Pv47.
Figure 68 : Recherche des interactants de Pv47.
Figure 69 : L'expression transitoire de Pv47 ne semble pas perturber l'infection de *P. viticola*.
Figure 70 : Pv47 réduit l'infection de *P. parasitica*.
Figure 71 : L'expression de 47Δsp inhibe l'infection de PVX inoculé par agroinfiltration.
Figure 72 : L'expression de 47Δsp n'inhibe pas l'infection de PVX inoculé mécaniquement.
Figure 73 : Pv47 augmente les symptômes induits par *P. syringae* DC3000.
Figure 74 : Évaluation de la sensibilité à *Botrytis cinerea* de *N. benthamiana* après expression de Pv47 sur deux périodes différentes.
Figure 75 : Identification de la nature du phénotype de macération.
Figure 76 : Évaluation de la sensibilité à *Botrytis cinerea bot2Δ* et *boa6Δ* après expression de Pv47.
Figure 77 : Recherche de séquences protéiques similaires à Pv47 dans le protéome de trois oomycètes proches.
Figure 78 : Détection du tryptophane mesuré dans les extraits de feuilles de vigne «Bianca» infectées par du mildiou ou non infectées à 72 h

Conclusions Perspectives

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus pour Pv33, Pv44 et Pv47 sur *N. benthamiana* et transposés sur *Vitis vinfiera cv. Syrah.*

Table des matières

Remerciements 4
Abréviations 8
Table des figures et tableaux 12

Contexte Bibliographique 18
1. La vigne et le mildiou 19
1.1 La vigne : une liane originaire du Caucase avec de nombreux enjeux économiques aujourd'hui 19
1.2 Le mildiou de la vigne 23
1.3 Protection de la vigne contre le mildiou 26
2. La résistance des plantes aux maladies 32
2.1 L'utilisation de plantes résistantes en agriculture 32
2.2 Résistance durable 33
2.3 La résistance au mildiou chez la vigne 39
3. Le dialogue entre les gènes de résistance et les effecteurs 45
3.1 Perception de l'agent pathogène et réponses végétales 45
3.2 Contre-attaques : les effecteurs 48
3.3 (Contre)-contre-attaque des effecteurs par la plante 52
3.4 Effectoromique : combattre l'ennemi avec ses propres armes 54

Objectifs 57
1. Identification de gènes de résistance qui reconnaissent des effecteurs conservés de *P. viticola* 58
2. Compréhension du rôle des effecteurs RXLR dans la stratégie d'infection de *P. viticola*. 59

Chapitre 1 : Recherche d'effecteurs de *P. viticola* reconnus par les vignes résistantes 61
1. Stratégie de recherche de résistances durables 62
1.1 Sélection d'effecteurs RXLR candidats de *P. viticola* 62
1.2 Choix de la technique de transformation chez la vigne 64
1.3 Plan d'expérimentation 64
2. . Résultats 66
2.1 Recherche de résistances durables par agroinfiltration d'effecteurs essentiels chez la vigne 66
2.2 Approches alternatives pour l'identification de gènes Avr et de résistances durables 68
3. Discussion 72
4. Conclusion 76

Chapitre 2 : Caractérisation fonctionnelle d'effecteurs RXLR candidats 78

1. Étude fonctionnelle des effecteurs RXLR de *P. viticola* 79

1.1 Criblage des effecteurs RXLR sur *N. benthamiana* 79

1.2 Analyse fonctionnelle de l'effecteur Pv44 de *P. viticola*. 80

2. Discussion 84

3. Conclusion 87

Chapitre 3 : Identification d'une famille d'effecteur candidats chez *P. viticola* et analyse fonctionnelle de l'effecteur Pv33 88

1. Article : A secreted WY-domain-containing protein from the oomycete *Plasmopara viticola* induces cell death in different plant species. 89

2. Suite de l'analyse fonctionnelle de la protéine Pv33, appartenant à la famille WY-*domain* de *P. viticola* 123

2.1 Résultats 123

2.2 Discussion 126

2.3 Conclusion 134

Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la protéine Pv47, appartenant à la famille WY-*domain* de *P. viticola* 135

1. Résultats 136

1.1 Pv47 induit des réactions de défense chez les Nicotianeae. 136

1.2 Test de suppression de mort cellulaire par Pv47 chez *N. benthamiana* 137

1.3 Analyse métabolomique de l'effet de Pv47 sur *N. benthamiana* 138

1.4 Étude de la localisation cellulaire et recherche des cibles de Pv47 140

1.5 Étude de l'effet de l'expression de Pv47 sur les défenses de la plante. 142

2. Discussion 147

3. Conclusion 156

Conclusions et Perspectives 158

Matériels et Méthodes 164

1. Matériel végétal 165

2. Matériels microbiens 165

3. Extraction d'ADN et ARN 166

4. Clonage d'effecteurs et transformation de *A. tumefaciens* 166

5. Expression transitoire par agroinfiltration 167

6. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) 167

7. Clonage SLIC, transformation de levures et infiltration de protéines purifiées 168

8. Imagerie 169

9. Essais phytopathologiques 169

10. Analyses métabolomiques 170
11. Coloration histochimique 171
12. Immunoprécipitation 171
Références 173

Contexte Bibliographique

1. La vigne et le mildiou

1.1 La vigne : une liane originaire du Caucase avec de nombreux enjeux économiques aujourd'hui

1.1.1 Classification et biologie de la vigne

La vigne est une liane qui se retrouve dans les climats tempérés et intertropicaux d'Europe, d'Asie centrale ou encore d'Amérique. Elle appartient à la famille des *Vitaceae*, qui comprend dix-sept genres et regroupe plus d'un millier d'espèces **(The Plant List, 2013).** Le genre *Vitis* et *Muscadinia* rassemble l'ensemble des espèces utilisées en viticulture, soit pour la production de raisins, soit comme géniteurs de nouvelles variétés ou de porte-greffes. La position de *Muscadinia* dans la classification a longtemps été discutée. En effet, une première classification par le Pr Jules Emile Planchon en 1887 a placé *Muscadinia* comme un sous-genre de *Vitis*. Plus tard, en 1913, le Dr John Kunkel Small s'est basé sur des critères morphologiques pour séparer *Vitis* et *Muscadinia* en deux groupes distincts **(Figure 1)** **(Small and Rydberg, 1913)**. Aujourd'hui encore, des critères basés sur leur interfertilité valident l'appartenance au genre *Vitis,* pendant que la différence du nombre de chromosomes (19 pour *Vitis* et 20 pour *Muscadinia*) et des critères morphologiques soutiennent l'existence du genre *Muscadinia*.

Le genre *Vitis* regroupe près de 80 espèces différentes **(The Plant List (2013))**. Parmi elles, l'unique espèce euro-asiatique, *Vitis vinifera* L. (la « vigne donnant du vin ») regroupe la majorité des vignes cultivées : environ 6500 cultivars, aussi appelés cépages par le vigneron et variétés par les botanistes.

La vigne est une plante pérenne dont la longévité peut atteindre un siècle, mais à l'état sauvage, son âge est très proche de celui de l'arbre qui la porte. Chaque année, elle effectue deux cycles simultanés, un cycle végétatif et un cycle reproducteur, suivis d'une période de repos au cours de l'hiver **(Figure 2)**. Chez la vigne cultivée la fin de la période de repos est marquée par les pleurs au niveau des plaies de taille (février à mars), qui indiquent le redémarrage du système racinaire et circulatoire de vigne.

Cycle végétatif : Ce cycle commence par le débourrement des bourgeons dormants (avril). Leurs écailles s'ouvrent et laissent apparaitre la bourre, puis les jeunes feuilles, les fleurs et les rameaux. C'est un stade très sensible aux gelées printanières. La croissance des rameaux continue jusqu'au mois d'août, quand a lieu une phase de mise en réserve et de lignification nommée aoûtement. La fin du cycle végétatif s'illustre par la chute des feuilles au mois d'octobre.

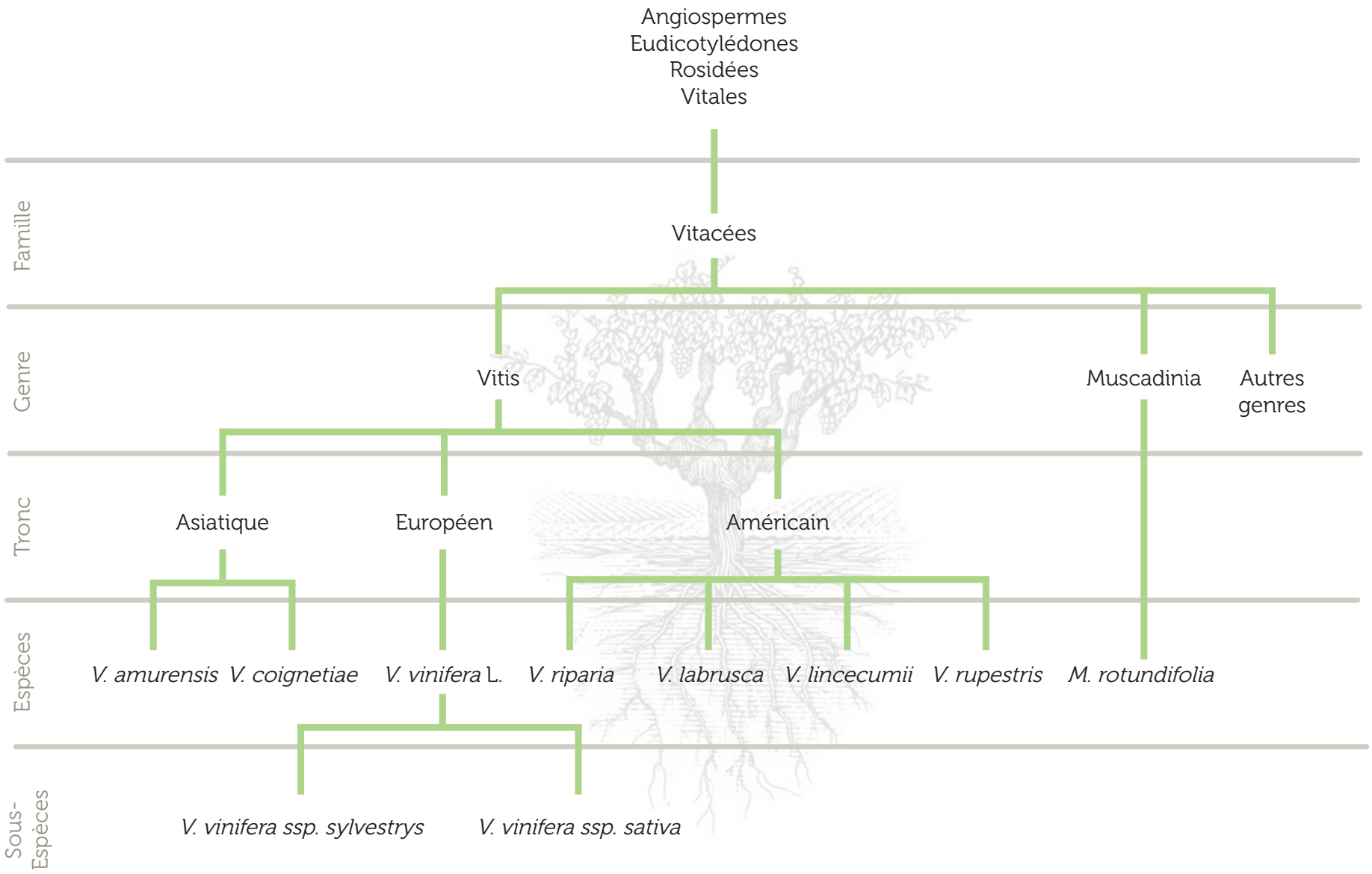


Figure 1 : Arbre phylogénétique symplifié des Vitacées. Seulement quelques espèces sont montrées à titre d'exemples.

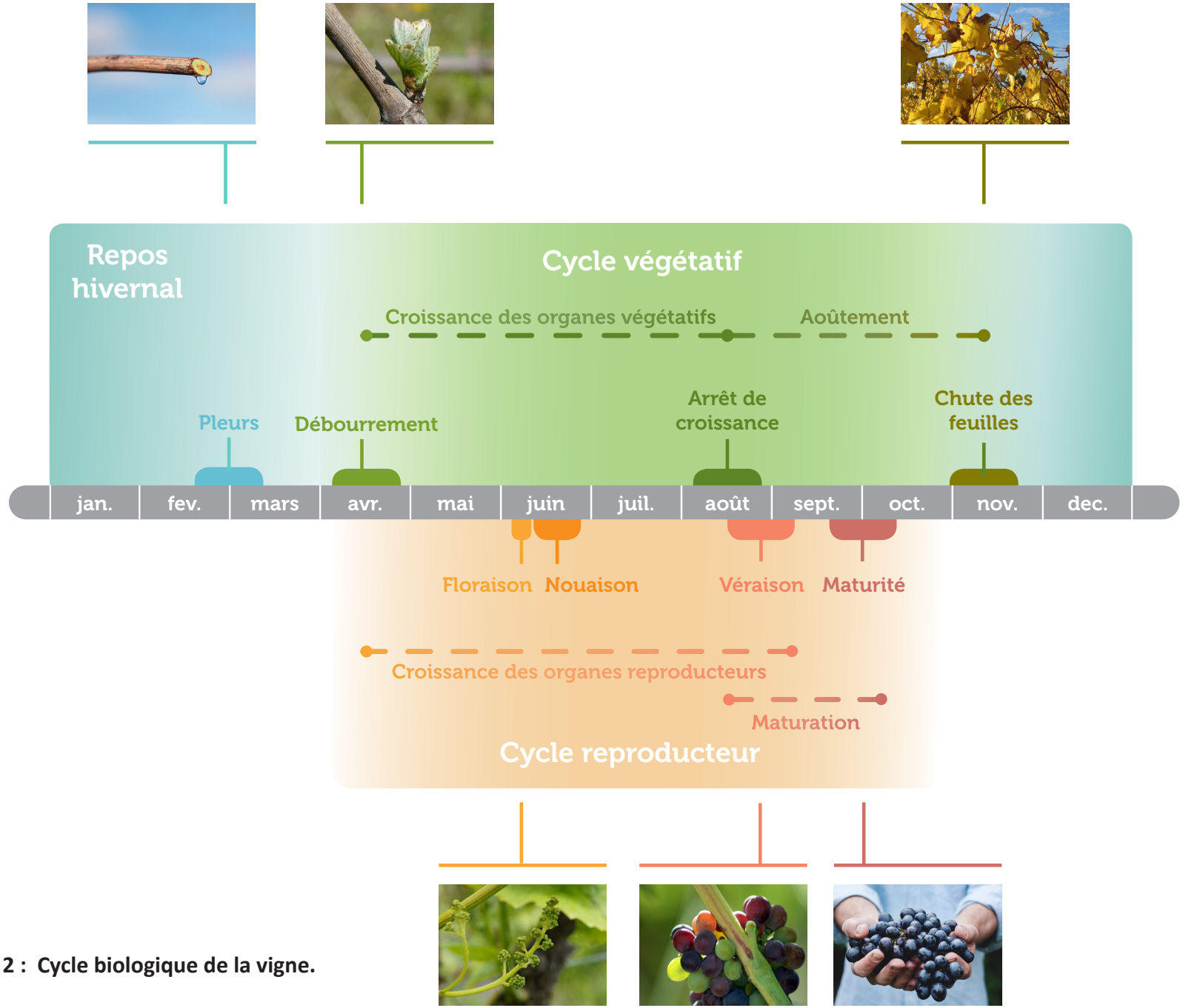


Figure 2 : Cycle biologique de la vigne.

Cycle reproducteur : Après le débourrement des ébauches inflorescentielles, déjà formées dans le bourgeon l'année précédente, une centaine de boutons floraux se développent et se différencient (juin). Après la fécondation, la croissance des baies se divise en plusieurs étapes. La nouaison (juin) correspond à la transformation des ovaires en jeunes baies, qui vont ensuite grossir jusqu'à la véraison (août-septembre), où elles changent de consistance et de couleur. Les baies ensuite ramollissent par entrée de sucre et d'eau jusqu'à la maturité (septembre-octobre). À l'arrivée de l'hiver, l'arrêt des flux provoque un flétrissement des baies et des feuilles.

Les dates de chaque étape sont données à titre indicatif et correspondent *grosso modo* aux conditions du vignoble français, mais elles peuvent varier selon les régions et les conditions climatiques. De plus, un avancement dans l'année des stades de développement est observé comme conséquence du réchauffement climatique actuel **(Duchêne and Schneider, 2005)**.

1.1.2 Origines de la vigne et de la viticulture

Des changements climatiques importants ont eu lieux au cours de la lente dislocation du supercontinent de la Pangée, ce qui a permis l'émergence et la diversification des plantes à fleurs, les Angiospermes, sur la surface terrestre. C'est dans cet environnement de grandes forêts que les premières traces de lianes et arbustes sauvages appartenant au genre *Vitis* ont été identifiées sur les continents américain, européen et asiatique. Elles datent de 65 millions d'années, c'est à dire au cours de l'ère géologique du Paléocène **(Figure 3)**. Un climat doux a permis leur expansion pendant 60 millions d'années, notamment dans les régions les plus au Nord du globe. Cela a perduré jusqu'au début du quaternaire, où une série de glaciations a réduit drastiquement et fragmenté les populations de vignes, limitant leur présence à quelques zones refuges. Cette concomitance de la dislocation des continents et des épisodes glaciaires a conduit à l'isolement génétique des vignes américaines, européennes et asiatiques **(Péros et al., 2011)**.

Les vignes sauvages et l'être humain se sont côtoyés pendant deux millions d'années au cours de la préhistoire ; une consommation des baies de raisin est donc imaginable **(McGovern, 2003)**. Les toutes premières traces de viticulture ont été observées dans le Caucase, avec l'utilisation de la vigne sauvage *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (du latin signifiant « de la forêt »), aussi appelée lambrusque **(Bitsadze et al., 2015; Toffolatti et al., 2018)**. Récemment, des analyses moléculaires ont permis d'identifier les toutes premières traces de vins en Géorgie dans des jarres qui datent de près de 8000 ans **(McGovern et al., 2017)**. Les techniques liées à la viticulture se sont ensuite étendues grâce aux migrations humaines et aux échanges commerciaux des Perses et des Phéniciens tout autour de la méditerranée, des régions favorables au développement de la vigne (température, ensoleillement, géologie) **(Levadoux et al., 1962)**. Avec les conquêtes romaines, l'implantation de la vigne et sa culture

Figure 3 : Origine de la vigne et de la viticulture

Note : L'échelle de temps n'est pas respectée. Le but est d'organiser les différentes ères géologiques et historiques majeures entre elles.

se sont développées dans le reste de la méditerranée et vers l'intérieur des terres, notamment sur l'ensemble de la France. Cette expansion a été poursuivie au moyen-âge, en grande partie par l'église catholique. L'importance donnée au vin par l'homme au cours des différentes civilisations, y voyant tantôt un liquide divin, tantôt un remède, a permis une installation solide de la culture sur tous les continents.

Au fil des civilisations méditerranéennes, des hybridations spontannées entre vignes cultivées et vignes locales ont eu lieu facilitant leur adaptation environnementale **(Myles et al., 2011)**. Ces nouvelles populations ont été à leur tour croisées entre elles dans le but d'améliorer la production et la qualité du vin. L'ensemble de ces croisements explique la richesse actuelle de variétés de *V. vinifera* L. **(This et al., 2006)**. Les vignes cultivées ont été regroupées au sein d'une même sous-espèce : *V. vinifera* spp. *sativa* (le féminin de l'adjectif sativus : « cultivé ») **(Levadoux, 1956)**. De son côté, la vigne originelle sauvage européenne *V. vinifera* spp. *sylvestris* est rare et officiellement protégée depuis 1995, car l'artificialisation des forêts et l'apparition de maladies exotiques l'ont considérablement fragilisée **(Arnold et al., 1998)** **(Figure 1)**. Cette différenciation entre les sous-espèces *sylvestris* et *sativa* est aujourd'hui confirmée génétiquement par des analyses de marqueurs moléculaires. Finalement, la diversité génétique s'est vue élargie par des croisements effectués lors des 150 dernières années entre des vignes cultivées et des espèces sauvages américaines et asiatiques, donnant lieu à ce que l'on appelle des hybrides.

La domestication humaine de la vigne a amené une expansion géographique de cette dernière sur la quasi-totalité de la surface terrestre. Mais en parallèle elle a limité la distribution variétale dans les vignobles à quelques variétés phares, sélectionnées pour leur caractéristiques gustatives et culturales **(This et al., 2006)**. En effet, l'OIV (Organisation Internationale du la Vigne et du Vin) a montré en 2017 que sur les milliers de variétés de vigne connues dans le monde, 13 variétés couvrent plus d'un tiers de la superficie viticole mondiale et 50% du vignoble sont occupés par seulement 33 variétés.

1.1.3 Importance socio-economique de la vigne et du vin

En fonction des cépages, les raisins peuvent être consommés non-transformés en raisin de table, ou transformés séchés, en jus ou en vin par vinification puis élevage. La production de raisin en France alimente majoritairement la filière vinicole **(Figure 4, A).** Avec ses 36.7 Mhl de vin produit et 27 Mhl consommés, la France n'est pourtant pas le 1er pays producteur ni le 1er consommateur, les palmes reviennent respectivement à l'Italie (39.6 Mhl) et aux Etats-Unis (32.6 Mhl) (Chiffres estimés de 2017) (**Figure 4, B)**. Cependant la force de la production française réside dans la qualité de son vin, qui en fait le premier exportateur au monde avec un chiffre d'affaires à l'export de 9 milliards d'euros et une part de marché de 29.6% en 2017 **(Source : Organisation Internationale de la Vigne et du vin, *Élément de***

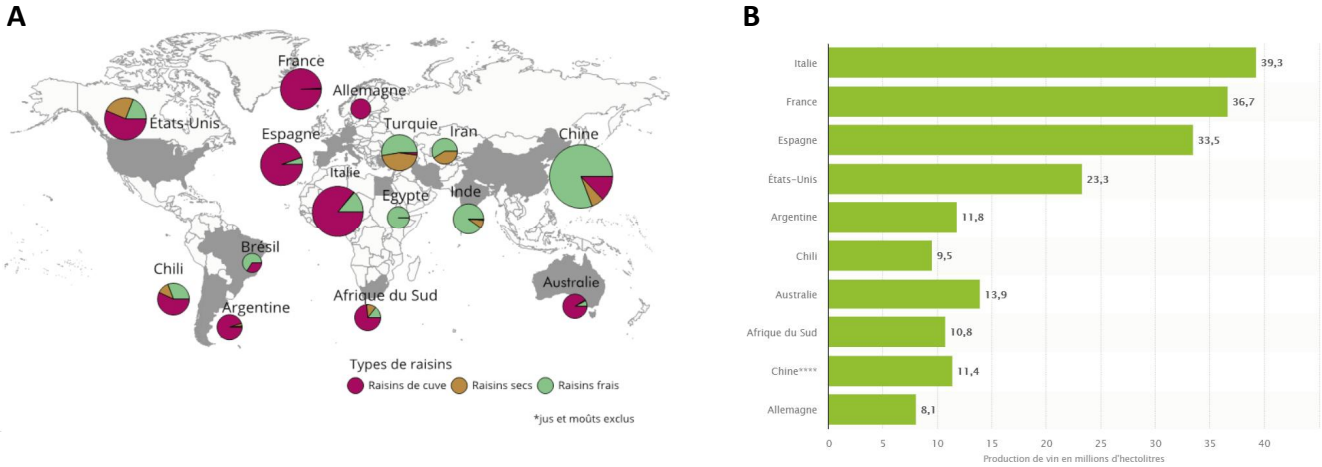


Figure 4 : Importance de la production viti-vinicole en France. (A) Superficie de vigne et destination de la production de raisins (Source : OIV, *Distribution variétale du vignoble dans le monde*, 2017) **(B)** Production de vin par pays en 2017 (Source : OIV, *Eléments de conjoncture vitivinicole mondiale,* 2017)

***la conjoncture mondiale*, Avril 2018)**. Le poids de la viticulture dans l'économie française est en effet très fort. Il s'agit du second secteur exportateur après l'aéronautique et le premier concernant les produits agricoles. Par ailleurs, la filière vinicole représente 15% de la valeur de la production agricole française **(Guyomard et al., 2014)**. En ce qui concerne le marché de l'emploi, les métiers de la vigne et du vin rémunèrent 558 000 acteurs **(Source : Vin et société[1])**. L'œnotourisme joue également un rôle important dans l'économie française. Près de 10 millions de touristes par an, dont une majorité de français, parcourent les routes des vins des vignobles bordelais (18%), champenois (17.2%), alsacien (16.9 %) et bourguignon (16.2%) engendrant un chiffre d'affaires estimé à 5.2 milliards d'euros **(Source : Atout France *Étude tourisme et vin*).**

L'importance du vin français ne se résume pas uniquement par des chiffres d'affaires mais également par une composante culturelle. Le vin est un élément important intégral de la gastronomie française et sa consommation est souvent associée à des célébrations, tant d'ordres religieux que festif. Trois vignobles français ont été inscrits au patrimoine mondial de l'UNESCO (Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture) : en premier lieu la Juridiction de Saint Emilion en 1999, qui a été rejointe en 2015 par les Climats du Vignoble de Bourgogne et les Coteaux, Maisons et Caves souterraines de Champagne **(Source : UNESCO).**

Au vu de son importance dans le quotidien de nombreux français ainsi que dans le monde, différentes études visant à vérifier l'impact du vin sur la santé ont amené des résultats contradictoires qui créent la controverse. Au début, des études ont suggéré que la faible prévalence de maladies coronariennes en France malgré un régime alimentaire riche en acides gras saturés, phénomène connu comme le « paradoxe français », s'expliquerait par la consommation régulière de vin, dont les propriétés antioxydantes du resvératrol protègeraient contre l'effet nocif des acides gras **(Siemann and Creasy, 1992)**. Plus tard, deux autres études ont rassemblé des preuves qui indiqueraient qu'une consommation modérée de vin (1-2 verres par jour) aurait un effet préventif sur les maladies cardiovasculaires, certains cancers, l'obésité, le diabète et certaines maladies neurodégénératives **(Baur and Sinclair, 2006; Roupe et al., 2006).** Cependant, cet effet protecteur est discuté par une étude plus récente qui regroupe les données de 195 pays et qui montre que, au-delà d'un verre par jour, la consommation d'alcool est l'un des principaux facteurs de mortalité prématurée **(Griswold et al., 2018).**

1.1.4 Les maladies de la vigne

Comme toutes les plantes, la vigne interagit avec de nombreux organismes dans son environnement. Certaines de ces interactions peuvent avoir des effets bénéfiques, comme dans les

[1] http://www.vinetsociete.fr/se-mobiliser-pour-le-vin/chiffres-clefs-de-la-filiere-vin

interactions symbiotiques de type mutualiste avec les mycorhizes **(Trouvelot et al., 2015)**. D'autres en revanche ont des effets négatifs pour la plante ; on parle alors d'organismes pathogènes, qui vont impacter fortement la production et le paysage viti-vinicole.

Les agents pathogènes de plantes englobent les ravageurs (insectes, comme la pyrale, la cicadelle, le phylloxéra) et les microorganismes. Cette dernière catégorie regroupe différents types d'agents, qui provoquent différentes maladies chez la vigne, comme les virus (court-noué, enroulement), les champignons (black-rot, pourriture grise, oïdium), les bactéries (flavescence dorée, maladie de Pierce) et les oomycètes (mildiou) **(Tableau 1)**.

Les maladies provoquées par les champignons et les oomycètes sont appelées maladies cryptogamiques. Celles qui touchent la vigne peuvent être organisées en trois groupes :

- Les maladies des tissus verts : l'anthracnose (*Elsinoe ampelina*), le black-rot (*Guignardia bidwellii*), excoriose (*Phomopsis viticola*), le mildiou (*Plasmopara viticola*), l'oïdium (*Erysiphe necator*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*).

- Les maladies du bois : l'eutypiose (Eutypa lata), les dépérissements à Botryosphaeriacées (Diplodia seriata, Neofusicoccum parvum) et l'Esca (Phaeoacremonium spp, Fomitiporia mediterranea, Fomitiporia punctata, Stereum hirsutum).

- Les maladies racinaires : les pourridiés (Armillaria mellea, Rosellinia necatrix, Roesleria subterranea), les pieds noirs (Ilyonectria liriodendri, Campylocarpon fasciculare, Campylocarpon pseudofasciculare).

Le paysage viticole a subi un bouleversement majeur à partir du XIXème siècle avec l'arrivée des quatre fléaux américains brisant l'âge d'or de la viticulture : l'oïdium (1847), le phylloxéra (1863), le mildiou (1878) et le black-rot (1886). Cet épisode épidémique a dévasté le vignoble européen, modifié les pratiques culturales et bouleversé les objectifs de sélection des variétés. Par exemple, c'est ainsi que la technique de greffage de la vigne s'est généralisée sur le vieux continent : la greffe de variétés européennes de vigne sur des espèces américaines résistantes a été la meilleure solution face à la crise du phylloxera. En revanche, le mildiou, le black-rot et l'oïdium constituent toujours un problème majeur pour la viticulture.

1.2 Le mildiou de la vigne

Le mildiou de la vigne est donc une maladie relativement récente sur le continent européen. Elle fait partie des infections qui se sont déplacées à travers les océans *via* les échanges commerciaux du XIX^{éme} siècle. L'absence de connaissance sur le transport de parasites et par conséquent l'absence

Nom		Caractéristiques majeures
Ravageurs		
Insectes phytophages		
Phylloxéra *Daktulosphaira vitifolia*		Tubérosités sur les racines piquées, mortelles en trois années. Jaunissement et galles sur les feuilles piquées. Orgine : Américaine Technique de lutte majeure : Porte-greffe résistant
Pyrale *Sparganothis pilleriane*		Les chenilles dévorent bourgeons, feuilles et grappes. L'aoûtement est inhibé. Technique de lutte majeure : Insecticides
Eudémis *Lobesia botrana*		Les chenilles phytophages s'attaquent principalement aux organes fructifères. Pertes de la qualité du vin et de rendement jusqu'à 1 hl/hectar Répartition particulière : Europe, Afrique du Nord, Caucase Techniques de lutte majeures : Piégage, Insectides
Insectes vecteurs		
Cicadelle *Scaphoideus titanus*		L'insecte ne crée aucun dégat directement mais transmet le phytoplasme de la Flavescence dorée. Ce pathogène américain a été introduit en 1958 et infecte aujourd'hui une grande partie de l'Europe. Technique de lutte majeure : Pesticides
Acariens phytophages		
Acariose *Calepitrimerus vitis*		Les piqûres bloquent le débourrement, créent des mozaïques sur les feuilles et des nécroses, affaiblissement des grappes. Il peut s'en suivre une réduction importante de la récolte. Technique de lutte majeure : Acaricides
Erinose *Colomerus vitis*		Des galles sont formées sur les feuilles et un duvet blanc y apparaît ainsi que sur les boutons floraux. Techniques de lutte majeure : Fongicides et Acaricides (soufre)
Maladies		
Virales		
Court noué *Grapevine fan leaf virus (GFLV)*		Transmis par des nématodes vecteurs. Un dépérissement atteint progressivement les vignes et les entrenoeuds sont réduits. Le rendement est diminué. Techniques de lutte majeure : Arrachage, Nématicides
Enroulement *Grapevine leafroll-associated virus*		Apparition d'un enroulement des feuilles qui n'est pas mortel mais il y a une diminution de la fertilité et du rendement en raisin. La transmission peut se faire par les cochenilles. Techniques de lutte majeure : Arrachage, Insecticides

Tableau 1 : Listes des bioagresseurs de la vigne les plus fréquemment rencontrés. Sources: E-phytia. Réutilisation des photographies autorisées par le Dr Dominique Blancard.

Nom		Caractéristiques majeures

Maladies (suite)

Bactériennes

Maladie de Pierce *Xylella fastidiosa*		Les feuilles se dessèchent partiellement et chutent, les pousses chlorosent, la vigne ne survit pas plus de deux ans. Technique de lutte majeure : Arrachage
Flavescence dorée *Phytoplasma sp*		Les symptômes sont nombreux : Retard dans le débourrement, les inflorescences flétrissent, les feuilles se décolorent, dessèchement des baies. Techniques de lutte majeure : Arrachage; Insecticides

Cryptogamiques

Bois	Eutypiose *Eutypa lata*		Le bois nécrose et perd son écorce. Une coloration noire marque les zones de fructification du champignon. La croissance végétative est ralentie, donnant de toutes petites feuilles chlorotiques. Technique de lutte majeure : Approches prophylactiques
Bois	Chamignons à Esca		Se caractérise par une décoloration des feuilles, se teintant en rouge ou en jaune selon les cépages. Les baies ont un retard de maturité et un flétrissement. Une pourriture blanche et des ponctuations noires apparaissent sur le bois. Technique de lutte majeure : Approches prophylactiques
Bois	Dépérissement *Botryosphaeria*		Les symptômes sont variés : taches foliaires, pourriture des fruits, mortalité des bourgeons, lésions sectorielles dans le bois, réduction de vigeur, ... Technique de lutte majeure : Approches prophylactiques
Feuilles, Baies	Pourriture grise *Botrytis cinerea*		Des taches nécrotiques apparaissent sur les feuilles, les inflorescences dessèchent. Le champignon sporule sur les baies qui finissent par pourrir. Technique de lutte majeure : Protections chimiques
Feuilles, Baies	Oidium *Erysiphe necator*		Les feuilles et les rameaux se recouvrent de taches et s'enroulent, le mycélium apparaît à la surface. La photosynthèse est réduite et les baies se nécrosent. Technique de lutte majeure : Protections chimiques
Feuilles, Baies	Mildiou *Plasmopara viticola*		Des taches d'huiles apparaissent sur les feuilles, suivies d'une sporulation et de nécroses. L'oomycète fructifère aussi sur les baies. Les rameaux et les inflorescences presentent des lésions. Technique de lutte majeure : Protections chimiques
Feuilles, Baies	Black rot Guignardia bibwellii		Le champignon s'attaque aux jeunes organes : des taches nécrotiques apparaissent sur les feuilles, les rameaux et les vrilles. Des taches apparaissent sur les baies, ponctuées de pycnides. Technique de lutte majeure : Protections chimiques

de règlementation et de contrôle de sécurité sanitaire a énormément bouleversé le paysage viticole européen.

Avant 1847 très peu de dégâts générés par des agents phytopathogènes sont décrits chez la vigne cultivée, mais cette date marque l'arrivé de l'oïdium en France, engendrant une chute de 80% de la production de vin. Le parasite est supposé provenir d'Angleterre à partir de pieds prélevés en Amérique pour alimenter des collections botaniques **(Legros and Argelès, 2017)**. Dans le cadre de ces mêmes importations pour créer des collections, des vignes américaines sont introduites en France avec le phylloxera. L'insecte pique les racines, provoquant des tuberosités, ce qui peut mener à la mort du pied de vigne. Trois premiers foyers distincts sont apparus en Europe entre 1861 et 1865 : deux en France dans le Gard et les Bouches-du-Rhône et un en Angleterre à Londres. Le ravageur se disperse rapidement et menace de faire disparaitre la culture de la vigne en Europe mais, paradoxalement, ce sont les mêmes plantes qui ont porté la maladie qui vont apporter la solution pour la combattre. En effet, l'utilisation de vignes américaines tolérantes à l'insecte, soit comme porte-greffes soit pour faire des hybrides tolérants au phylloxera, permet de sortir de la crise. Ce constat conduit à une importation conséquente de matériel végétal depuis l'Amérique, et c'est lors de l'une de ces importations que l'agent du mildiou est arrivé en Europe.

La maladie est observée pour la première fois en 1878 dans le Bordelais **(Gessler et al., 2011).** Un an après son apparition sur le sol français, de nombreux cas d'infection sont identifiés sur l'ensemble du territoire français, en Italie et en Autriche. En 1881, des cas d'infection sont notés en Allemagne, en Europe de l'Est, en Turquie et en Grèce. Les vignes européennes étant sensibles, sa progression est extrêmement rapide **(Wong et al., 2001)**. Au début du XXème siècle, la maladie est reconnue comme un problème majeur pour la viticulture des pays européens et la diversité des vignes cultivées est fortement réduite **(This et al., 2006)**. Seule la généralisation de l'utilisation d'agent cuivré permet de limiter son impact, excepté au cours de la seconde guerre mondiale quand la pénurie du métal empêche les traitements, générant d'important dommages **(Burruano, 2000; Gessler et al., 2011).** Aujourd'hui encore la pression parasitaire est toujours présente partout où la vigne est cultivée.

1.2.1 *Plasmopara viticola*, l'agent causal du mildiou de la vigne

« Mildiou » est un terme générique qui est utilisé pour un grand nombre de maladies cryptogamiques des plantes cultivées. Le mildiou de la vigne est causé par *Plasmopara viticola,* un parasite biotrophe obligatoire inféodé à la vigne qui appartient à la classe des oomycètes.

Les oomycètes comprennent des agents pathogènes de mammifères, de poissons, de crustacées, d'insectes et de plantes. Près de 60% des oomycètes sont pathogènes de plantes. Par la similitude de leurs structures, des symptômes induits chez les plantes hôtes et de leur mode de

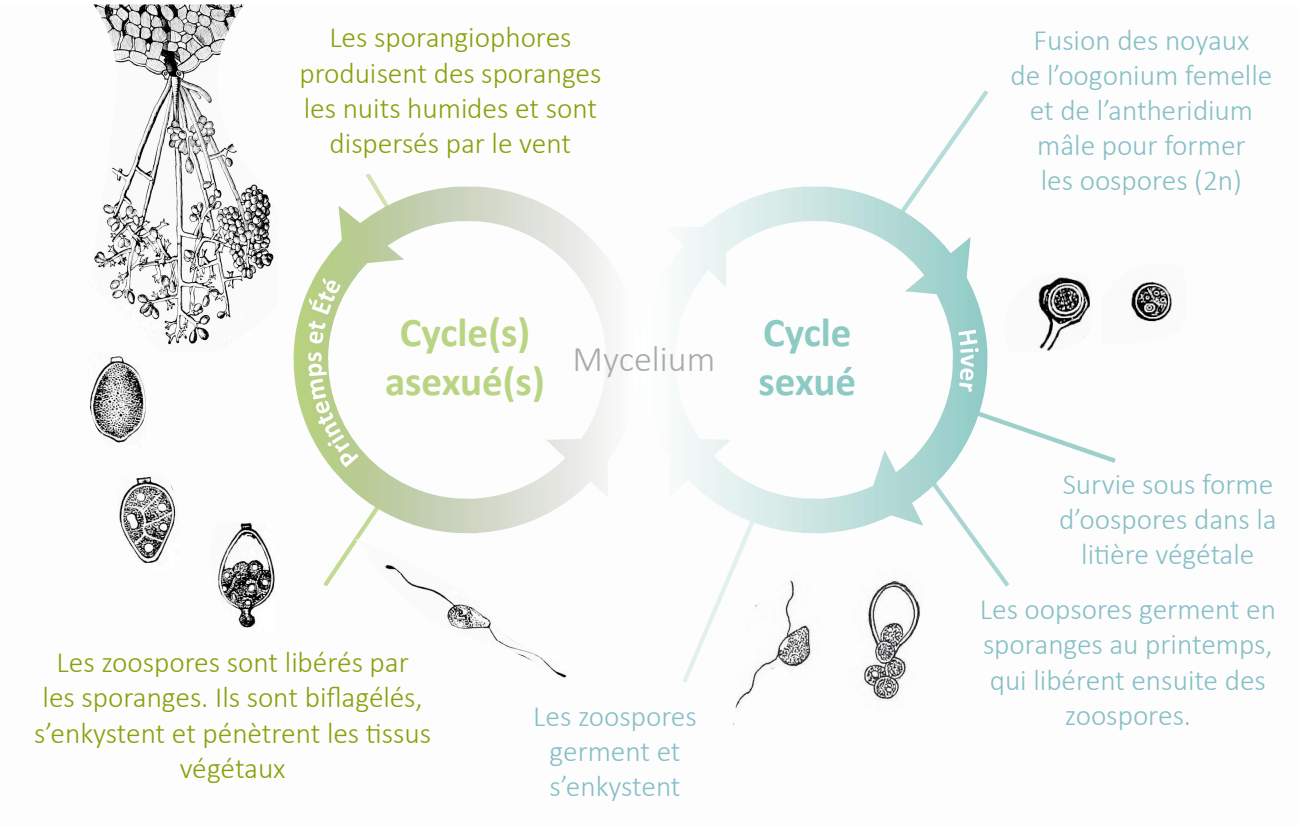


Figure 5 : Cycle de développement de *P. viticola* sur la vigne avec une phase sexuée et une asexuée. La reproduction sexuée a lieu en hiver, les oospores sont munies de parois épaisses qui leur permettent de survivre aux conditions rudes. Au cours du primtemps et de l'été, *P. viticola* se multiplie sur les tissus végétaux au cours de plusieurs cycles asexués. Dessins anatomiques extraits de (Curtis, Carlton Clarence, 1917; Gäumann and Dodge, 1928). D'après la représentation graphique de Rebeca Leme Olivia.

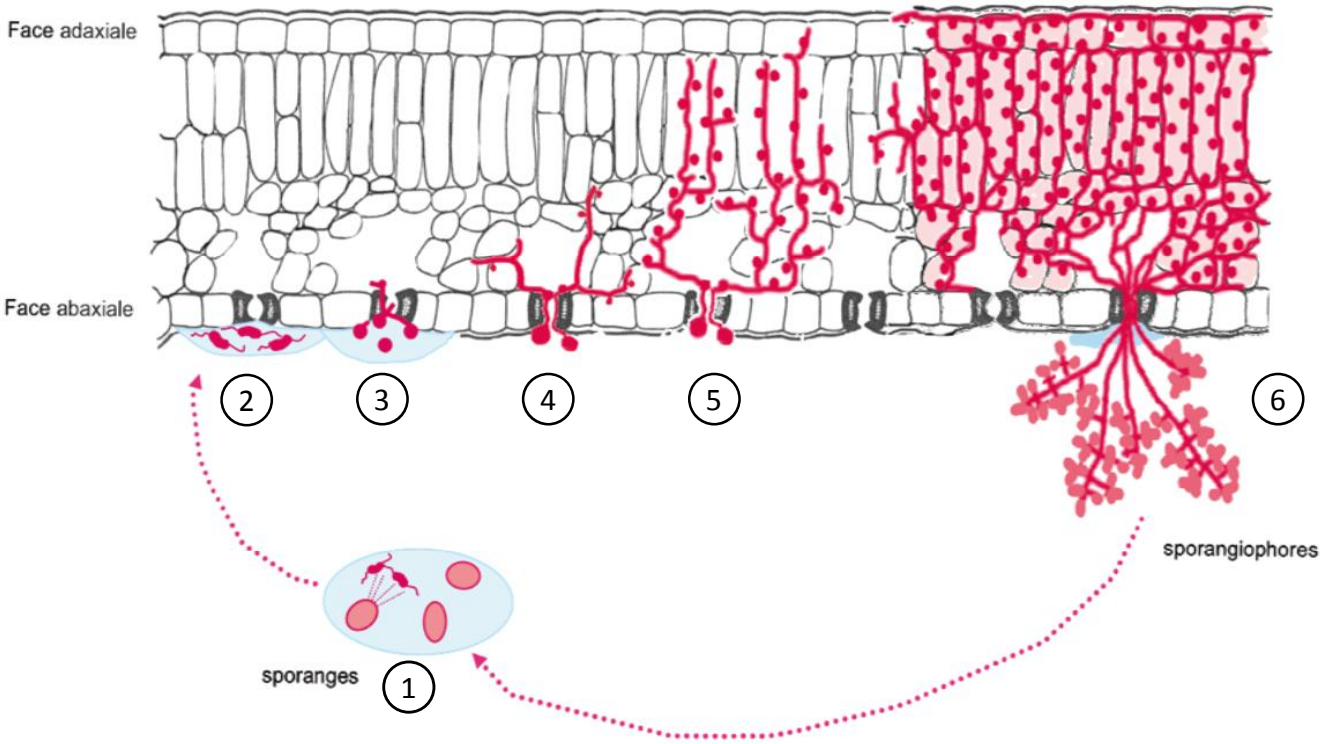


Figure 6 : Etapes du cyle asexué de *Plasmopara viticola* dans une feuille de vigne.
Représentation schématique d'une coupe transversale de limbe infecté. Extrait de Allègre et al, 2007.

parasitisme, les oomycètes ont fréquemment été confondus avec les champignons **(Judelson, 2012)**. Cependant des analyses phylogénétiques récentes classent les oomycètes très loin des champignons, dans le groupe des Straménopiles, proche des algues marines photosynthétiques comme les diatomées et les algues brunes **(Judelson and Blanco, 2005; Cavalier-Smith and Chao, 2006; Beakes et al., 2012)**. Le profil infectieux similaire à celui des champignons proviendrait en réalité d'une convergence évolutive, **(Tyler, 2002),** voire de transfert horizontaux de gènes **(Jiang and Tyler, 2012)**.

L'analyse de la séquence du génome de *P. viticola* montre qu'il dérive d'un ancêtre commun au genre *Phytophthora* hémibiotrophe **(Brilli et al., 2018; McCarthy and Fitzpatrick, 2017).** Il est suggéré que le passage en mode d'infection d'hemi-biotrophe à biotrophe obligatoire n'est pas lié à une perte génomique massive mais à celle de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse, tels que des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote, amenant une dépendance totale à son hôte **(Kemen et al., 2011; Brilli et al., 2018).**

L'origine présumée de *P. viticola* est le Nord-Est de l'Amérique **(Rouxel et al., 2014)**. La variabilité de *P. viticola* en Amérique du Nord est très élevée, avec l'existence de quatre sous-espèces structurées en fonction de la plante hôte **(Rouxel et al., 2013).** L'existence d'isolats également endémiques en Chine a récemment été soulevée par des analyses phylogénétiques, notant une coexistence avec des souches introduites d'origine américaine et une structuration par régions climatiques **(Zhang et al., 2017a)**. Finalement, la variabilité de l'agent pathogène est très limitée en Europe et on n'observe pas de structuration génétique apparente, sauf un léger gradient Est-Ouest **(Fontaine et al., 2013).**

1.2.2 Cycle biologique

Le développement biologique de *P. viticola* au cours de l'année est composé de deux cycles, un asexuel et un sexuel, ce dernier donnant lieu à la formation d'oospores **(Figure 5).** L'hiver les oospores survivent dans le parenchyme des feuilles malades tombées au sol. *P. viticola* est qualifié d'oomycète diploïde hétérothalique **(Wong et al., 2001)**, ce qui signifie que la reproduction sexuelle doit se faire entre deux individus avec des compatibilités complémentaires. Les oospores sont donc générés par fusion de deux gamètes provenant d'individus différents, des oogonia femelles et des antheridia mâles, qui ne sont pas distinguables morphologiquement **(Lebeda et al., 2008)**. Lorsque la température remonte à 11°C et que les pluies se font fréquentes, les éclaboussures chargent les feuilles proches en oospores. Ces dernières vont former des macrosporanges, qui libèrent des zoospores, forme plus fragile de *P. viticola* mais mobile par la présence de deux flagelles **(1) (Figure 6)**. Le flagelle postérieur agit comme un gouvernail pendant que l'antérieur donne l'élan au mouvement **(Judelson and Blanco, 2005)**.

Figure 7 : Cycles de contamination de la vigne par *P. viticola* et diversité des symptômes occasionnés sur les organes végétatifs.
(D'après Vincent Jeannerot et Michel Clerjeau, paru dans Bayer CropScience, 2001)

Après avoir nagé jusqu'aux sites propices à l'infection, sur la face inférieure des feuilles **(2)**, ces zoospores s'enkystent et pénètrent à travers les stomates foliaires grâce à la production d'un tube germinatif **(3))**. Il démarre ainsi l'infection primaire **(Figure 7),** qui correspond au premier cycle asexué de la saison. Les hyphes colonisent les espaces intercellulaires **(4)** et se nourrissent *via* la formation d'haustoria qui s'invagine dans les cellules végétales **(5).** Après une très importante colonisation des tissus, les hyphes atteignent les chambres sous-stomatiques et ressortent à travers les stomates en formant des sporangiophores **(6)** **(Gessler et al., 2011; Langcake and Lovell, 1980)** **(Figure 8)**. L'apparition de la sporulation peut prendre entre 5 et 18 jours en fonction des conditions environnementales. Les sporanges contenus dans les sporangiophores libèrent en conditions favorables les zoospores qui pourront réinfecter d'autres organes et d'autres individus du vignoble **(1)**, il s'agira des infections secondaires **(Figures 7)**. Au cours des étés humides, *P. viticola* peut réaliser de nombreux cycles d'infections asexuées **(Gobbin et al., 2005, 2007)**, ce qui entraine de très importantes pertes de rendement et de qualité du raisin **(Poni et al., 2017)**.

1.2.3 Les symptômes du mildiou de la vigne

P. viticola attaque les organes herbacés de la vigne. La contamination des feuilles se caractérise par une coloration jaune appelée tache d'huile sur la face supérieure et un duvet blanc sur la face inférieure, correspondant à la sporulation. La sporulation peut être aussi observée sur les inflorescences, les jeunes baies (symptômes de rot gris sur jeunes grappes ou rot brun sur les grappes plus tardives), les vrilles et les jeunes pousses **(Figure 7)**. L'infection engendre une diminution de la surface foliaire viable et conduit ainsi à une réduction de l'activité photosynthétique **(Gessler et al., 2011)**. Les réserves dans le cep et le remplissage des raisins se voient donc diminués. Les contaminations des organes reproducteurs amènent un dessèchement des inflorescences ou des baies, ce qui cause une perte de la récolte. Si l'infection n'est pas maîtrisée, la contamination des inflorescences peut conduire à des pertes quasi-totales des rendements **(Dubos, 2002)**. Les infections répétées au cours des années peuvent amener à la mort des pieds **(Dubos, 2002)**.

1.3 Protection de la vigne contre le mildiou

1.3.1 La lutte chimique

La lutte contre les multiples bioagresseurs de la vigne est essentiellement basée sur l'utilisation de produits phytosanitaires. En effet, la viticulture est placée au deuxième rang des cultures les plus consommatrices de pesticides (14.4 % des pesticides utilisés) pour une surface agricole cultivée de

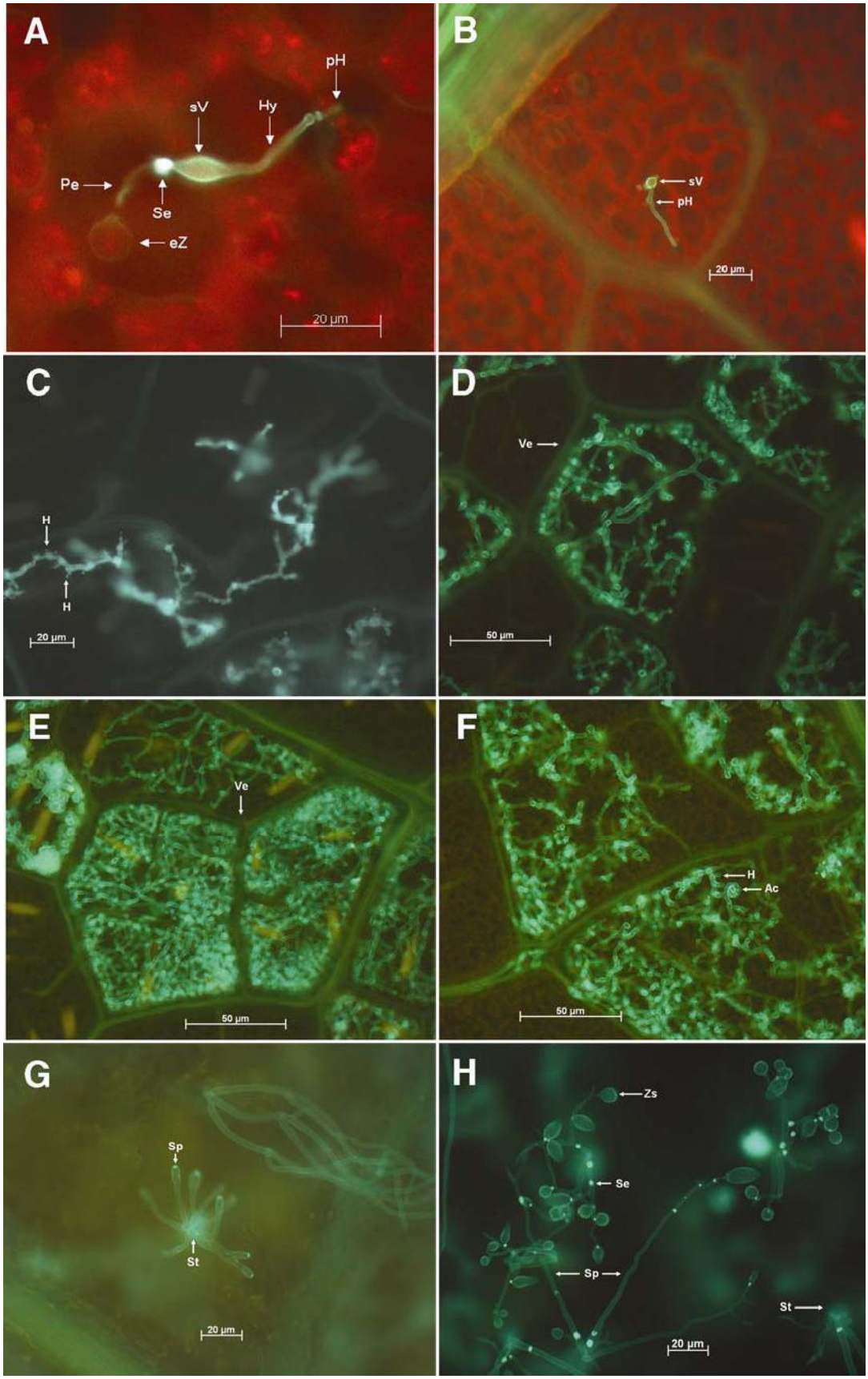


Figure 8 : Déroulement de la colonisation intercellulaire de *P. viticola* sur *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau visualisé en microscopie d'épifluorescence après coloration au bleu d'aniline. (A) Enkystement et pénétration à 6 hpi. Spore enkystée (eZ) vésicule sous-cutanée (sV), hyphe primaire (Hy), haustorium primaire (pH), septum (Se), tube germinatif (Pe). **(B)** Envahissemant de l'espace intercellulaire à 24 hpi. **(C)** Longs hyphes se ramifiant et s'étalant dans le mésophylle; de nombreux haustoria (H) sont déjà formés à 48 hpi. **(D)** Mycélium lâche dans les champs intercostaux, limité par les veines (Ve) à 66 hpi. **(E et F)** Champs intercostaux remplis de mycélium à 96 hpi. **(G)** Initialisation des sporangiophores (Sp) émergeant d'un stomate. **(H)** Sporangiophores avec zoosporanges matures (Zs) à l'extrémité. Extrait de Unger et al., 2007.

seulement 3.3 % **(Bultault et al., 2011)**. Les fongicides représentent 80% des traitements et la presque totalité de ces fongicides (97%) ciblent le mildiou et l'oïdium.

Historiquement, le premier fongicide utilisé est la bouillie bordelaise. Il s'agit d'un mélange d'eau, de sulfate de cuivre et de chaux. À l'origine les baies étaient badigeonnées de ce mélange pour éviter que les voleurs ou les enfants grappillent les raisins en bordure du chemin. En 1882, A. Millardet a constaté que la bouillie bordelaise conférait une protection contre *P. viticola*. Son effet semble venir des ions cuivre qui affectent les enzymes nécessaires à la germination des spores. En intervenant aux toutes premières étapes de l'infection, son utilisation est donc préventive.

Aujourd'hui 242 produits commerciaux, dérivés du cuivre ou de synthèse, sont référencés par le site E-Phy de l'ANSES (Agence National de la Sécurité de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail) (Consultation en Novembre 2018). Ils sont basés sur près de 20 substances actives, utilisées seules ou en combinaisons, dont les dix plus importantes sont référencées dans le **(Tableau 2, A)**. De nombreuses substances actives sont simultanément utilisées contre le mildiou et l'oïdium.

Deux études font l'état des lieux des pratiques phytosanitaires dans la lutte contre le mildiou dans les vignobles en France. Elles ont été réalisées en 2010 et 2017 par l'Agreste (Service de la statistique, de l'évaluation et la prospective agricole) dans le cadre de la directive Ecophyto 2018 et seule l'étude de 2010 est accessible. Cette étude nationale unique référence sur tout le territoire une moyenne de 16 traitements par vignoble **(Figure 9, mildiou)**. Elle indique que l'indice de fréquence des traitements (IFT) varie en fonction du mois et de la région **(Figure 9 et 11)** en lien direct avec la pression exercée par le mildiou **(Figure 10)**. En raison de la biologie de *P. viticola*, sa pression parasitaire dépend d'un climat humide ; elle diminue donc au cœur de l'été, et avec elle la fréquence des traitements phytosanitaires. Concernant les données de 2010, il faut tenir compte du climat particulièrement sec de cette année ; l'utilisation de fongicides a dû donc être modérée par rapport à d'autres années plus humides **(Ambiaud, 2013)**.

L'utilisation de pesticides comporte des problèmes sanitaires et environnementaux **(Wightwick et al., 2010; Gill and Garg, 2014)** **(Tableau 2, B)**. Les directives européennes de 1991 (91/414/CEE) et 2009 (Directive 1107/2009/CEE[2]) mises en place par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne interdisent de plus en plus de substances actives. Cette dynamique européenne a été suivie en France par le Grenelle de l'environnement en 2008 et le plan Ecophyto2018 remplacé par le plan Ecophyto2+ qui vise « une réduction de 25% de l'usage de pesticide au niveau national d'ici 2020, puis de 50% en 2025 » (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et de la Forêt). En France, l'ANSES fait mention de 960 utilisations de produits phytosanitaires (comprenant le type de substance active, la formulation et la quantité prescrite) contre le mildiou de la vigne qui ont vu leur

[2] https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32009R1107

A	% de surfaces traitées en France		Dose en kg/ha		B
Substance active	2010	2006	2010	2006	
Folpel	75	68	0,91	0,94	H351, H332, H319, H317, H400
Mancozèbe	59	51	1,27	1,24	H361d, H317, H400
Fosétyl -Aluminium	55	53	1,51	1,49	H318
Cymoxanil	52	43	0,11	0,11	H302, H317, H361d, H373, H400, H410
Metirame-zinc	38	36	1,31	1,34	H317, H373, H400, H410
Cuivre de l'hydroxyde de cuivre	28	26	0,91	1,28	H400, H410
Diméthomorphe	26	25	0,23	0,22	H317, H332, H351, H400, H410
Cuivre du sulfate de cuivre	26	35	0,82	0,81	H302, H315, H319, H410
Mefenoxam	23	16	0,09	0,08	H302, H318
Cuivre de l'oxychlorure de cuivre	20	22	0,79	0,81	H302, H315, H319, H410

Liste des phrases de risque citées :

H302	Nocif en cas d'ingestion
H315	Provoque une irritation cutanée
H317	Peut provoquer une allergie cutanée
H318	Provoque des lésions oculaires graves
H319	Provoque une sévère irritation des yeux
H332	Nocif par inhalation
H351	Susceptible de provoquer le cancer
H361d	Susceptible de nuire au fœtus
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée
H400	Très toxique pour les organismes aquatiques
H410	Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

Tableau 2 : Les 10 premières substances actives contre le mildiou utilisées en France. (A) Source: Agreste.agriculture.gouv.fr, Enquêtes sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2006 et 2010. **(B)** Phrases de risque correspondant aux 10 premières substances actives contre le mildiou. Sources : Anses, Africulture.gouv.fr, Agro.basf.fr, Inrs.fr.

autorisation retirée au cours des dernières décennies (www.e-phy.anses.fr). Par exemple, l'ACUINEBE fait partie des produits commerciaux interdits d'utilisation depuis 1987. Tous les produits qui comprennent la même substance active, appelée maneb, ont été retirés progressivement de la vente. Le maneb a montré notamment des effets sur la perte de neurones dopaminergiques en lien avec la maladie de Parkinson **(Kumar et al., 2016; Richter et al., 2017).** Le dernier produit concerné est le SULFOMA interdit en 2015. Concernant les 10 molécules les plus utilisées en viticulture citées plus haut, aucune étude ne montre avec certitude d'effet délétère sur la santé humaine. Cependant, pour certains produits des effets observés à posteriori n'avaient pas été mis en évidence lors des analyses initiales. De plus, les données apportées lors de l'homologation des produits phytosanitaires ne font pas état de leur impact sur l'environnement, alors que les résidus s'accumulent dans l'eau et les sols.

En plus de poser des problèmes sanitaires et environnementaux, l'utilisation de produits phytosanitaires est limitée par l'apparition de résistances chez le mildiou, ce qui diminue leur efficacité **(Gisi and Sierotzki, 2008; Colcol and Baudoin, 2015; Hollomon, 2016)**. Des épidémio-surveillances réalisées en France par l'ANSES révèlent une importante augmentation de souches résistantes sur le territoire au fil des années. Un exemple est la surveillance de la résistance aux fongicides de la famille des CAA (Carboxylic Acid Amides), qui représente 5 substances actives réparties dans 60 produits commerciaux très utilisés. Les suivis effectués sur 7 ans dans des parcelles en Bourgogne et en Champagne montrent une apparition progressive de souches résistantes aux CAA **(Figure 12)**, révélant le danger auquel sont exposés les vignobles dépendant de la lutte chimique.

1.3.2 La lutte raisonnée

L'atteinte des objectifs de réduction des produits phytosanitaires imposés par le Grenelle de l'Environnement et du plan Ecophyto 2 implique des modifications de conduite de la part des viticulteurs. La lutte raisonnée s'appuie dans un premier temps sur une utilisation raisonnée des intrants définie par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique). L'emploi d'intrants chimiques se doit d'être parcimonieux en réduisant les doses et espaçant les traitements en fonction du risque de développement de la maladie. Elle prend en compte des facteurs comme la croissance foliaire, les précipitations, les températures et la pression parasitaire. Mais tient compte également de la sensibilité du cépage cultivé par le viticulteur et par ses voisins, de l'implantation de la maladie les années précédentes et de la croissance de la vigne **(Institut Français de la Vigne et du Vin)**.

Des outils et modèles sont développés pour l'aide à la prise de décision afin d'assister les viticulteurs. Parmi eux figure Optidose, développé par l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) à Bordeaux, qui adapte la dose du produit commercial pour lutter contre le mildiou en fonction de la pression parasitaire, la période de l'année et la surface du vignoble. Il existe également des bulletins

Figure 9 : Moyenne des traitements par parcelle en 2010 toutes maladies confondues. Nombre moyen de traitements phytosanitaires par parcelle de vigne à raisin de cuve en 2010. (Sources : *SSP-Agreste-Enquêtes sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2010*)

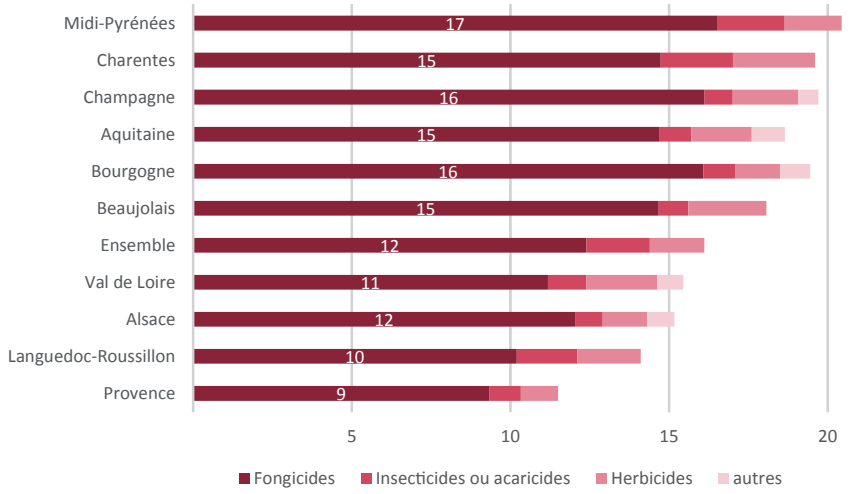


Figure 10 : Pression parasitaire du mildiou ressentie en 2010. Le bilan sanitaire dresse un bilan réel de la pression parasitaire. Le graphique illustre la pression ressentie par les viticulteurs. (Sources : *SSP-Agreste-Enquêtes sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2010*)

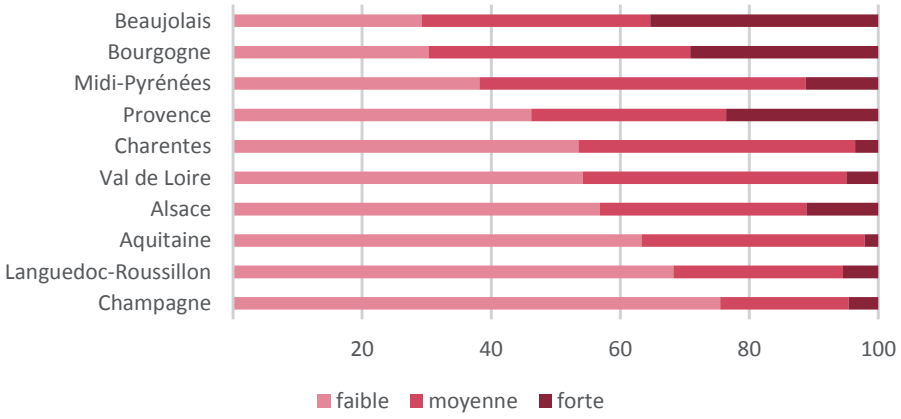


Figure 11 : Nombre de traitements selon la période de l'année 2010. Répartition des traitements contre le mildiou par mois selon l'intervalle moyen de jours entre deux traitements anti-mildiou (ensemble des parcelles en mode non biologique). (Sources : *SSP-Agreste-Enquêtes sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2010*)

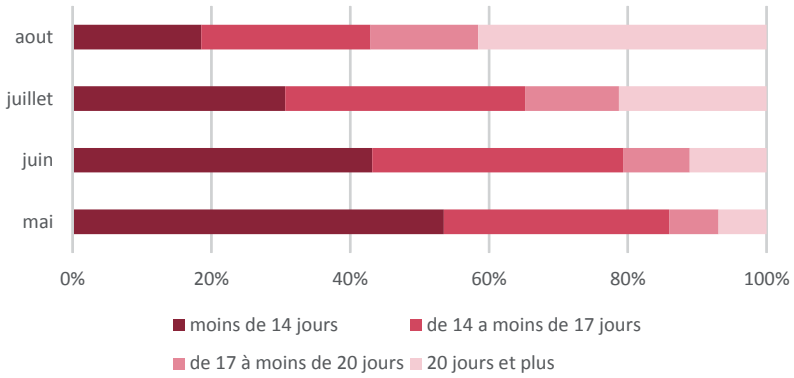
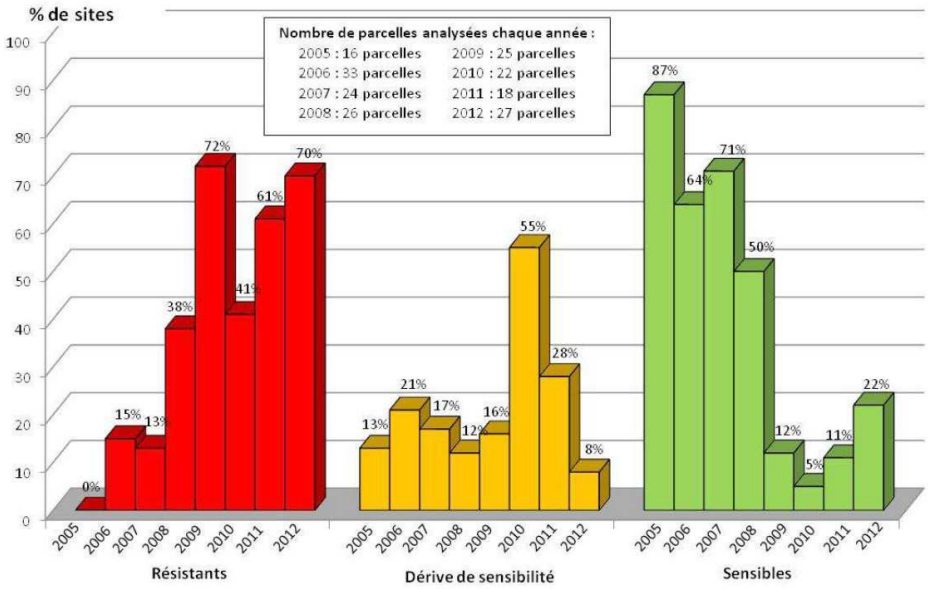


Figure 12 : Évolution de la proportion de résistance au fongicide de type CAA. Pourcentage d'isolats de *P. viticola,* prélevés entre 2005 et 2012, qui sont resistants (rouge), partiellement resistants (jaune) ou sensibles (vert) au CAA. (Extraits de *Résistance du mildiou de la vigne (Plasmopara viticola) vis-à-vis des CAA et des QiI, Plan de surveillance 2012.*)



de Santé du végétal nationaux ou locaux publiés sur les sites internet des chambres de l'agriculture et de la DRAAF (Directions Régionales de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt). Dans la viticulture conventionnelle, l'utilisation de doses réduites de fongicides contre le mildiou tend à être plus fréquente dans les vignobles français : on a noté une réduction des doses de 38% en 2006 et 42% en 2013 par rapport aux doses homologuées **(Sédillot and Poullette, 2016).**

L'utilisation de doses réduites est aussi appliquée dans la viticulture biologique, qui représente 8% de la surface viticole française en 2013. Elle se base principalement sur l'application de produits cuivrés et soufrés, dont les fréquences d'application sont très élevées **(Ambiaud, 2013)**. Les doses sont cependant réduites, se situant à 37% des doses homologuées **(Sédillot and Poullette, 2016)**. Mais le cuivre est un métal lourd qui s'accumule et contamine les sols **(Bengtsson et al., 1985; Baize et al., 2007; Wightwick et al., 2008; Wang et al., 2009)**. Sa toxicité envers le microbiome, la faune et la croissance végétale en général oblige à trouver de nouvelles approches de lutte alternative, comme l'utilisation de variétés résistantes, l'emploi de produits naturels biocides (parmi lesquels figurent les huiles essentielles notamment d'orange), l'emploi de stimulateurs de défenses des plantes ou même l'utilisation de bâches anti-pluie, onéreuses mais apparemment efficaces **(Andrivon et al., 2018)**.

1.3.3 La prophylaxie

La prophylaxie désigne toutes les pratiques culturales qui permettent de réduire l'apparition, mais également la propagation et l'aggravation d'une maladie. Ces techniques n'évitent pas l'apparition du mildiou mais limitent sa propagation. En viticulture, parmi les pratiques conseillées figurent la coupe des rameaux gourmands (épamprage ou ébourgeonnage), des feuilles (effeuillages), des organes jeunes plus sensibles (rognage) et de la végétation du sol (désherbage). En effet, l'accumulation de végétation augmente l'humidité ce qui favorise le développement de *P. viticola*. Il est également conseillé de drainer toutes les sorties d'eau (mouillères) et d'éviter son accumulation dans les creux ou les bouts de rang (BASF-FranceAgro[3]). Le mildiou se développe très rapidement dès que les conditions météorologiques sont réunies, c'est pourquoi la prophylaxie repose beaucoup sur la surveillance des températures et des pluies. Des outils sont proposés aux viticulteurs pour suivre précisément l'évolution des conditions météorologiques (BASF-Agro).

1.3.4 La lutte biologique

L'OILB définit la lutte biologique comme : « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ». À ce jour, il existe sur le marché très peu d'agents de lutte biologique contre le mildiou de la vigne. Cependant, des recherches sont en cours pour

[3] https://m.agro.basf.fr/agroportal/mfr/fr/startpage.html

développer cette stratégie. Différentes souches de la bactérie *Bacillus subtilis* ont été montrées comme causant une inhibition de l'infection de *P. viticola* sur feuilles et baies, inhibition qui pourrait être due à une action antibiotique **(Furuya et al., 2011; Zhang et al., 2017b)**. Le champignon *Trichoderma harzianum* T39 stimule les défenses des vignes sensibles, *Vitis vinifera* cv. Pinot Gris et cv. Pinot Noir, apportant une protection au mildiou **(Perazzolli et al., 2008)**. Un autre champignon, *Fusarium proliferatum,* a montré une efficacité en laboratoire et au vignoble. Des champignons mychoriziens comme *Rhizophagus irregularis* sont également étudiés pour leurs effets potentialisateurs des défenses chez la vigne **(Bruisson et al., 2016)**. Les approches de méta-omique récentes permettent d'obtenir une meilleure évaluation de l'impact du microbiome sur la protection ou la promotion de maladies de la vigne, ce qui permettra l'identification de nouveaux agents biologiques **(Alaimo et al., 2018)**.

1.3.5 La stimulation des défenses des plantes

L'action des stimulateurs de défenses naturelles (SDN) (ou SDP pour stimulateurs de défenses des plantes), repose sur l'activation préalable des mécanismes de défense de la plante pour la rendre plus résistante à une infection. Les SDN peuvent induire des mécanismes physiques, comme le renforcement des parois, ou des mécanismes bio-chimiques, comme la potentialisation d'une mort cellulaire des cellules infectées ou la sécrétion de composés antimicrobiens, tels des enzymes ou phytoalexines. La présence du SDN sur quelques feuilles peut souvent suffire à déclencher la SAR, résistance systémique acquise, dans le reste de la plante.

Les SDN peuvent être naturels ou de synthèse. Les SDN naturels sont souvent des fragments d'agents pathogènes ou de plantes qui peuvent être reconnus et éliciter une réponse de défense. Par exemple, les oligogalacturonides sont des fragments de parois cellulaires végétales ; leur présence intercellulaire mime une altération des barrières physiques par les agents pathogènes et active la signalisation de défense conduisant à une résistance à *P. viticola* **(Allègre et al., 2009; Aziz et al., 2004; Galletti et al., 2011)**. Très peu de SDN sont actuellement sur le marché contre le mildiou de la vigne en France.

Produit commercialisé	**Producteur**
Bastid® /Messager® qui combine oligochitosan et oligopectates	Syngenta
Romeo® qui contient des parois de levures	Agrauxine, BASF France
Pertinan ® du phosphonate de potassium	DeSangosse
Bion® un analogue de l'acide salicylique	Syngenta

D'autres SDN, non commercialisés, sont fréquemment décrits dans la littérature comme ayant un effet sur l'infection de *P. viticola* : PS3 (laminarine sulfatée purifiée à partir d'une algue brune) **(Trouvelot et al., 2008)**, l'acide aminé BABA (acide β-aminobutyrique)**(Reuveni et al., 2001).** Certains SDN, comme le composé nommé PE, sont capables d'avoir simultanément une activité inductrice de défenses et biocide en altérant la motilité des zoospores **(Krzyzaniak et al., 2018)**. Cependant, l'observation de ces propriétés ne garantit pas un effet en vignoble où les ceps sont confrontés à de nombreux stress biotiques et abiotiques fréquents **(Dufour et al., 2016)**. Les SDN ont également leurs limites, car la stimulation fréquente des voies de défenses peut impacter négativement l'allocation des ressource vers le développement végétal **(Davidsson et al., 2017)**.

1.3.6 Utilisation de variétés résistantes

Une autre méthode de lutte alternative consiste à utiliser des plantes naturellement résistantes. Elle a l'avantage par rapport à l'utilisation de SDN, de biocide, d'agent biologique et de la prophylaxie de réduire le coût de la culture, la main d'œuvre nécessaire, le nombre de passages des pulvérisateurs dans les rangs qui tassent le sol et l'impact carbone du vignoble.

Cette approche sera développée dans la seconde section introductive de ce manuscrit.

2. La résistance des plantes aux maladies

Dans la nature les plantes sont soumises à l'attaque de nombreux agents pathogènes. Les défenses basales des plantes, qui sont quasiment identiques chez toutes les espèces, permettent de les combattre presque tous. La spécificité survient au cours de l'évolution quand certains agents pathogènes arrivent à contourner les défenses d'une espèce végétale. L'agent pathogène pourra infecter cette espèce mais pas les autres. Une fois la résistance végétale mise en échec, l'agent pathogène peut mettre en danger la plante en empêchant sa reproduction. L'équilibre « prédateur-proie » fait que l'agent pathogène va s'anéantir s'il y a disparition de ses hôtes. Dans les écosystèmes naturels, ces épidémies sont donc en général courtes et limitées dans l'espace **(Tack et al., 2012)**.

Dans les écosystèmes agricoles, cet équilibre disparaît. Les plantes sont apportées par l'agriculteur, l'hôte est ainsi continuellement présent en très grand nombre et sur de très grandes surfaces, il n'y a pas de régulation naturelle de la population. Ce contexte favorise l'apparition d'agents pathogènes spécifiques de l'hôte **(Boyd et al., 2013)** et les conséquences peuvent être très graves, comme le montre l'épisode de famine entre 1845 et 1849 en Irlande et dans les Highlands en Ecosse suite à l'apparition de *Phytophthora infestans* responsable du mildiou dans les cultures de pomme de terre.

2.1 L'utilisation de plantes résistantes en agriculture

Depuis des milliers d'années, l'homme fait de la sélection de plantes résistantes. Après la domestication des espèces, les pépins des baies et les grains des épis provenant des individus les plus producteurs et vigoureux, dans des conditions de stress biotiques et abiotiques, étaient conservés pour les semis suivants. Il s'agissait de semis de populations hétérogènes et ce mode de sélection, dit sélection massale, a été utilisé jusqu'au XIX^{éme} siècle. Après la découverte des organes reproducteurs et les travaux de Mendel sur l'hérédité, la maîtrise des croisements a permis de diriger plus finement la sélection pour des caractères choisis, donnant lieu à la création de populations de plus en plus homogènes et à la naissance de la création variétale.

Pendant les périodes initiales de l'amélioration des plantes pour la résistance aux maladies, des cas particuliers et des incohérences apparaissent et rendent le travail plus difficile pour les sélectionneurs **(Sansome, 1940)**. D'un côté, les pressions parasitaires ne sont pas toujours les mêmes chaque année, les conditions climatiques et la prédation par exemple impactent les populations d'agent pathogène et modifient le niveau de résistance mesuré. De plus, le caractère de résistance sélectionné n'est pas toujours stable. Le niveau de résistance d'une plante vis-à-vis d'un agent pathogène est parfois variable, allant de la résistance totale jusqu'à la sensibilité. Des variations dans

les lois de ségrégation mendélienne des gènes sont observées, et s'expliquent aujourd'hui notamment par l'épigénétique.

Suite à la domestication, les espèces cultivées ont une faible diversité génétique qui peut être un frein à la création de variétés résistantes. A l'inverse, les espèces sauvages ont une plus grande diversité génétique et peuvent servir de source de gènes de résistance. Lorsqu'une plante possédant des caractères de résistance est interfertile avec la plante d'intérêt agronomique, il est possible de les croiser et, par le biais de rétrocroisements successifs, de produire des plantes associant résistance et performance agronomique. Cette approche bien qu'intéressante montre des limites lorsque les caractères de résistance et de performances agronomiques ne sont pas conciliables. L'exemple des multiples travaux menés pour obtenir des pommes de terre résistantes à *Phytophthora infestans* est très révélateur **(Sansome, 1940)** : les quelques individus résistants créés sont incapables de produire des tubercules dont la qualité est appréciable pour une culture à grande échelle.

Une autre limite potentielle des variétés résistantes est leur durabilité. Une fois que des variétés sont créées, mises sur le marché et déployées sur le territoire, il peut arriver que les caractères de résistance perdent leur efficacité de façon plus ou moins rapide : les agents pathogènes visés ont réussi à contourner les résistances sélectionnées. Le contournement de la résistance semble moins probable lorsque plusieurs facteurs de résistance sont déployés conjointement sur le territoire ou introduits simultanément dans la plante d'intérêt agronomique. L'introgression de plusieurs gènes de résistance ne garantit pas pour autant l'impossibilité d'un contournement. Par exemple, des cultivars de blé cumulant plusieurs sources de résistances fortes contre la rouille noire provoquée par *Puccinia graminis* ont été systématiquement contournés. En 1960, le cultivar résistant Mengavi qui possédait SrTt-l et Sr9c a dû être retiré du marché, et le cultivar Mendos, qui possédait Sr7a, SrIl, Sr17 et Sd6 a connu le même sort en 1964 **(Jackson et al., 2004)**.

2.2 Résistance durable

Le problème majeur associé au développement de variétés résistantes est leur durabilité. Une résistance est dite durable « lorsqu'elle reste efficace dans une variété cultivée à grande échelle, pendant une longue période de temps et dans des conditions favorables au développement de la maladie » **(Johnson, 1984)**. Plusieurs facteurs peuvent influencer la durabilité de la résistance. Certains sont propres à la plante, comme la nature de la résistance ou son déploiement, pendant que d'autres proviennent de l'agent pathogène, en particulier son potentiel évolutif et la pénalité imposé sur sa *fitness* par l'éventuel contournement de la résistance. Finalement, des facteurs environnementaux peuvent aussi jouer un rôle dans l'issu de l'interaction.

Les contournements dépendent généralement de mutations aléatoires et de la ségrégation de gènes qui ont majoritairement lieu au cours de la reproduction sexuée. La souche contournante devient rapidement majoritaire au sein de la population microbienne appuyée par une sélection positive. Des caractéristiques particulières de la biologie des micro-organismes comme l'alternance de cycles sexués et asexués, l'absence de protection contre les UV, des cycles de multiplication courts, une bonne capacité de dispersion ou une forte sporulation, augmentent leur pouvoir évolutif et leur confèrent donc une forte capacité à contourner les résistances **(McDonald and Linde, 2002).**

Un autre aspect de la biologie de l'agent pathogène pouvant influencer la durabilité des résistances est ce que l'on appelle le coût de la virulence, c'est-à-dire les conséquences que le contournement de la résistance aura pour la *fitness* de l'agent pathogène **(Leach, 2001)**. Si pour contourner un gène de résistance un agent pathogène doit payer un fort prix sur sa *fitness*, la souche résultante aura des difficultés à s'imposer dans les populations pathogènes et la résistance de la plante sera plutôt durable ; en revanche, si le contournement n'impose pas de coût pour l'agent pathogène, la résistance de la plante sera facilement contournée.

2.2.1 Nature de la résistance et durabilité

Les types de résistance génétique et leur lien avec la durabilité peuvent être analysées au travers de différents points de vue, comme le phénotype de la résistance ou la nature et le nombre de gènes impliqués. Les concepts résultants sont fréquemment associés, voire confondus, mais des exemples montrent que cette association n'est pas toujours vraie.

Résistance qualitative vs Résistance quantitative

Du point de vue de la distribution du phénotype de la résistance dans les populations, on peut distinguer la résistance qualitative, où les phénotypes correspondent à des classes discrètes, et la résistance quantitative, où les phénotypes suivent une distribution continue.

La résistance qualitative est souvent appelée résistance totale ou forte **(Parlevliet, 2002).** Très fréquemment elle se visualise par la mise en place d'un mécanisme de défense très fort comme par exemple la réponse hypersensible (HR, *Hypersensitive response*), une mort cellulaire programmée qui se déclenche dans les cellules infectées et qui limite la propagation de l'agent pathogène dans le reste des tissus végétaux. Dans un nombre important de cas, cette résistance dépend d'un ou de deux gènes majeurs et elle est spécifique à un isolat particulier, elle est donc appelée résistance « race spécifique ». En raison de sa nature, ce type de résistance est facilement identifiable dans des populations ségrégantes entre plantes résistantes et sensibles **(St Clair, 2010)**. Cette résistance très

forte est décrite comme éphémère, car elle est fréquemment contournée par les agents pathogènes, et souvent de façon rapide.

La résistance dite quantitative ne se distingue pas par une absence de maladie mais par une réduction de l'impact de la maladie ou un ralentissement de son développement. Elle peut se mesurer par un pourcentage de plantes qui survivent, un pourcentage d'agent pathogène qui réussit à finir le cycle d'infection et à se disperser. La résistance quantitative est beaucoup plus fréquente que la résistance qualitative et ne dépend pas de la mise en place de la HR. Elle est parfois considérée comme plus durable par rapport à la résistance qualitative. La résistance quantitative est parfois difficile à identifier car elle ne présente pas toujours de rapport avec une ségrégation mendélienne triviale, puisque les phénotypes peuvent résulter des interactions de gènes entre eux ou avec l'environnement **(St Clair, 2010)**. Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux résistances quantitatives sont très peu connus et généralement ils contrent une grande gamme d'isolats d'agents pathogènes et sont donc qualifiés de non spécifiques. La résistance quantitative est difficile à contourner par les agents pathogènes, mais elle crée une pression de sélection qui conduit à des souches plus agressives des agents pathogènes, un phénomène qu'on connaît comme érosion de la résistance **(Pariaud et al., 2009)**. **Cowger and Mundt (2002)** montrent que des isolats de *Mycosphaerella graminicola* prélevés sur des cultivars de blé modérement résistants présentent une augmentation de l'aggressivité en fin d'épidémie en comparaison aux isolats prélevés sur des cultivars sensibles.

Résistance monogénique vs Résistance polygénique

Du point de vue du nombre de gènes impliqués dans la résistance, les résistances peuvent être monogéniques (un seul gène) ou polygéniques (plus d'un gène) **(Demol, 2002)** **(Figure 13)**. Par le passé, il a été assimilé à la résistance monogénique une résistance verticale, spécifique à un parasite, et à la polygénique une résistance horizontale. Les concepts de résistance verticale et horizontale ayant été employés pour désigner de nombreux concepts différents, ces termes sont devenus peu pertinents.

Les résistances monogéniques et polygèniques sont fréquemment associées aux résistances respectivement qualitatives et quantitatives. Les résistances monogéniques sont fréquemment associées aux résistances fortes, spécifiques et qui amènent au déclenchement d'une HR. Du point de vue de l'amélioration, le gène concerné peut facilement être identifié, situé sur un chromosome donné et introgressé au cours des programmes de sélection. Les résistances polygéniques peuvent faire appel à plusieurs barrières différentes érigées contre les agents pathogènes envahissants. D'autre part différents loci peuvent contrôler un même mécanisme de défense. Ces résistances polygéniques sont donc considérées comme étant plus durables que les résistances monogéniques facilement contournables. Il arrive souvent qu'aucun des gènes d'intérêt n'ait suffisamment d'effet

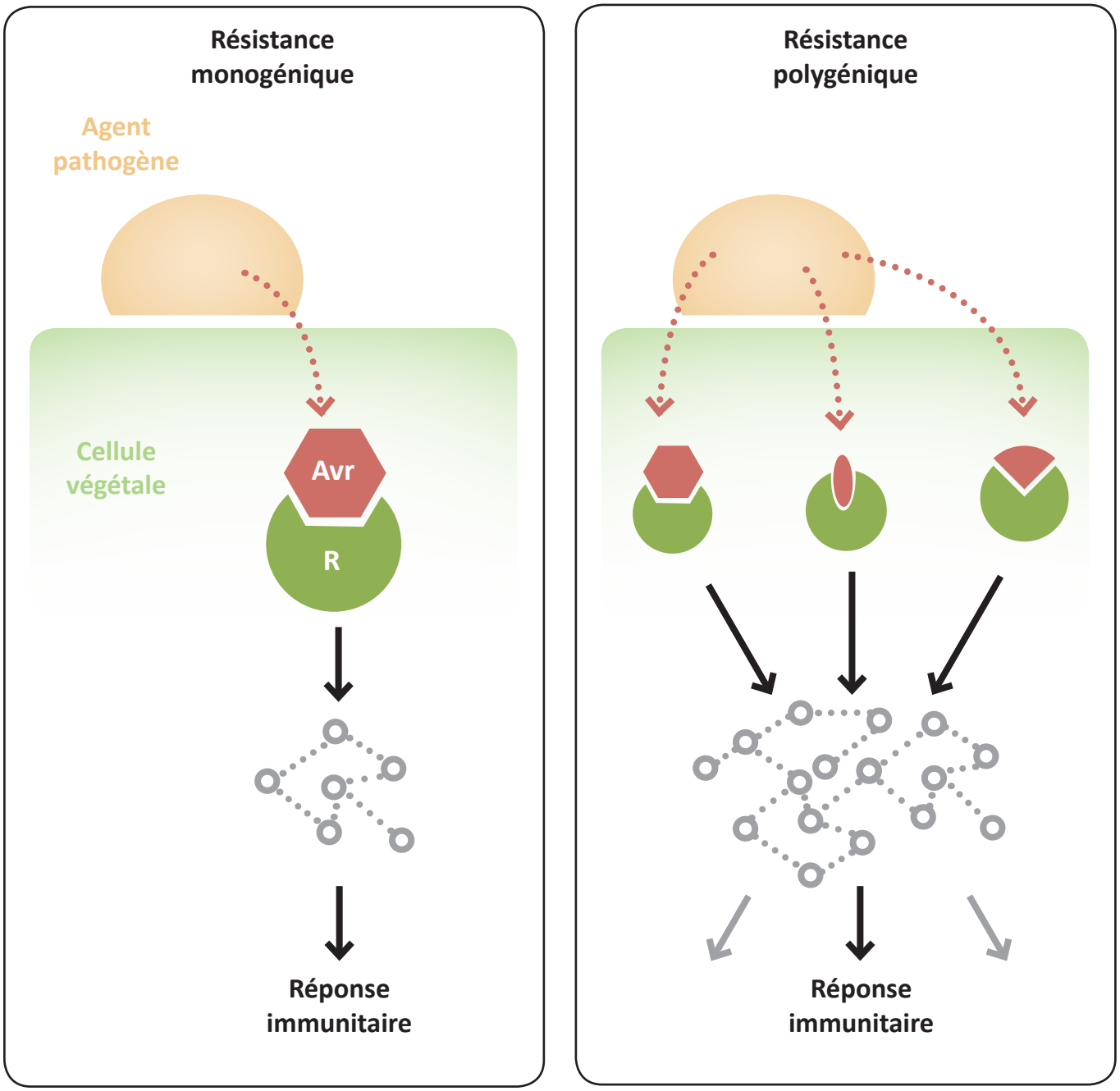


Figure 13 : Modèle simplifié de la comparaison des formes de résistance monogénique et polygénique. La résistance monogénique est classiquement décrite comme la reconnaissance d'une protéine d'avirulence (Avr, en rouge) du pathogène par une protéine de résistance (R, en vert) de la plante. Elle fait intervenir une seule voie de signalisation La résistance polygènique implique la combinaison de plusieurs mécanismes de défense et voies métaboliques. Ces deux resistances differt notament par les voies métaboliques impliquées, la complexité est plus importante pour la résistance polygènique. Modifié à partir de : https://www6.toulouse.inra.fr/lipm/Recherche/Immunite-quantitative-chez-les-plantes.

individuellement pour permettre son identification, ce qui entraine une grande difficulté pour leur suivi au cours des croisements dans des programmes de sélection.

Résistance dominante vs Résistance récessive

Du point de vue de la nature de la résistance, les résistances peuvent être dominantes, *i.e.* un seul allèle du gène de résistance est suffisant pour conférer le phénotype, ou récessives, *i.e.* les deux copies du gène doivent contenir l'allèle lié à la résistance.

La résistance dominante est très fréquemment associée à la théorie de la « résistance gène pour gène » **(Flor, 1971)**. Un gène de résistance (R) est capable de détecter une protéine du parasite, qui est alors qualifiée de facteur d'avirulence (Avr). La résistance arrive quand la plante porte le gène *R* et l'agent pathogène, le gène *Avr*. Les gènes de résistance dominants ont été identifiés comme codant des protéines qui agissent comme des récepteurs qui reconnaissent les protéines Avr de l'agent pathogène, reconnaissance qui souvent donne lieu au déclenchement d'une HR. Les résistances dominantes sont en général facilement contournables. Un seul événement de mutation sur le gène d'avirulence est suffisant pour le contournement par le parasite. Il peut s'agir, entre autres, d'une mutation d'un acide aminé sur le site de l'interaction moléculaire du couple R/Avr, ne permettant plus la reconnaissance par la protéine R, ou d'une délétion du gène *Avr*. Au niveau évolutif, cette adaptation est très rapide à mettre en place, comme le montre le grand nombre de gènes dominants qui ont été contournés **(Parlevliet, 2002)**. Tout comme la résistance qualitative, la résistance dominante est facilement identifiable dans des populations ségrégantes entre plantes résistantes et sensibles.

Les résistances récessives se basent généralement sur des mutations de gènes de l'hôte nécessaires à l'infection, ce qui explique qu'on ait besoin des deux copies pour que la résistance soit effective. La résistance est donc conférée par l'incapacité de l'agent pathogène à se développer. Le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas connu pour tous les gènes identifiés.

La résistance récessive a été très utilisée pour la création de variétés résistantes aux virus. Un exemple est le gène *pvr2,* utilisé depuis 1956 dans la création de variétés de piment résistantes aux potyvirus **(Lecampion et al., 2009)**. Les eIF4 sont une famille de protéines impliquées dans le complexe d'initiation de la traduction chez les eucaryotes qui permettent le recrutement des ribosomes **(Browning, 1996)**. Dans le cadre de l'infection virale d'un potyvirus, il a été observé que eIF4E interagit avec la protéine VPg virale, interaction qui est essentielle pour la réplication virale. Des mutants naturels de eIF4E et eIF4G confèrent une résistance spécifique chacune à un potyvirus donné **(Charron et al., 2008; Ruffel et al., 2002).** Des mutations de protéines de la famille eIF4E conférant une résistance récessive aux potyvirus ont été également observées chez d'autres espèces (*pot1* de la tomate, *sbm1* du pois, *nsv* du melon, *rym4* et *rym5* de l'orge) **(Gao et al., 2004; Nieto et al., 2006;**

Ruffel et al., 2005; Stein et al., 2005). Ces résistances sont relativement durables et *prv2* est toujours utilisé dans les programmes de sélection 60 ans après sa découverte. Mais des souches virales sont capables de contourner cette résistance grâce à la mutation de quelques acides aminés sur le site de liaison de la VPg avec eIF4E **(Roudet-Tavert et al., 2007)**. Un deuxième exemple de résistance récessive chez les virus est celui observé pour la maladie de la Sharka causée par le virus PPV (*Plum pox potyvirus*) qui touche les arbres fruitiers du genre *Prunus*. Le gène récessif *rpv1* empêche le déplacement du virus à longue distance **(Decroocq et al., 2006)**. Dans ce cas, le phénotype de *rpv1* est associé à des variations alléliques d'une phosphoglycerate kinase du chloroplaste **(Poque et al., 2015)**.

Des gènes de résistance récessifs ont aussi été décrits pour des agents pathogènes autres que des virus. Par exemple, Mlo, une protéine transmembranaire caractérisée initialement chez l'orge, régule négativement le déclenchement de la mort cellulaire **(Boyd et al., 2013)**. Sa perte de fonction donne lieu à un gène de résistance récessif, *mlo*, utilisé depuis 30 ans chez l'orge contre le champignon *Blumeria gaminis f*. sp **(Bai et al., 2008)**. Son homologue chez le pois, *er1,* est utilisé depuis 50 ans dans des variétés de pois pour lutter contre tous les oïdiums **(Humphry et al., 2011)**. Ces gènes récessifs amènent donc une résistance non-spécifique et durable.

Dans le cadre d'une culture monovariétale, il est fréquent d'associer résistance monogénique, qualitative, spécifique, dominante, de type HR en un seul concept, induisant une résistance éphémère, et à l'inverse de regrouper les concepts de résistance polygénique, quantitative, non-spécifique et durabilité. Plusieurs contre-exemples montrent que ces regroupements ne sont pas toujours valables : *mlo,* dont la résistance est monogènique mais non-spécifique et durable ; *prv2,* dont la résistance est monogénique et durable ; le gène *Ry* de résistance au PVY chez la pomme de terre, dont la résistance est monogénique et durable **(Brigneti et al., 1997)**. La résistance aux virus est un cas particulier pour lequel le lien entre résistance monogénique dominante et résistance éphémère n'est pas valable, car la plupart des gènes connus sont considérés comme durables. Ceci s'explique par le fait que le génome des virus est très petit, avec un nombre limité de protéines qui sont souvent multifonctionnelles, ce qui fait que les gènes *Avr* correspondent toujours à des protéines impliquées dans la *fitness* avec une faible marge de mutation.

2.2.2 Déploiement des résistances et durabilité

Selon Johnson (1986), « Au sens évolutionnaire, aucune résistance ne dure éternellement », ce qui donne une idée du défi que suppose la recherche de résistances durables et incite à utiliser tous les leviers disponibles pour essayer d'optimiser la durabilité des variétés résistantes et retarder au maximum l'inévitable.

Une composante importante de la durabilité des résistances est la façon dont elles sont déployées. En effet, les stratégies de déploiement des variétés résistantes impactent beaucoup la durabilité de leur résistance **(McDonald and Linde, 2002; Sapoukhina et al., 2009)**. Par le passé, les stratégies de déploiement de variétés avec des résistances totales, généralement monogéniques, ont conduit rapidement à de nombreux contournements. Un exemple impressionnant est celui du tournesol en France **(Figure 14)**. Plusieurs variétés portant différents gènes de résistance au mildiou ont été déployées successivement. *Pl1* et *Pl2* ont été contournés en 1981, et l'utilisation exclusive des gènes *Pl16*/*Pl7* et *Pl5*/*Pl8* a conduit à l'apparition d'isolats d'agent pathogène les contournant respectivement en 2002 et 2004 **(Tourvieille de Labrouhe et al., 2005).**

Un choix stratégique dans la création de variétés résistantes est de ne pas inclure systématiquement les mêmes gènes de résistance dans chaque variété déployée sur le marché. Réaliser plusieurs combinaisons permet de réaliser des rotations de semences, des associations variétales ou des mosaïques de culture qui retireront un temps, la pression de gènes de résistance quantitatifs et qualitatifs sur la communauté des parasites.

Au niveau du terrain

En effet, une façon pertinente de garantir la durabilité d'une résistance est de l'accompagner d'une augmentation de la diversité. Certaines pratiques agricoles peuvent limiter l'apparition de contournements sur les plantes résistantes. La rotation des cultures permet d'éviter d'avoir un contact systématique dans le temps entre la plante résistante et l'agent pathogène. L'utilisation de mélanges variétaux ou d'associations variétales évite ou ralentit la dissémination de l'isolat contournant, limitant ainsi l'augmentation de sa présence dans les populations d'agent pathogène. La dissémination d'un éventuel isolat virulent pour une résistance particulière sera en effet limitée par la présence d'autres résistances pour lesquelles cet isolat sera avirulent.

Ces pratiques permettent d'éviter une augmentation trop fréquente et trop forte des isolats contournants, d'augmenter le temps et l'espace qui sépare la rencontre de la variété résistante avec un isolat virulent spécifique et de diminuer la *fitness* et ainsi le potentiel infectieux de l'isolat contournant. Ces pratiques permettent donc d'utiliser les variétés basées sur la résistance totale sans exercer une forte pression évolutive sur le parasite. Une alternance de plusieurs années sur les terrains agricoles peut même conduire à retrouver de l'efficacité dans une résistance autrefois contournée.

Au niveau de la variété : un choix raisonné de gènes de résistance à pyramider

Une autre façon de déployer les résistances qui peut conduire à une amélioration de leur durabilité est le pyramidage, c'est-à-dire, l'introduction de plusieurs gènes de résistance dans une

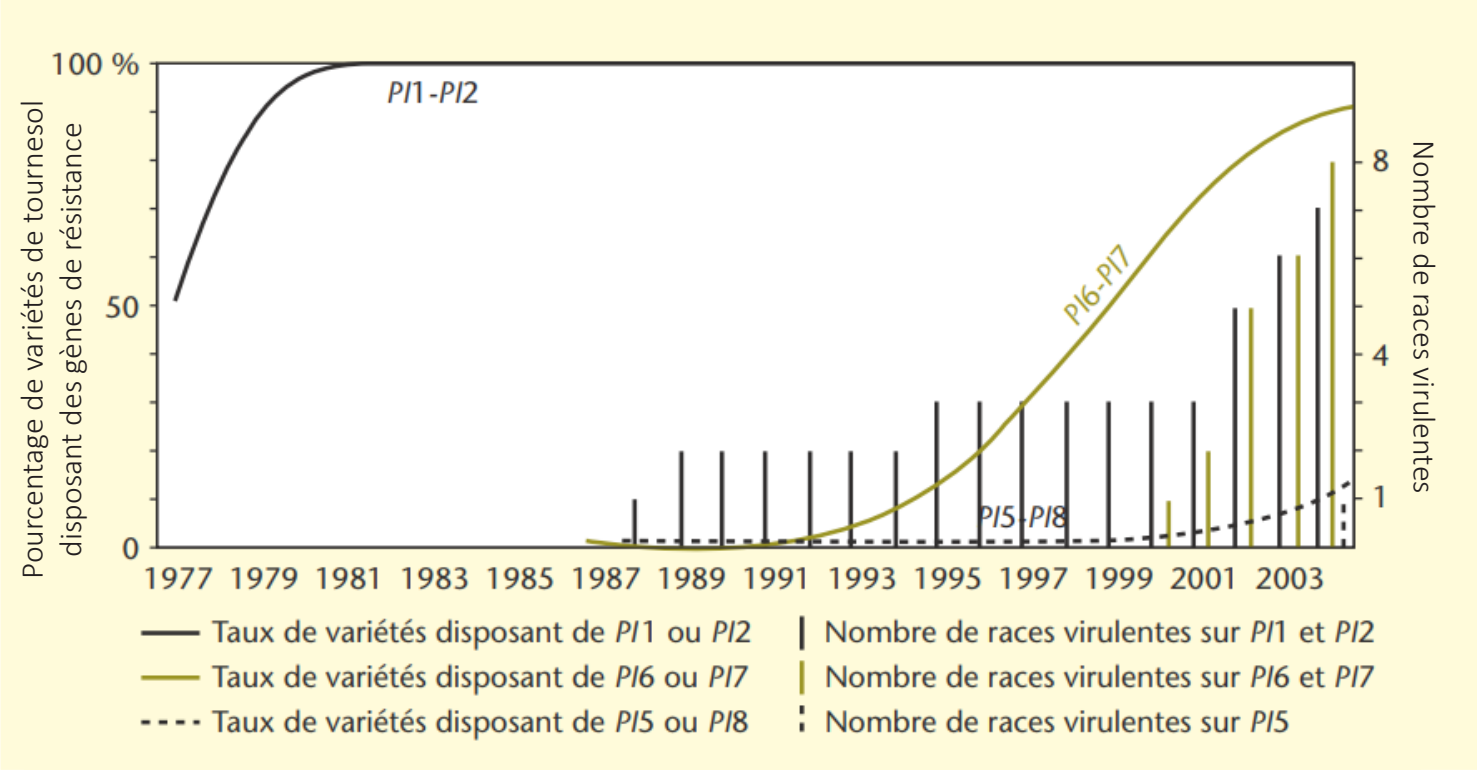


Figure 14 : Comparaison de l'évolution de l'utilisation de tournesol disposant de gènes de résistance *PI* en France avec le nombre de races virulentes de *Plasmopara halstedii* sur ces gènes entre 1977 et 2004. Extrait de (Tourvieille de Labrouhe et al., 2005).

même variété. Le choix des gènes est primordial pour garantir la réussite de cette stratégie car, comme il a été montré pour la rouille noire de l'orge, la réussite de cette approche n'est pas toujours garantie. Le pyramidage ne consiste pas donc simplement à combiner le maximum de gènes de résistance, il doit être fait en tenant compte du maximum d'informations disponibles sur les résistances utilisées. L'intérêt repose dans la diversification des mécanismes de défense ou de résistance utilisés plutôt que d'employer uniquement des gènes au spectre d'action étroit. Ainsi, la combinaison de gènes de résistance dominants et récessifs (ne ciblant pas le même facteur d'avirulence) est censée augmenter la durabilité, car la probabilité qu'un agent pathogène accumule des mutations permettant de contrer plusieurs gènes, basés sur des mécanismes différents, est faible.

L'une des approches pour éviter le contournement est de ne pas utiliser une unique source de résistance majeure mais de cumuler un (ou des) gène(s) de résistance(s) majeur(s) avec des facteurs quantitatifs (QTL). En soutien de cette approche, des travaux ont montré que la combinaison d'une résistance qualitative conférée par un gène majeur avec une résistance quantitative évite le contournement du gène majeur **(Brun et al., 2010; Palloix et al., 2009; Parlevliet, 2002)**. Concernant le choix des gènes qualitatifs à pyramider, choisir un gène de résistance de type récepteur qui est impliqué dans la détection d'une protéine de l'agent pathogène jouant un rôle important dans la *fitness* du parasite augmentera les chances de durabilité de la variété résistante.

2.3 La résistance au mildiou chez la vigne

Plusieurs espèces de vignes sauvages américaines et asiatiques sont résistantes au mildiou et peuvent être utilisées comme donneurs dans des programmes de sélection qui visent à obtenir des variétés à résistance durable tout en conservant de bonnes qualités agronomiques et organoleptiques.

2.3.1 Histoire de la sélection de vignes résistantes en France

La création d'hybrides résistants aux bioagresseurs de la vigne a commencé à la fin du XIX^{éme} siècle, très peu de temps après l'arrivée des parasites américains sur le territoire européen. Cette création s'est basée sur le croisement entre des vignes américaines (comme *V. rupestris*, *V. lincecumi* ou *V. berlandieri*) et des *V. vinifera* de qualité donnant lieu à ce qu'on appelle les hybrides producteurs directs (HPD). La création variétale a été mise en œuvre par une vingtaine de sélectionneurs durant près de 60 ans, notamment par Georges Couderc (1850-1928) et son confrère Albert Seibel (1844-1936) basés à Aubenas en Ardèche, qui ont créé plus de 15000 hybrides et ont proposé plus de 2000 cépages à la filière **(Volle et al., 2007)**.

Cependant un mécontentement des vignerons se fait entendre face à la concurrence trop élevée des hybrides bien plus producteurs que les cépages traditionnellement utilisés, et d'une

moindre qualité. Des lois sont votées en France contre l'utilisation d'hybrides **(Bouquet, 2009)** : en 1927 l'installation des hybrides est exclue des zones d'appellation, en 1935 six cépages sont interdits à la plantation en raison d'un niveau trop élevé de méthanol (les cépages Clinton, Herbemont, Isabelle, Jacquez, Noah et Othello). Vingt cépages hybrides restent inscrits au catalogue en 1955, mais ils ne sont pas classés comme « recommandés » ce qui oblige à ne les utiliser que pour la production de vin de table. Le vin de table est un terme utilisé en France pour désigner les vins standards utilisés pour la consommation courante sans indication géographique ni restriction par rapport au cépage utilisé. Ces freins aboutissent à un arrêt total du développement d'hybrides en France.

En 1974, deux chercheurs de l'INRA, Jean-Pierre Doazan et Alain Bouquet, reprennent les travaux d'hybridation. Alain Bouquet s'oriente vers l'utilisation de résistances issues de l'espèce américaine *Muscadinia rotundifolia,* qui n'avait pas été utilisée jusque-là en raison de son hybridation difficile avec *V. vinifera* due à un nombre de chromosomes diffèrent. Les résultats de ces travaux continuent à être utilisés aujourd'hui dans des programmes de sélection de l'INRA **(Montaigne et al., 2016)**. L'utilisation de variétés résistantes en viticulture est à nouveau d'actualité. En effet, aujourd'hui un engouement pour l'utilisation de ce type de matériel se fait ressentir chez certains vignerons en partie en raison de la réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires engagée par le Grenelle de l'Environnement et le plan EcoPhyto.

En dehors du territoire français, il n'y a pas eu d'arrêt des programmes de création variétale, et les travaux réalisés par les premiers sélectionneurs français ont été repris notamment en Allemagne, Russie, Italie, Suisse et Autriche. Ils ont permis la création de variétés résistantes, comme Regent, Solaris, Bianca et Bronner, aux qualités gustatives acceptables par rapport aux cépages traditionnels.

2.3.2 Gènes de résistance au mildiou identifiés chez la vigne

Les différents programmes d'amélioration pour la résistance au mildiou ont conduit à la mise en évidence de plusieurs facteurs de résistance dominants, appelés *Rpv* (*Resistance to Plasmopara viticola*). Quatorze facteurs de résistance ont été répertoriés et cartographiés à partir des années 2000, avant d'être rejoints très récemment par 12 autres, la majorité de ces derniers étant d'un effet faible **(Tableau 3)**. Les facteurs de résistance sont principalement situés sur les chromosomes 12 et 18, dans des régions riches en gènes canoniques de résistance de type NLR (*NOD-like receptors*). Le gène de résistance *Rpv1* a été le seul cloné et il s'agit d'un NLR de type TIR-NBS-LRR **(Feechan et al., 2013)**; les autres facteurs semblent correspondre à des QTL. *Rpv8* et *Rpv12* pourraient être deux formes alléliques d'un même gène. Six de ces facteurs, au niveau de résistance allant de total à partiel, sont utilisés actuellement dans des programmes de création variétale assistée par marqueurs en Europe : *Rpv1, Rpv2, Rpv3, Rpv8, Rpv10 et Rpv12* **(Tableau 3, gris)**.

Locus	Origine de la résistance	Origine géographique de la résistance	Localisation chromoso-mique	Niveau de résistance	Référence
Rpv1	*M. rotundifo*	Amérique	12	Partielle élevée	Merdinoglu et al., 2003
Rpv2	*M. rotundifolia*	Amérique	18	Totale	Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006
Rpv3	*V. rupestris*	Amérique	18	Partielle	Bellin et al., 2009 Welter et al., 2007
Rpv4	*Vitis* américain	Amérique	4	Partielle faible	Welter et al., 2007
Rpv5	*V. riparia*	Amérique	9	Partielle faible	Marguerit et al.,2009
Rpv6	*V. riparia*	Amérique	12	Partielle faible	Marguerit et al.,2009
Rpv7	*Vitis* américain	Amérique	7	Partielle faible	Bellin et al., 2009
Rpv8	*V. amurensis*	Amérique	14	Partielle élevée	Blasi et al., 2011
Rpv9	*V. riparia*	Amérique	7	Partielle faible	Moreira et al., 2011
Rpv10	*V. amurensis*	Asie	9	Partielle élevée	Schwander et al., 2011
Rpv11	*Vitis* américain	Amérique	5	Partielle faible	Fisher et al., 2004
Rpv12	*V. amurensis*	Asie	14	Partielle élevée	Venuti et al., 2013
Rpv13	*V. riparia*	Amérique	12	Partielle faible	Moreira et al., 2011
Rpv14	*V. cinerea*	Amérique	5	nd	Ochssner et al., 2016
Rpv15	*V. piasezkii*	Asie	18	nc	Pap et al. (en preparation)
Rpv16	nc		nc	nc	Pap et al. (en preparation)
Rpv17	*V. rupestris*	Amérique	8	nc	Divilov et al., 2018
Rpv18	*V. rupestris*	Amérique	11	nc	Divilov et al., 2018
Rpv19	*V. rupestris*	Amérique	14	nc	Divilov et al., 2018
Rpv20	nc		6	nc	Divilov et al., 2018
Rpv21	nc		7	nc	Divilov et al., 2018
Rpv22	nc		nc	nc	Jiang et al. (en préparation)
Rpv23	nc		nc	nc	Jiang et al. (en préparation)
Rpv24	nc		nc	nc	Jiang et al. (en préparation)
Rpv25	*V. amurensis*	Asie	15	nc	Lin et al., 2019
Rpv26	*V. amurensis*	Asie	15	nc	Lin et al., 2019

Tableau 3 : Facteurs de résistance au mildiou de la vigne identifiés. En gris, les facteurs utilisés dans les programmes de sélection européens ou INRA. nd, non déterminé; nc, non communiqué. Tableau adapté de (Merdinoglu et al., 2018) et des données VIVC (http://www.vivc.de/docs/dataonbreeding/20181001_Table%20of%20Loci%20for%20Traits%20in%20Grapevine.pdf)

2.3.3 Contournement de résistances monogéniques recensés pour *P. viticola*

Les risques de contournement des résistances chez la vigne sont d'autant plus forts que la culture est pérenne. Les vignes sont censées rester sur un terrain pendant des décennies. Des cas de contournements du QTL *Rpv3* présent chez les cépages Regent et Bianca ont été observés à différents endroits.

Bianca est une variété hybride de Hongrie issue de Villard blanc, une obtention de Seyve-Villard, elle-même obtenue grâce à des croisements interspécifiques impliquant des cépages de *V. vinifera* sensibles et les vignes résistantes *V. labrusca, V. rupestris, V. berlandieri* et *V. lincecumii* **(Di Gaspero et al., 2002).** La résistance est conférée par le gène majeur *Rvp3,* qui provoque une réduction de l'infection de *P. viticola* ainsi que l'apparition d'une réponse hypersensible associée à la sporulation **(Bellin et al., 2009)**. En 2005, un important développement de mildiou sur ce cépage a été observé dans une station expérimentale de Lednice, en République tchèque. Un isolat a été prélevé et son comportement a été comparé à ceux de souches française (Colmar) et italienne (Udine), toutes les deux recueillies sur la vigne sensible *V. vinifera* cv. Chardonnay. Il apparait que Bianca n'est plus capable de diminuer le niveau de sporulation ni d'induire la HR en présence de l'isolat de *P. viticola* issu de Lednice, montrant que sa résistance est bien contournée **(Peressotti et al., 2010)** **(Figure 15)**. Des observations similaires ont été faites pour la variété Regent avec des isolats provenant de France ou de Hongrie, montrant que *Rpv3* est contourné par certains isolats de mildiou **(Delmotte et al., 2014)**.

2.3.4 Création de variétés à résistance durable chez la vigne

Méthodes et techniques de création de variétés de vigne résistantes

Il existe deux grandes méthodes d'amélioration du niveau de résistance dans les vignobles. La première est la sélection clonale, elle se résume simplement par l'utilisation des mutations apparues dans les populations de vigne qui s'observe par une résistance augmentée en période d'épidémie faible à moyenne. Ces vignes sont alors multipliées par simple bouturage, ce qui a permis à certains cépages de traverser le temps sans que le génome ne soit fortement changé. La seconde méthode se base sur le croisement de vignes d'intérêt : le pollen est récolté chez le père et déposé sur le pistil de l'individu maternel à l'aide d'un pinceau. Une sélection est ensuite nécessaire pour identifier les individus d'intérêt au sein de la population obtenue. En théorie, il existe une troisième méthode qui consiste en la génération d'individus génétiquement modifiés en mutant les gènes par l'utilisation de biotechnologies. Cette dernière méthode n'est pas utilisée chez la vigne en raison des difficultés à

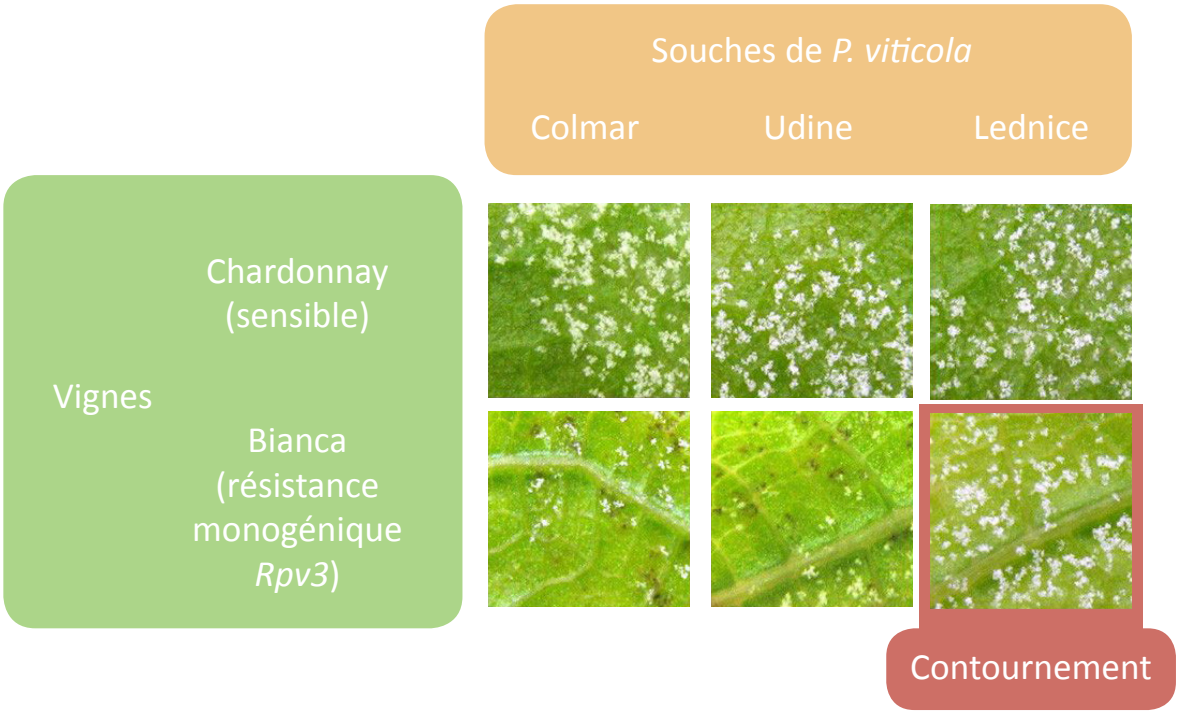


Figure 15 : L'isolat Lednice contourne la résistance conférée par le gène *Rpv3* de Bianca. Les isolats Lednice (République Tchèque), Colmar (France) et Udine (Italie) sont inoculés sur des disques de feuilles de vigne de l'hybride résistant Bianca et du cultivar sensible *V. vinifera* cv. Chardonnay. Les photographies ont été réalisées à 6 jpi (jours post-infection). Une réponse hypersensible et une diminution de la sporulation sont observées sur les disques de Bianca après inoculation des souches Colmar et Udine, témoignant de l'efficacité de *Rpv3*. Résultats extraits de (Peressotti et al., 2010).

créer ce type de matériel, et surtout du fait de la faible acceptation actuelle des plantes transgéniques et des coûts associés à leur mise sur le marché.

La méthode de sélection traditionnelle est phénotypique, c'est-à-dire que les pépins obtenus par croisement sont tous mis à germer et un test phytopathologique est réalisé dès la sortie des cotylédons par pulvérisation de suspensions de spores. Ce procédé est réalisé à chaque étape de sélection impliquant un nouveau croisement. Il s'agit d'un travail gigantesque en termes de temps et de moyens financiers et matériels. Le développement de la technique de sélection assistée par marqueurs (SAM) a contribué à enlever de nombreux freins et à gagner environ 10 ans par rapport à la méthode traditionnelle. En effet, la SAM permet non seulement de cibler des plantes portant les facteurs de résistance, réduisant ainsi le nombre d'individus à phénotyper, mais aussi d'identifier les régions propres aux parents sensibles qui seront à conserver car porteuses des bonnes qualités agronomiques et organoleptiques.

L'apport de la SAM est d'autant plus important que pour éliminer la plupart des composantes génétiques non souhaitées du parent résistant il est nécessaire de réaliser quatre à six rétrocroisements avec des cépages traditionnels **(Figure 16).** Ces derniers doivent systématiquement être différents pour éviter les risques liés à la dépression de consanguinité. Les rétrocroisements permettent d'aboutir à des individus avec moins de 2% de génome du parent américain ou asiatique. L'introgression doit prendre en compte la productivité et la qualité organoleptique du vin. Ce dernier caractère est un critère primordial dans la viticulture par rapport à d'autres cultures qui se basent en grande partie sur l'apport nutritionnel des fruits ou des grains.

L'étape finale avant l'utilisation d'une nouvelle variété en viticulture est son inscription au catalogue. En effet, toute nouvelle variété créée nécessite d'être inscrite au catalogue national par le CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection), instance publique sous la tutelle du ministère de l'Agriculture, pour être autorisée à la culture en France. Lors de cette inscription, un classement permet d'obtenir l'autorisation de plantation à des fins de production de vin (Sources : GEVES et FranceAgriMer). Pour parvenir à l'inscription, la variété doit montrer sa nouveauté par le biais d'une étude VATE (Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale) qui pour les variétés de vigne se fait *via* un réseau national où le potentiel viticole et œnologique de la nouvelle variété est évalué sur plusieurs années.

Création de variétés de vigne à résistance durable en France : le programme ResDur

Au vu de la capacité de contournement de la résistance conférée par *Rpv3* par la souche Lednice, il devient primordial de construire des résistances durables chez la vigne. La vigne étant une

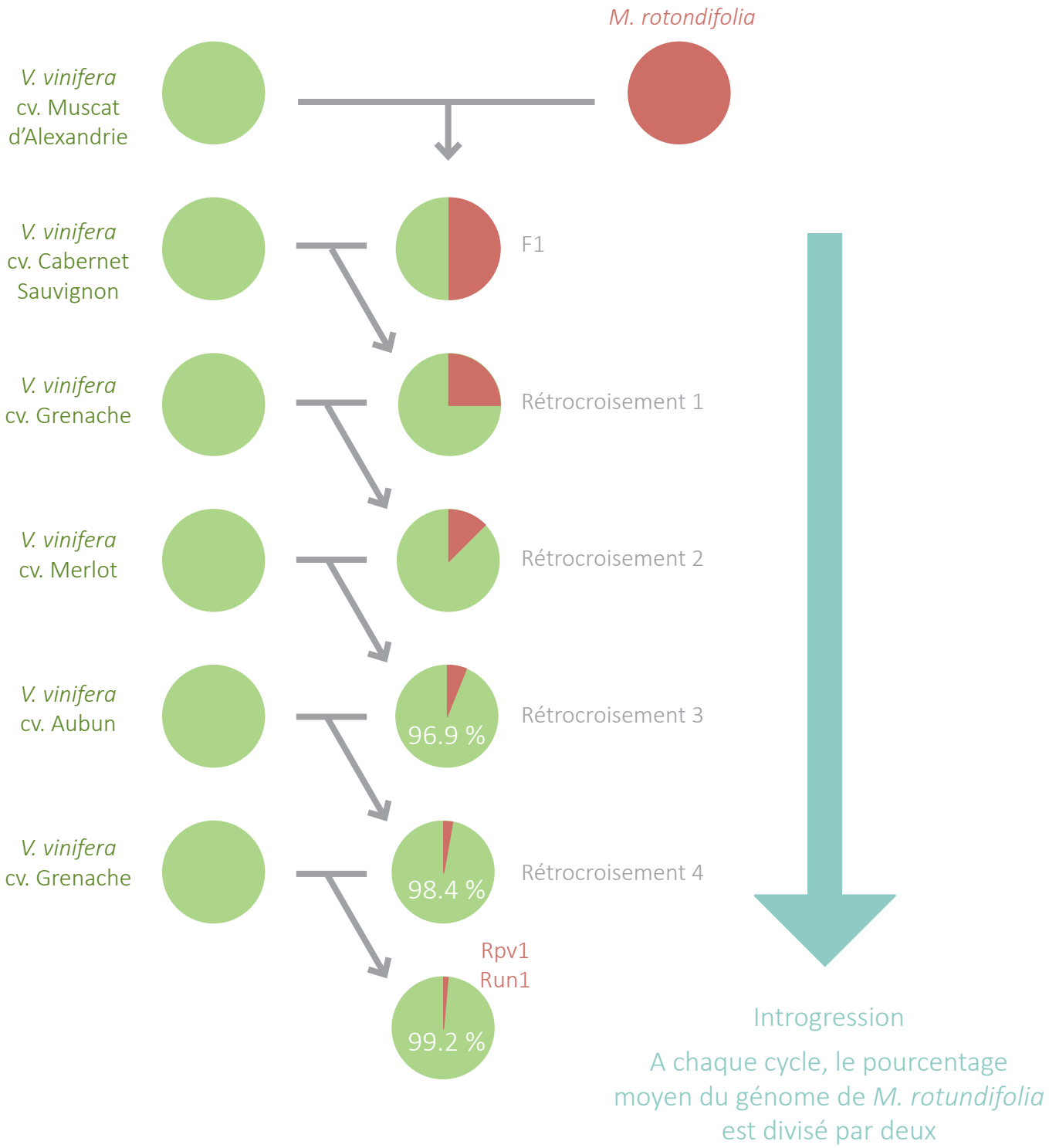


Figure 16 : Introgression de résistance par rétrocroisements successifs. Ces croisements ont généré un individu à la resistance monogénique porteur de *Rpv1* et *Run1* qui a été utilisé dans le programme ResDur. Réalisé à partir des données de (Schneider et al., 2014) et (Bouquet et al., 2000);

plante pérenne, il est compliqué de déployer les résistances en faisant appel aux mélanges culturaux ou aux alternances temporelles des génotypes. Le principal levier à travailler est donc le pyramidage de facteurs de résistance. Néanmoins, il est tout de même nécessaire de déployer les génotypes portant plusieurs résistances avec prudence dans le paysage viticole.

Depuis les années 2000, les programmes de sélection viticole visent à créer des variétés de raisin de cuve à résistante durable *via* une approche par pyramidage, en cumulant plusieurs sources de résistance à la fois au mildiou et à l'oïdium. Les deux maladies cryptogamiques s'inscrivent facilement ensemble dans les programmes de sélection car les QTL de résistance se trouvent souvent très proches sur le génome. Par exemple, les facteurs de résistance *Run1* (*Resistance to* Uncinula necator *1*) et *Rpv1* qui ségrégent ensemble, sont associés à une région génique réduite à 1 Mpb **(Dry et al., 2010)**.

Le but du programme ResDur (une collaboration entre l'INRA, l'IFV et des partenaires régionaux) est de présenter à l'inscription une gamme de vignes à résistance durable, diversifiées et adaptées aux vignobles français, tout en atteignant un très bon niveau de qualité du vin.

Pour cela, une variété à résistance monogénique obtenue par le Pr Alain Bouquet porteuse des gènes de résistance au mildiou, *Rpv1*, et à l'oïdium, *Run1*, issus de *M. rotundifolia* a été croisée avec la variété allemande Regent, portant les gènes *Rpv3* et *Ren3*. Ce croisement a permis d'obtenir une première gamme de variétés polygéniques (ResDur 1). Pour diversifier l'offre variétale et les facteurs de résistance, d'autres variétés ont été obtenues de la même manière en faisant appel à des hybrides dérivés de vignes résistantes asiatiques (ResDur 2 et ResDur 3). Il s'agit d'un programme qui reprend près de cinquante ans de travaux.

Ce programme a permis de présenter :

- Des gammes polygéniques à deux résistances (ResDur 1 et 2).

ResDur 1, qui regroupe *Rpv1* et *Rpv3* (ainsi que *Run1* et *Ren3*) et a amené à l'inscription et au classement au catalogue en 2018 de 4 variétés, deux à baies rouges, Vidoc et Artaban, et deux blancs, Floreal et Voltis.

ResDur 2, qui regroupe *Rpv1, Rpv10, Run1 et Run3.2*, proposera 25 variétés à l'inscription à partir de 2021

- Des gammes polygéniques à trois résistances (Resdur3) qui proposera 20 à 40 variétés à partir de 2024. Concernant le mildiou, elles regrouperont les gènes *Rpv1*, *Rpv3* et *Rpv10*.

Ces variétés permettent de limiter drastiquement la quantité de fongicide utilisé contre le mildiou et l'oïdium. Il est tout de même conseillé de réaliser un ou deux traitements dans le vignoble pour maintenir une pression sur les communautés de *P. viticola* et *E. necator,* de façon à limiter le

risque d'apparition d'un quelconque contournement. Par ailleurs, l'arrêt total de l'utilisation de fongicide sur les quatre nouvelles variétés inscrites au catalogue n'est pas possible en raison de la conservation d'une sensibilité au black rot. Cependant, passer d'une moyenne de 13 traitements par an à seulement un ou deux est un gain indéniable.

3. Le dialogue entre les gènes de résistance et les effecteurs

Pour utiliser efficacement les gènes de résistance, il est important de connaître les bases moléculaires des interactions plante/agent pathogène. L'interaction entre un microorganisme et une plante est gouvernée par un dialogue moléculaire entre les deux organismes qui parfois se met en place avant le contact physique. En effet les organismes parasites, mutualistes ou commensaux détectent des exsudats végétaux à proximité des racines et des composés volatiles à proximité des fleurs et des feuilles. Par exemple, la bactérie tellurique parasite *Agrobacterium tumefaciens* reconnaît des composés phénoliques produits par les blessures racinaires et s'y dirige par chimiotactisme.

3.1 Perception de l'agent pathogène et réponses végétales

3.1.1 MAMPs, PAMPs et DAMPs

Les plantes possèdent une immunité innée semblable à celle des mammifères **(Claverie et al., 2016)** et sont capables de détecter les microorganismes grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) sur la membrane plasmique **(Boutrot and Zipfel, 2017; Couto and Zipfel, 2016) (Figure 17).** Parmi ces récepteurs il existe les récepteurs de type kinase RLK (*Receptor-Like Kinases*) et les protéines de type RLP (*Receptor-Like Protein*). La plupart des membres de ces deux familles possèdent un domaine extracellulaire riche en répétitions de leucine **(Boller and Felix, 2009; Liu et al., 2018a)**. La reconnaissance peut être directe, *via* la reconnaissance de motifs microbiens (MAMP, *Microbe-Associated Molecular Pattern ;* aussi nommés PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Pattern)* ou indirecte, *via* la détection de molécules libérées par les lésions tissulaires et cellulaires de l'hôte (DAMP, *Danger-Associated Molecular Pattern).* Cette réponse immunitaire s'appelle de façon générale PTI (*PAMP-triggered immunity*) **(Boller and Felix, 2009; Jones and Dangl, 2006).** Par un souci de clarté, seul le terme PAMP sera utilisé dans la suite du manuscrit.

3.1.2 La signalisation cellulaire

Le domaine intracellulaire kinase des RLK, ou le domaine kinase des corécepteurs associés (SOBIR, SERK23, BAK1) aux récepteurs RLK et RLP, active un signal moléculaire dans le cytoplasme **(Fischer et al., 2016; Dufayard et al., 2017; van der Burgh et al., 2018)** qui est amplifié par des phénomènes d'autophosphorylation et transphosphorylation entre récepteurs **(Macho and Zipfel, 2014)**.

Ce signal comporte une série d'évènements, qui sont décrits sur la **(Figure 18)**. Un influx de calcium (Ca^{2+}) du milieu extracellulaire au cytoplasme a lieu 30 secondes à 2 minutes après détection

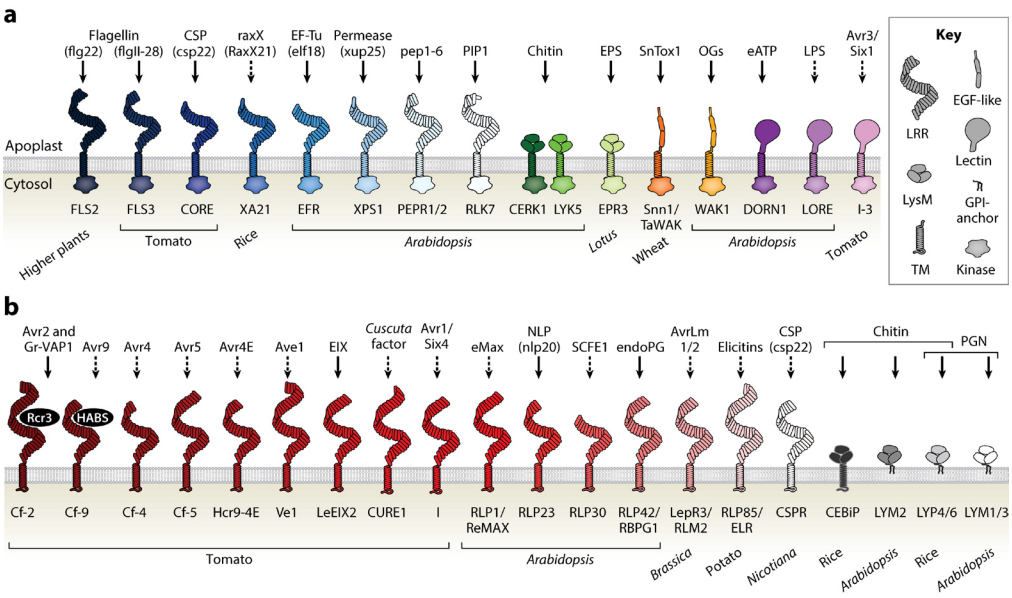


Figure 17 : Diversité structurelle des PRR. (A) Les récepteurs kinase RLK et **(B)** les récepteurs de type RLP. Leurs ligands caractérisés dans la littérature sont indiqués. LRR, *leucine-rich repeat*; TM, trans-membranaire; Extrait de (Boutrot and Zipfel, 2017).

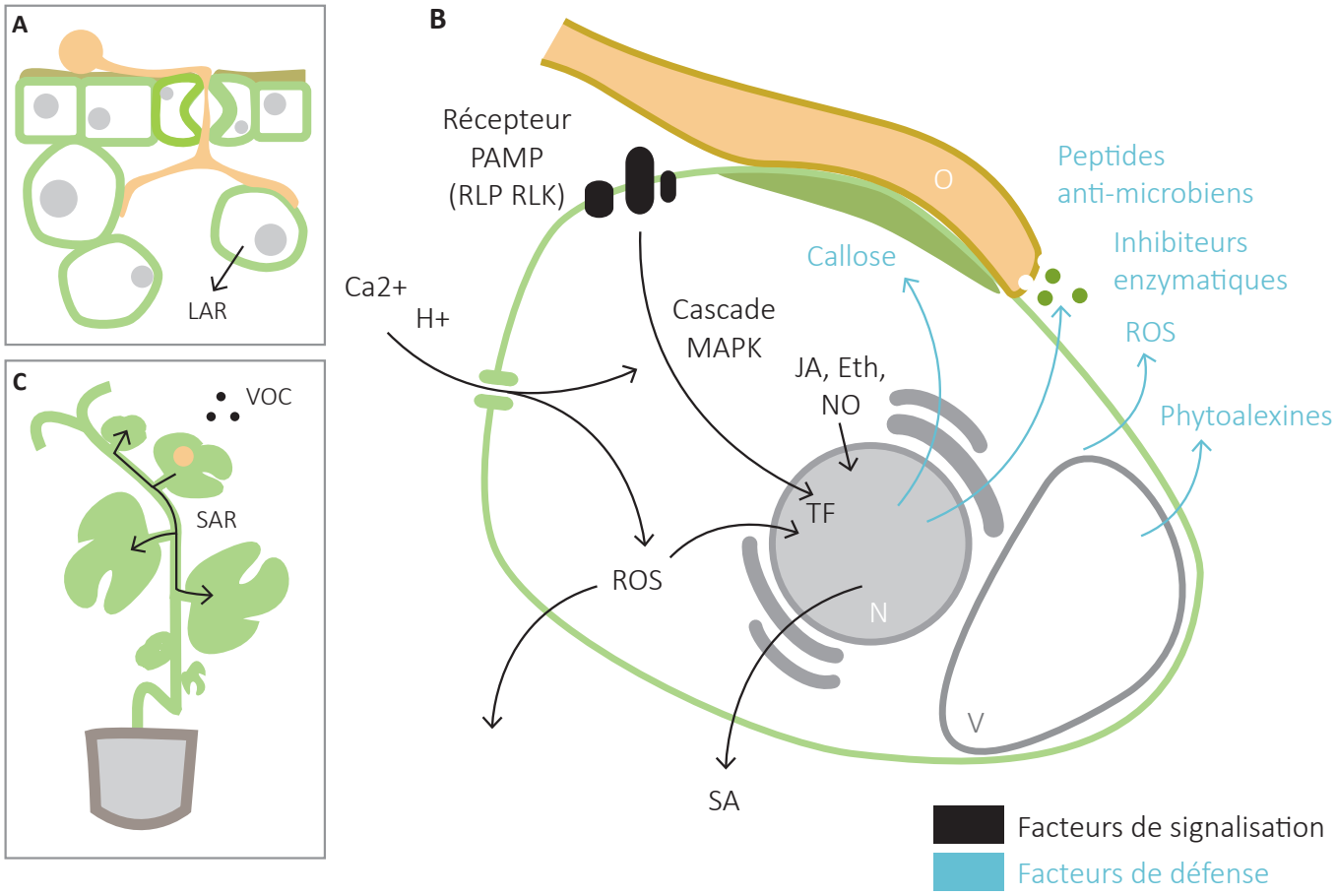


Figure 18 : Représentation schématique de la mise en place de la PTI. Les cellules en contact avec l'oomycète (orange) détectent des motifs spécifiques par des récepteurs de type RLK et RLP, ce qui active des facteurs de signalisation (en noir) dans la cellule **(B)**, dans le tissus **(A)** et dans l'ensemble de la plante **(C)**. Ces facteurs activent les mécanismes de défense (bleu). Les VOC sécrétés, généralement des terpènes, peuvent être détectées par d'autres plantes et augmentent le niveau de résistance. N, noyau; O, oomycète; V, vacuole; TF, facteur de transcription; SAR, résistance systèmique acquise; LAR, résistance localisée acquise, JA, acide jasmonique; Eth, éthylène; SA, acide salicylique; ROS, espèces réactives de l'oxygène; VOC, composés volatiles.

du PAMP, provocant l'ouverture des canaux ioniques de sodium, potassium, chlorure et nitrate, ce qui donne lieu à l'alcalinisation du milieu extracellulaire et à la dépolarisation de la membrane **(Ranf et al., 2011; Bigeard et al., 2015)**. Ceci induit un pic de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), *via* des NADPH oxydases de la membrane plasmique et des peroxydases des organites (peroxysomes, mitochondries), détectable une première fois 2 à 3 minutes après reconnaissance par le PAMP et une deuxième fois, avec plus d'intensité, 15 minutes plus tard. Les ROS jouent de multiples rôles, tant à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur : dans l'apoplasme, ils ont un effet antimicrobien direct et leur diffusion permet aussi d'alerter les cellules environnantes qui n'ont pas encore détecté la présence de l'agent pathogène ; au niveau intracellulaire, ils amplifient le signal en activant la production de monoxyde de nitrogène (NO), un deuxième pic de Ca^{2+}, et la phosphorylation des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases)* déjà activées auparavant par le domaine kinase des récepteurs PRR **(Ranf et al., 2011; Noirot et al., 2014).** La cascade MAPK et les ROS conduisent à la production de phytohormones liées à la défense : l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (Eth) **(Marchive et al., 2013; Guerreiro et al., 2016; Figueiredo et al., 2017)**.

La signalisation ne s'arrête pas aux tissus en contact avec l'agent pathogène, mais elle se propage dans les tissus adjacents (LAR, *Localized Acquired Resistance*) et dans le reste de la plante par l'intermédiaire du SA. C'est ce que l'on appelle la résistance systémique acquise (SAR, *Systemic Acquired Resistance*) qui est contrôlée par le gène NPR1 **(Gaffney et al., 1993; Durrant and Dong, 2004; Le Henanff et al., 2009)**. La SAR active la sécrétion de peptides antimicrobiens, l'expression de gènes de défense ainsi qu'une mémoire épigénétique permise par la méthylation des histones qui rend inaccessible des régions cibles du génome. Ce transport du signal et la mise en alerte ne s'arrête pas au simple individu. Chez la vigne, il a été montré que des composés volatils (VOC) comme les sesquiterpènes **(Chalal et al., 2015)** permettent la communication entre plantes et confèrent une protection contre *P. viticola* des plantes qui n'ont pas été en contact avec l'agent pathogène **(Lazazzara et al., 2018)**.

3.1.3 Les réponses de défense végétales

Après une amplification importante du signal de danger, l'information parvenue au noyau conduit à une reprogrammation du transcriptome qui permet la production de protéines PR (*Pathogenesis-Related*). Actuellement, 17 familles de protéines PR, dont les fonctions sont très diverses voire inconnues pour certaines d'entre elles, comme PR17, ont été décrites **(Van Loon et al., 2006; Sels et al., 2008; Breen et al., 2017; Ma et al., 2018).** Certaines protéines PR sont des hydrolases qui exercent leur fonction directement contre l'agent pathogène : PR3, PR4, PR8 et PR11 sont des chitinases et permettent une dégradation de la chitine présente dans les parois des champignons ; PR2

est une glucanase qui vise les β-glucanes présents dans la paroi des oomycètes. D'autres protéines PR vont inhiber les protéases sécrétées par le parasite (PR6) ou produire des ROS antifongique (PR9). Chez la vigne, plusieurs protéines PR s'accumulent dans les baies de raisin (PR3, PR4, PR5, PR8, PR11) après contact avec *P. viticola*, ce qui peut nuire à la qualité du vin **(Waters et al., 2005)**. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de PR10.1 limite la propagation foliaire de *P. viticola* **(Ma et al., 2018; Su et al., 2018)**.

La reprogrammation de l'expression génique s'accompagne d'un renforcement de la paroi cellulaire en contact avec l'agent pathogène pour prévenir et limiter la propagation de ce dernier **(Diez-Navajas et al., 2008; Malinovsky et al., 2014)**. Dans ce but, un dépôt de callose et de composés phénoliques comme la lignine, acheminés *via* les mécanismes de transport extracellulaire, est visible dès 16h après l'activation des PRR **(Meyer et al., 2009a).** Les plantes élaborent et sécrètent également des phytoalexines, des composés aromatiques antimicrobiens **(Jeandet et al., 2002).** Leur accumulation semble dépendre des phytohormones et de la cascade MAPK **(Dubrovina and Kiselev, 2017; Jiao et al., 2017; Tisserant et al., 2016; Wang et al., 2018a)**. Chez la vigne, ce sont principalement des stylbènes **(Bavaresco and Fregoni, 2001)**, des polyphénols dérivés du trans-resvératrol **(Schnee et al., 2008; Chong et al., 2009; Hurtado-Gaitán et al., 2017)** dont la production serait plus ou moins marquée selon le niveau de résistance à *P. viticola* **(Duan et al., 2015)**. Les terpènes volatiles font aussi partie des phytoalexines et, comme mentionné plus tôt, ont un impact dans la résistance à *P. viticola* **(Chalal et al., 2015)**. L'implication de sesquiterpènes volatiles en réponse au stress biotique n'a pas été observée que chez la vigne. Par exemple, le β-caryophyllène, un sesquiterpène, contribue à la restriction de la colonisation de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 chez *Arabidopsis thaliana* **(Huang et al., 2012)**.

Si ces premières réponses végétales ne permettent pas de limiter rapidement l'infection du parasite, les plantes sacrifient les cellules contaminées. Cette mort cellulaire programmée (PCD, *Programmed Cell Death*) particulière est appelée réponse hypersensible (HR, *Hypersensitive Response*) **(Van Doorn et al., 2011)**. À la différence des cellules animales, où des marqueurs phénotypiques et moléculaires permettent de distinguer les types de PCD (apoptose, nécrose, autophagie, mort mitotique) **(Galluzzi et al., 2018)**, les différencier dans le règne végétale est plus difficile, même si les protéases et les ROS sont les acteurs majeurs de la mort cellulaire dans les deux règnes **(Bae et al., 2013; Salvesen et al., 2016)**. **Van Doorn et al. (2011)** ont distingué deux types de mort cellulaire au niveau phénotypique chez les plantes : la mort de type vacuolaire et la mort de type nécrotique. Dans le premier cas, le volume de vacuole lytique augmente au moment de la libération de ROS et d'hydrolases vacuolaires (nucléase, protéase, lipases, ...). Dans le second cas, le volume de la vacuole reste inchangé, les ROS et les hydrolases proviennent des mitochondries et la membrane plasmique

collapse. La HR reprend des caractéristiques des deux types de mort cellulaire décrits par **Van Doorn et al. (2011) :** il y a une augmentation du volume vacuolaire, les ROS et les hydrolases proviennent également des mitochondries et des chloroplastes **(Sabater and Martín, 2013)**. Certains gènes marqueurs exprimés au cours de la HR ont été décrits chez le modèle *Nicotiana benthamiana* : HSR515, HMHR et HSR203J **(Marco et al., 1990; Pontier et al., 1994)**. Un homologue de ce dernier a été identifié chez la vigne et est utilisé comme marqueur **(Bezier, 2002; Chong et al., 2014; Ramírez-Suero et al., 2014).**

3.2 Contre-attaques : les effecteurs

Les agents pathogènes ne restent pas inactifs face aux défenses végétales, ils essaient de les contourner en secrétant de petites protéines capables de moduler les processus cellulaires de l'hôte à son avantage. Ces protéines sont appelées effecteurs et elles sont principalement connues pour leur capacité à bloquer l'immunité végétale et ainsi assurer le succès de l'infection **(Koeck et al., 2011; Deslandes and Rivas, 2012; Bozkurt et al., 2012)**. Des structures spécialisées pour la sécrétion d'effecteurs dans le cytoplasme des cellules végétales ont été décrites chez différents pathogènes : les nématodes secrètent leurs effecteurs à l'aide d'un stylet rétractile relié aux glandes salivaires **(Rehman et al., 2016)** et les bactéries (Gram -) utilisent leur système de sécrétion de type III **(Griswold et al., 2018)** pour les injecter directement dans le cytoplasme. Chez les oomycètes et les champignons, l'interaction avec la cellule végétale se fait chez la plupart des espèces par le biais d'une structure spécialisée appelée haustorium.

3.2.1 L'interface d'échange : l'haustorium

La fonction initiale attribuée à l'haustorium est d'être le site nourricier des agents pathogènes, mais il leur permet également de sécréter des effecteurs et de bloquer la PTI. Avant la formation de l'haustorium, une matrice extrahaustoriale se forme au-dessus de la paroi. Il s'agit d'une accumulation dense d'un mélange amorphe de polysaccharides complexés et d'autres macromolécules **(Enkerli et al., 1997)**. La paroi végétale en dessous se dégrade, et l'hyphe peut s'invaginer dans la membrane plasmique végétale sans créer de rupture **(Figure 19)**. La membrane végétale se différencie alors en EHM (Membrane extra-haustoriale) potentiellement *via* une reprogrammation du trafic vésiculaire de la cellule hôte **(Lu et al., 2012)**. En effet des protéines de la membrane en sont exclues et présentent de nombreux PRR **(Koh et al., 2005)**. À partir de ce moment, les réseaux du cytosquelette ainsi que des organites intracellulaires (mitochondrie, chloroplaste) se réagencent pour se concentrer autour de l'haustorium **(Caillaud et al., 2012; Takemoto et al., 2003)**.

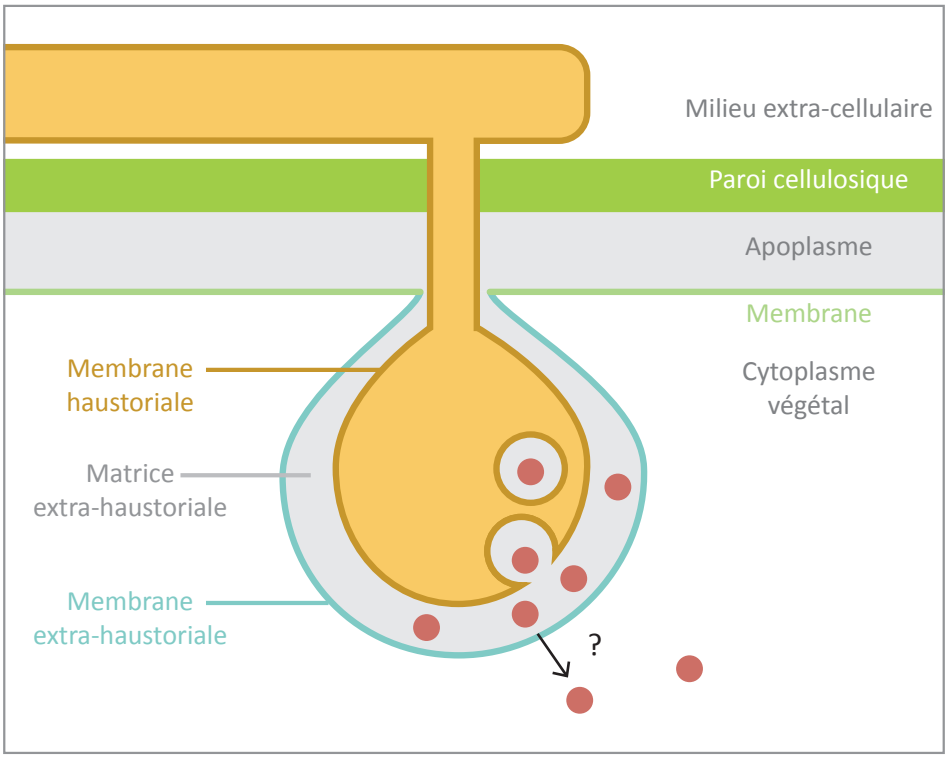


Figure 19 : Sécrétion des effecteurs dans l'apoplasme et le cytoplasme de la cellule hôte infectée. L'oomycète (orange) développe un haustorium à travers la paroi cellulosique (trait vert épais) et invagine la membrane plasmique (trait vert fin). Celle-ci se différentie en membrane extra-haustoriale (bleu). Certains effecteurs sont sécrétés dans la matrice extra-haustoriale (gris), ce sont les effecteurs apoplastiques, tandis que d'autres sont transloqués dans le cytoplasme (blanc).

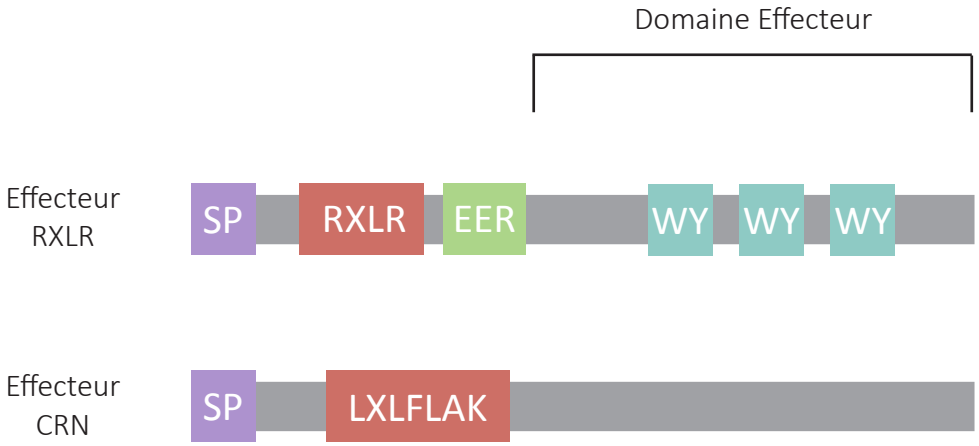


Figure 20 : Structure protéique des effecteurs cytoplasmiques de type RXLR et CRN.

3.2.2 Les grandes familles d'effecteurs des oomycètes

Les centaines d'effecteurs sécrétés par les oomycètes peuvent être classifiés en deux groupes : apoplastiques et cytoplasmiques. Les effecteurs apoplastiques restent dans l'espace apoplastique, ou ciblent et inhibent les enzymes de dégradation sécrétées par la plante, comme les glucanases ou les protéases **(Schornack et al., 2009)**, alors que les effecteurs cytoplasmiques sont internalisés dans la cellule hôte **(Asai and Shirasu, 2015)**.

Le séquençage du génome de plusieurs oomycètes **(Tyler et al., 2006; Haas et al., 2009; Baxter et al., 2010)** a permis d'identifier deux grandes familles d'effecteurs cytoplasmiques : les Crinklers (CRN, *CRinkling and Necrosis inducing protein*) et les effecteurs RXLR. Ils sont reconnaissables par la présence d'un motif au niveau du domaine N-terminal de leur séquence peptidique juste après le peptide signal (ou peptide de sécrétion) : le motif LXLFLAK pour les CRN et le motif RXLR-dEER pour la famille du même nom **(Figure 20)** **(Morgan and Kamoun, 2007; Schornack et al., 2010).** Les effecteurs RXLR sont la famille la mieux étudiée chez les oomycètes. La détermination de la structure cristallographique de plusieurs RXLR a conduit à la mise en évidence d'un motif structurel nommé le WY-domain **(Boutemy et al., 2011)**. Le motif RXLR rappelle le motif PEXEL, motif de *Plasmodium falciparum* responsable de la sécrétion protéique, au point que ces motifs sont interchangeables **(Bhattacharjee et al., 2006)**. De nombreuses expérimentations ont montrées que les motifs RXLR sont nécessaires à la translocation cytoplasmique **(Dou et al., 2008; Whisson et al., 2007; Schornack et al., 2010; Lo Presti and Kahmann, 2017),** mais les mécanismes qui régissent cette translocation sont encore mal connus **(Petre and Kamoun, 2014; Kale and Tyler, 2011)**. Une récente découverte remet en question les modèles proposés jusqu'à maintenant car elle suggère que le motif RXLR serait impliqué dans la sortie de l'effecteur de l'agent pathogène et non pas dans son internalisation dans la cellule végétale **(Hofmann, 2017; Wawra et al., 2017).** Une fois dans la cellule, les effecteurs RXLR ciblent différents compartiments cellulaires où ils peuvent interférer avec différents processus cellulaires impliqués dans la défense **(Caillaud et al., 2012).**

3.2.3 La suppression de l'immunité végétale par les effecteurs

La suppression des défenses de la plante par les effecteurs peut prendre de nombreuses formes et cibler différentes étapes de la PTI. Les mécanismes moléculaires de cette suppression sont bien connus chez les bactéries phytopathogènes **(Toruño et al., 2016)**. Le modèle bactérien a été le premier étudié en phytopatologie à une échelle moléculaire. Ainsi le premier effecteur identifié provient de *P. syringae* **(Staskawicz et al., 1984)**. Les mécanismes d'action précis qui interviennent dans la suppression des défenses par les effecteurs des oomycètes sont encore peu connus aujourd'hui **(Fawke et al., 2015)**.

Inhibition de la signalisation cellulaire du danger

Différentes étapes de la signalisation cellulaire peuvent être ciblées par les effecteurs des oomycètes.

Suite à la détection des agents pathogènes par les PRRs, les récepteurs sont parfois internalisés avec le PAMP, ce qui accentue le signal d'alerte dans la cellule. L'effecteur Avr3a de *P. infestans,* agent responsable du mildiou de la pomme de terre, semble capable de bloquer cette internalisation en interagissant avec une GTPase, la protéine 2 liée à la dynamine (DRP2), et interférant avec l'endocytose **(Chaparro-Garcia et al., 2015).** Au travers de cette activité, Avr3a empêche la signalisation de la détection du PAMP bactérien FLG22 par le PRR FLS2.

La cascade des MAPK peut également être ciblée par les effecteurs. C'est le cas de PexRD2, un effecteur de *P. infestans* qui interagit avec la MAPKKKε dans le cytoplasme, ce qui bloque la HR et favorise l'infection par l'oomycète chez *N. benthamiana* **(King et al., 2014).**

Une autre cible potentielle est la production de ROS, un élément majeur de la signalisation et de la défense végétale. PsCRN63 est un effecteur de la famille des CRN de *P. sojae* dont l'expression induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'induction de CATALASE1. Un deuxième CRN de *P. sojae*, PsCRN115, a été montré comme étant capable de bloquer cette accumulation d'H_2O_2 **(Zhang et al., 2015)**.

Finalement, les voies hormonales sont une autre cible potentielle impliquée dans la signalisation cellulaire. Pslsc1 est un effecteur de *P. sojae* qui est capable de perturber la voie du SA. Il hydrolyse l'isochorismate, précurseur directe du SA, ce qui supprime l'accumulation de l'hormone, inhibe les mécanismes de défense et augmente le pouvoir infectieux de *P. sojae* **(Liu et al., 2014)**.

Interférence avec la prise en charge nucléaire de la réponse végétale

L'activation des défenses de la plante conduit à des évènements impliquant le noyau, comme la reprogrammation du transcriptome *via* l'activation de facteurs de transcription spécifiques, la régulation transcriptionnelle par des mécanismes épigénétiques, ou la dégradation des ARNs par des mécanismes dits de *gene silencing*. Plusieurs exemples d'effecteurs ciblant ces étapes sont décrits dans la littérature.

McLellan et al. (2013) ont mis en évidence, chez la pomme de terre, un effecteur de *P. infestans*, Pi03192, capable de bloquer, au niveau du réticulum endoplasmique, un facteur de transcription de type NAC impliqué dans la défense. Ceci empêche la relocalisation du facteur de transcription dans le noyau et l'activation des réponses de défense.

Le *gene silencing* joue un rôle important dans les interactions plante-agent pathogène (Pumplin and Voinnet, 2013). Les petits ARN sont utilisés par le complexe RISC pour cliver les ARN messager empêchant ainsi leur expression. PSR1 et PSR2 sont deux effecteurs de *P. sojae* qui suppriment le *gene silencing* et améliorent l'infection par l'agent pathogène **(Qiao et al., 2013, 2015).** PSR1 cible précisément les ARNmi, des petits ARNs double brin produits *via* une structure en tige-boucle par les plantes.

L'effecteur HaRXL44 de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* est capable d'atténuer les mécanismes de défense induits par la signalisation du SA en intervenant au niveau de l'expression de l'ADN **(Caillaud et al., 2014)**. Cet effecteur est adressé dans le noyau des cellules végétales et est capable d'interagir avec MED19a, un médiateur permettant de faire un pont moléculaire entre les régulateurs de la transcription et l'ARN polymérase sur les promoteurs des gènes. L'interaction avec HaRXL44 entraine la dégradation de MED19a par le protéasome 26S. Parmi les gènes impactés par cette dégradation, il y a *PR1* ainsi que les gènes dépendant des hormones JA et Eth, ce qui conduit à une amélioration de l'infection par l'oomycète.

Blocage de la réponse active de la plante

Certaines réponses de défense de la plante, comme la sécrétion d'hydrolases ou la mort cellulaire, ont un effet direct sur le développement de l'agent pathogène, devenant des cibles pour les effecteurs.

La sécrétion de protéases vers l'apoplasme et le milieu extracellulaire est bloquée par certains effecteurs, empêchant ainsi la dégradation de l'oomycète. C'est le cas de AvrBlb2, un effecteur de *P. infestans* qui se situe en périphérie cellulaire autour de l'haustorium. Il a été montré que l'effecteur s'associe à la cystéine protéase C14 et empêche sa sécrétion, améliorant l'infection de *P. infestans* sur *N. benthamiana* **(Bozkurt et al., 2011)**.

L'ubiquitinisation des protéines est un élément de régulation essentiel pour le fonctionnement de la cellule. L'ajout d'une molécule d'ubiquitine peut amener à une relocalisation ou une modification de fonction, mais l'ajout de plusieurs molécules conduit à une dégradation par le protéasome 26S **(Kerscher et al., 2006)**. L'ubiquitinisation intervient, entre autres, dans la régulation hormonale et dans la PCD. L'effecteur RXLR Avr3a de *P. infestans* interagit avec CMPG1, une enzyme E3 ligase qui intervient dans le processus d'ubiquitinisation, ce qui bloque la mise en place de la HR induite par le PAMP INF1 et augmente la virulence de l'agent pathogène **(Bos et al., 2010; Gilroy et al., 2011).**

Implication dans la remobilisation de la nutrition

Les effecteurs ne sont pas uniquement décrits comme capables de supprimer les défenses végétales, il a aussi été évoqué leur capacité à favoriser l'infection du parasite en intervenant sur la remobilisation de la nutrition. Aujourd'hui aucun effecteur d'oomycète n'a été rapporté comme étant impliqué dans la fonction nutritive de l'haustorium de manière évidente, mais ce rôle reste possible.

Cette fonctionnalité des effecteurs a été mise en évidence pour les agents pathogènes générateurs de galles **(Wildermuth et al., 2017**). Certains effecteurs de nématodes à galle et à kcyste perturbent des voies auxiniques pour permettre la formation de cellules géantes nourricières, qui constituent un environnement favorable au parasite**.(Karczmarek et al., 2004)**.

Un mécanisme pareil est mis en place par *Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie tellurique capable d'induire la formation de tumeurs, agent causal de la galle du collet. Pour ce faire, elle transfère son ADN-T jusqu'à la cellule hôte et l'intègre dans le génome de la cellule végétale. L'expression des gènes de l'ADN-T conduit la cellule hôte à produire les phytohormones auxine et cytokinine, qui vont induire une prolifération cellulaire, et à synthétiser des opines, assurant ainsi une source de carbone spécifique pour *A. tumefacien*s. L'extraction, le transport, le transfert et l'intégration dans le génome végétale de l'ADN-T sont réalisés par un ensemble de facteurs de virulence Vir **(Zupan et al., 2000)**.

Par ailleurs, les bactéries du genre *Xanthomonas* produisent des effecteurs TAL, capables d'induire l'expression de gènes de transporteurs de sucre de type SWEET. Ces transporteurs transfèrent les sucres du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule, ce qui résulte en une disponibilité de source de carbone pour le parasite et lui permet d'infecter la plante **(Chen et al., 2010)**. Un mécanisme similaire reste à découvrir chez d'autres agents pathogènes, dont les oomycètes.

3.3 (Contre)-contre-attaque des effecteurs par la plante

Détection des effecteurs par les récepteurs NLR

Les effecteurs n'échappent pas à une reconnaissance par la plante. Exerçant leur fonction dans la cellule, certains sont détectés par une catégorie de récepteurs nommée NLRs (*NOD-Like Receptors*), des protéines intracellulaires avec des répétitions riches en leucine (LRR, *Leucine Rich repeat*), qui font partie des protéines les plus grandes du monde végétal. Aujourd'hui les NLRs composent 61% des gènes de résistance (R) clonés et sont la famille de gènes R la mieux caractérisée. Les 39% restant correspondent aux gènes RLP/RLK connus ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'immunité **(Kourelis and van der Hoorn, 2018)**. Les gènes NBS-LRR (*nucleotide-binding site leucine-rich repeat*) sont

présents en grand nombre dans les génomes de plantes (plusieurs centaines) et ils se trouvent regroupés en clusters résultants de phénomènes de duplication et de recombinaison **(Leister, 2004)**.

Il existe deux classes principales de récepteurs NLR, distinguables par le domaine présent dans leur séquence N-terminale : les récepteurs de type TIR (*Toll/interleukine-1*) et les récepteurs de type CC (*Coil-coiled*) **(McHale et al., 2006)**. Ces domaines sont reliés à un domaine NBS (*nucleotide-binding site*) qui comprend trois sous-domaines (NB, ARC 1 et ARC2) et à la région LRR **(Figure 21)**. Les voies de signalisation en aval seront différentes pour les deux classes **(Belkhadir et al., 2004)**. Les TIR-NBS-LRR nécessiteront une cascade de signalisation activée par la protéine EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*) et les CC-NBS-LRR nécessitent la participation de NDR1 (*Non-race specific Disease Resistance 1*) **(Century et al., 1997; Parker et al., 1996)**.

Mécanisme de détection des effecteurs par les NLR

La détection des effecteurs par les NLR peut être directe ou indirecte.

L'interaction directe de l'effecteur avec le NLR a lieu généralement au travers de la région LRR très variable. Par exemple, la protéine RPP1 d'*A. thaliana* est capable de se lier directement par son domaine LRR à l'effecteur ATR1 de l'oomycète *H. arabidopsidis* **(Steinbrenner et al., 2015)**. Dans de nombreux exemples, la spécificité de l'interaction réside sur le motif **LRR (van der Vossen et al., 2000; Shen et al., 2003; Allen, 2004)**, mais des mutations sur d'autres régions peuvent modifier la spécificité de reconnaissance **(Giannakopoulou et al., 2015)**. Ceci s'explique par le modèle fonctionnel selon lequel les récepteurs NLR ont deux conformations, une active dépliée et une inactive repliée liant le domaine LRR avec le domaine NBS ; l'interaction avec un effecteur forcerait la forme active induisant la signalisation de défense végétale **(Moffett et al., 2002; Bernoux et al., 2016)** **(Figure 22)**.

La détection indirecte d'un effecteur implique une protéine supplémentaire de la cellule hôte qui est appelée « garde » ou « leurre » en fonction de si elle est la cible directe de l'effecteur ou un imitateur de la cible **(Figure 23)**. Il y a trois possibilités pour le déclenchement de la signalisation immunitaire par les NLR en cas de détection indirecte : détection de l'interaction de l'effecteur avec la protéine de l'hôte, détection de la modification de la protéine de l'hôte ou détection de perturbations de l'homéostasie cellulaire. Pour l'instant la détection indirecte a principalement été observée pour des effecteurs bactériens. Dans quelques cas particuliers, le leurre est intégré dans la séquence du récepteur, lequel est alors appelé NLR-ID (NLR *Integrated Decoy*) **(Kroj et al., 2016; Sarris et al., 2016)**. Par exemple, NLR RRS1 d'*A.thaliana* possède un motif facteur de transcription WRKY à la fin de son domaine C-terminal **(Sarris et al., 2015)** **(Figure 21)**.

Les NLR sont la famille la mieux caractérisée de récepteurs reconnaissant des effecteurs, mais ils ne sont pas les récepteurs exclusifs de cette reconnaissance. Certains effecteurs sont détectés dans

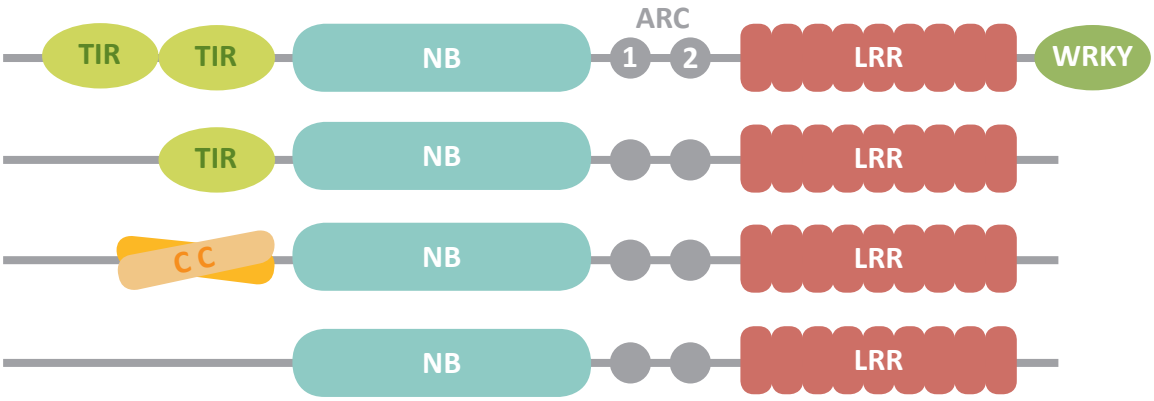


Figure 21 : Structure des différents NLR. Représentation des principaux domaines des protéines NBS-LRR. TIR, domaine de type récepteur Toll / interleukine-1; CC, domaine Coil-coiled; NBS, site de liaison aux nucléotides; LRR, domaine répété riche en leucine; WRKY, facteur de transcription de type WRKY. Réalisé à partir du modèle (McHale et al., 2009).

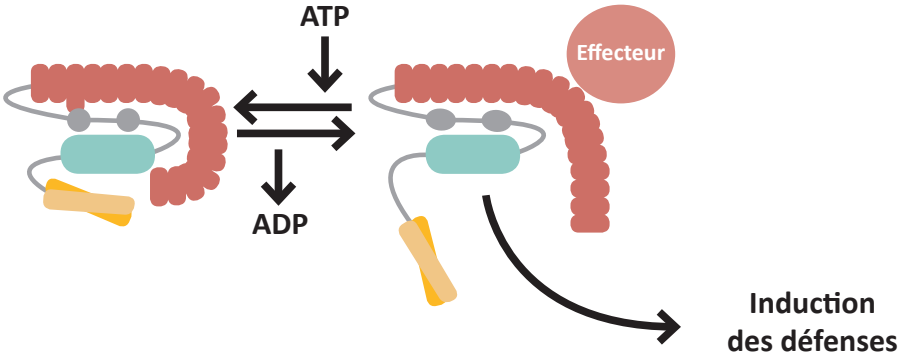


Figure 22 : Activation d'un récepteur NLR par un effecteur. Modèle d'activation d'un récepteur CC-NBS-LRR par reconnaissance directe. En l'absence d'agent pathogène, les récepteurs résident dans un état «OFF» auto-inhibé, lié à l'ADP, qui est stabilisé par le domaine LRR. La perception de l'effecteur par la partie C-terminale du domaine LRR modifie l'interface entre sa partie N-terminale et le sous-domaine ARC2, créant ainsi une conformation plus ouverte de la protéine R qui est sujette aux échanges nucléotidiques. Un échange ADP/ATP déclenche un deuxième changement conformationnel, modifiant les interactions entre les domaines CC (ou TIR) et LRR, ce qui donne l'état «ON». Dans l'état activé, le sous-domaine NBS devient exposé pour initier la signalisation de défense. L'hydrolyse de l'ATP remet la protéine dans son état « OFF» auto-inhibé lié à l'ADP. Réalisé à partir du modèle (Takken and Tameling, 2009).

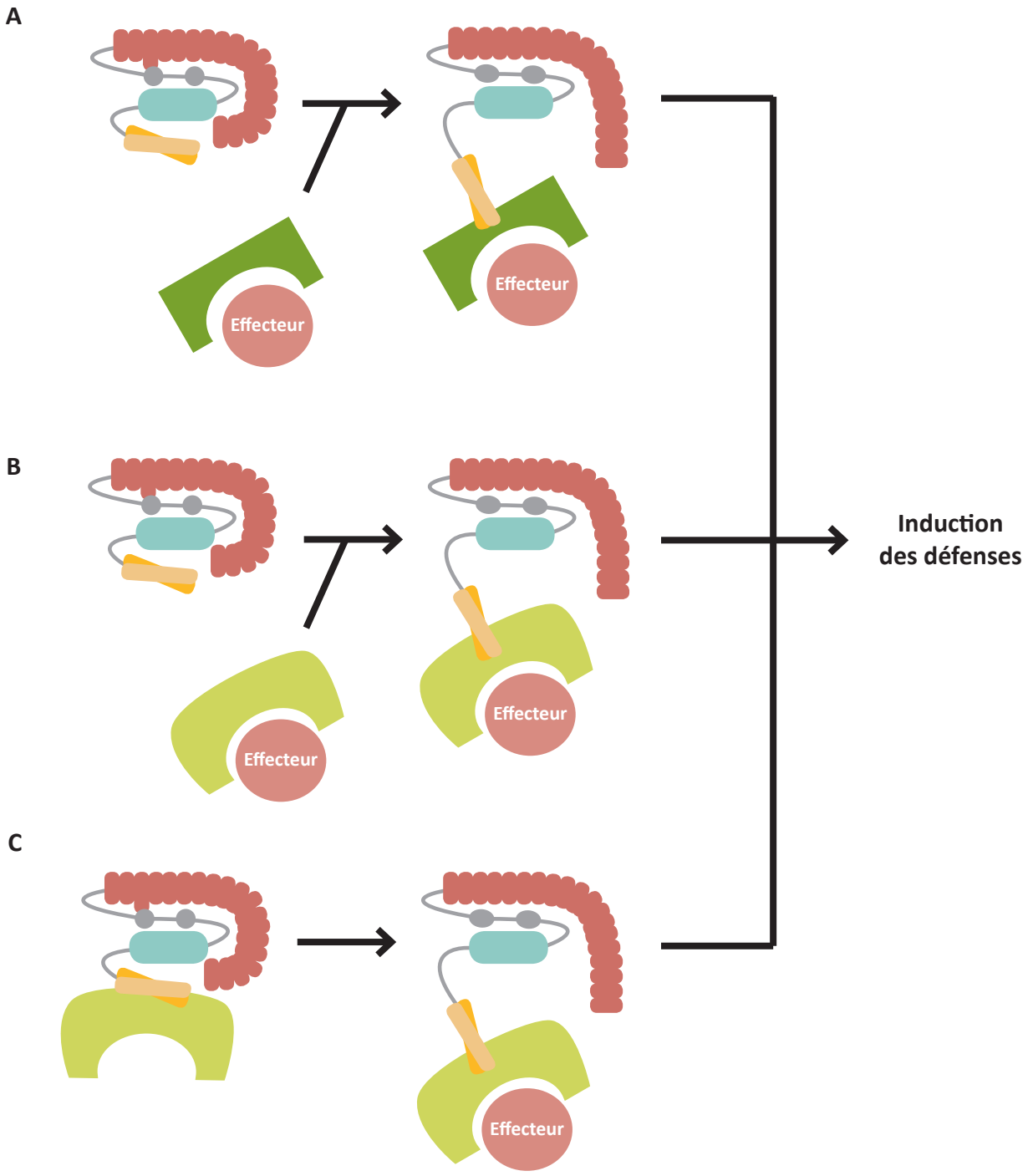


Figure 23 : Activation d'un récepteur NLR par un effecteur *via* le modèle de garde ou de leurre. Les NB-LRR peuvent également reconnaître indirectement des agents pathogènes. **(A)** Le modèle de garde: La protéine de résistance détecte une modification dans la cible (en vert) d'un effecteur. L'interaction peut être détéctée directement par le recepteur NBS, mais les modifications induites par la perturbation de la fonction de la protéine ciblée peuvent faire lieu d'avertisseur. **(B)** Modèle du leurre: La protéine de résistance détecte une modification dans la cible factice (en vert clair) d'un effecteur. **(C)** Le leurre (en vert clair) peut être associé de manière constitutive au récepteur immunitaire. L'ensemble de ces détections induit le déclenchement des réactions de défense. Réalisé à partir du modèle (Caplan et al., 2008).

l'apoplasme par des récepteurs membranaires de type RLP et RLK. C'est le cas du récepteur RLP LeEIX2 de la tomate, qui interagit avec l'effecteur EIX **(Ron and Avni, 2004)**, le récepteur Cf-9 de la tomate qui appartient à la famille des RLP et qui reconnait Avr9 du champignon *Cladosporium fulvum* et toujours chez la tomate le récepteur RLK I-3 qui interagit avec Avr3 du champignon responsable du flétrissement vasculaire *Fusarium oxysporum* **(Catanzariti et al., 2015)**.

Suppression de l'ETI et modèle en ZigZag

Lorsqu'un effecteur est détecté par la plante il est qualifié de protéine d'avirulence (Avr). Sa détection enclenche une signalisation cellulaire comme la cascade des MAPK, les ROS, l'acide salicylique, et un ensemble de mécanismes de défense (sécrétion de composés antimicrobiens) majoritairement de type HR. Ces mécanismes de défense sont regroupés alors sous l'appellation ETI (*effector-triggered immunity*). Certaines souches bloquent la mise en place de cette ETI **(Figure 24-25)**. Le contournementt l'ETI est possible par la mutation, la déletion ou la régulation de l'expression de séquences codant pour les effecteurs reconnus. Par ailleurs, des effecteurs ont été décrits comme étant capables de supprimer l'ETI, en intervenant sur la signalisation ou les mécanismes de défenses. C'est le cas de Avr1, un effecteur de *F. oxysporum* sp lycopersici qui peut empêcher la reconnaissance des effecteurs avirulents Avr2 et Avr3 par les gènes de résistance I2 et I3 **(Houterman et al., 2009)**.

La coévolution des agents pathogènes et des plantes est souvent comparée à une « course à l'armement » représentée graphiquement par le modèle en Zig-Zag **(Figure 25)** (Jones and Dangl, 2006; Hein et al., 2009). Les effecteurs RXLR sont présents en très grand nombre et situés dans des régions du génome très dynamiques et riches en transposons **(Haas et al., 2009; McGowan and Fitzpatrick, 2017; Schornack et al., 2009).** Par ailleurs, des analyses montrent que ce serait leur domaine C-terminal, souvent associé à leur site actif ou reconnu par les NLRs, qui subit le plus de réarrangements **(Win et al., 2007a).** Toutes ces caractéristiques font que les effecteurs RXLR évoluent très rapidement, ce qui leur permet d'échapper facilement à l'ETI. Il faut tenir compte du fait que certains éléments du modèle en Zig-Zag ont été remis en question, notamment en ce qui concerne la séparation entre PTI et ETI, qui ne serait pas si évidente **(Thomma et al., 2011; Wu et al., 2018)**.

3.4 Effectoromique : combattre l'ennemi avec ses propres armes

Grace aux avancés techniques des dernières années en matière de séquençage, l'assemblage du génome des agents pathogènes est devenu possible. Il est alors envisageable de rechercher et d'identifier à haut-débit les séquences codantes des effecteurs. Ce processus est appelé effectoromique.

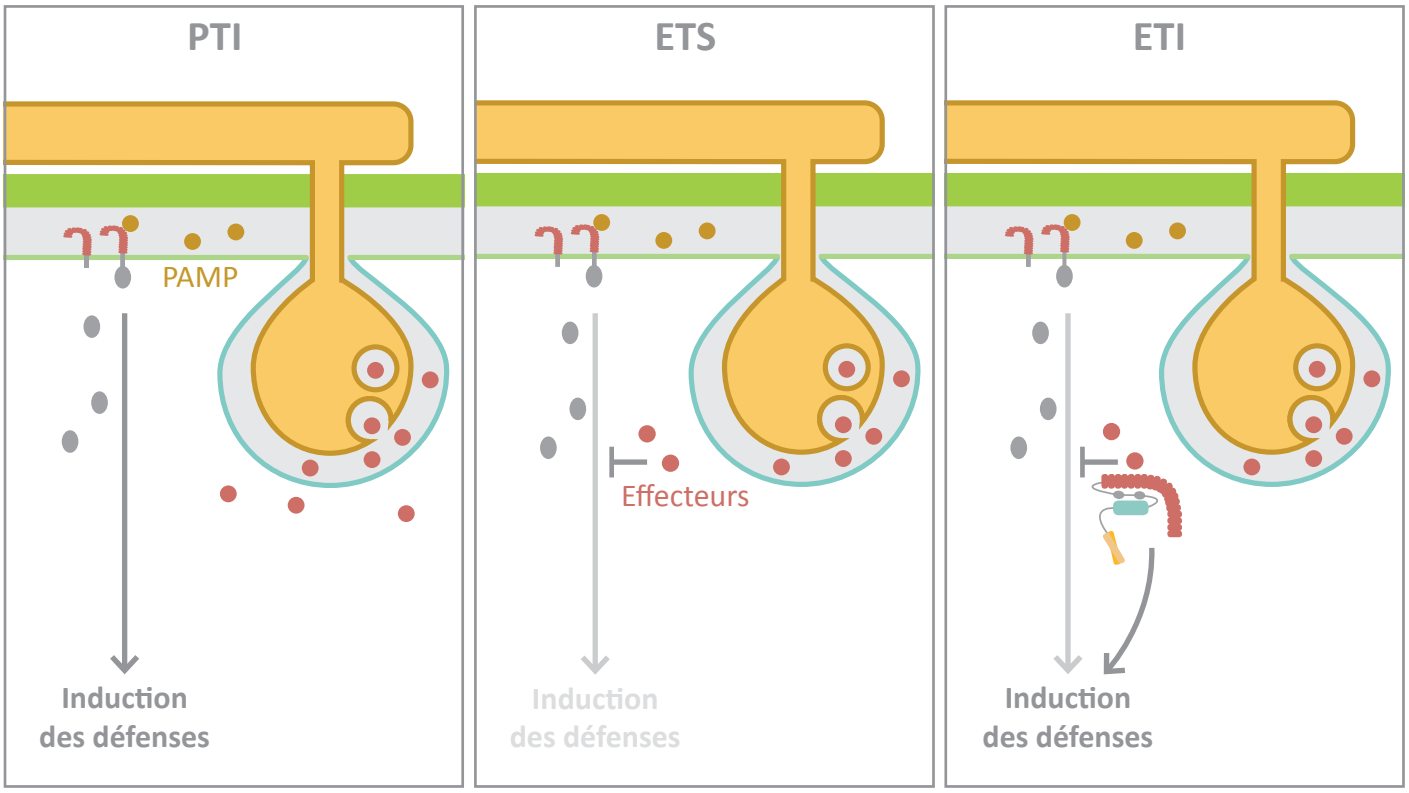


Figure 24 : Représentation de la succession d'évènements intervenant dans l'interaction moléculaire entre la plante et l'oomycète. La PTI a lieu lorsque les PAMP (boules ocres) de l'oomycète (en orange) sont détéctés par des récepteurs de la famille des PRR, ce qui entraine une cascade de signalisation (flèche grise) qui active les défenses immunitaires. Au cours de l'ETS, les effecteurs (boules rouges) sécrétés en amont dans le cytoplasme de la cellule hôte par les haustoria suppriment la cascade de signalisation ou les défenses, rétablissant la sensibilité de la plante. L'ETI intervient lorsque les effecteurs sont détéctés par des récepteurs de type NLR et réactive une cascade de signalisation (flèche grise) aboutissant à la mise en place de défenses. Réalisé à partir du modèle (Pieterse et al., 2009).

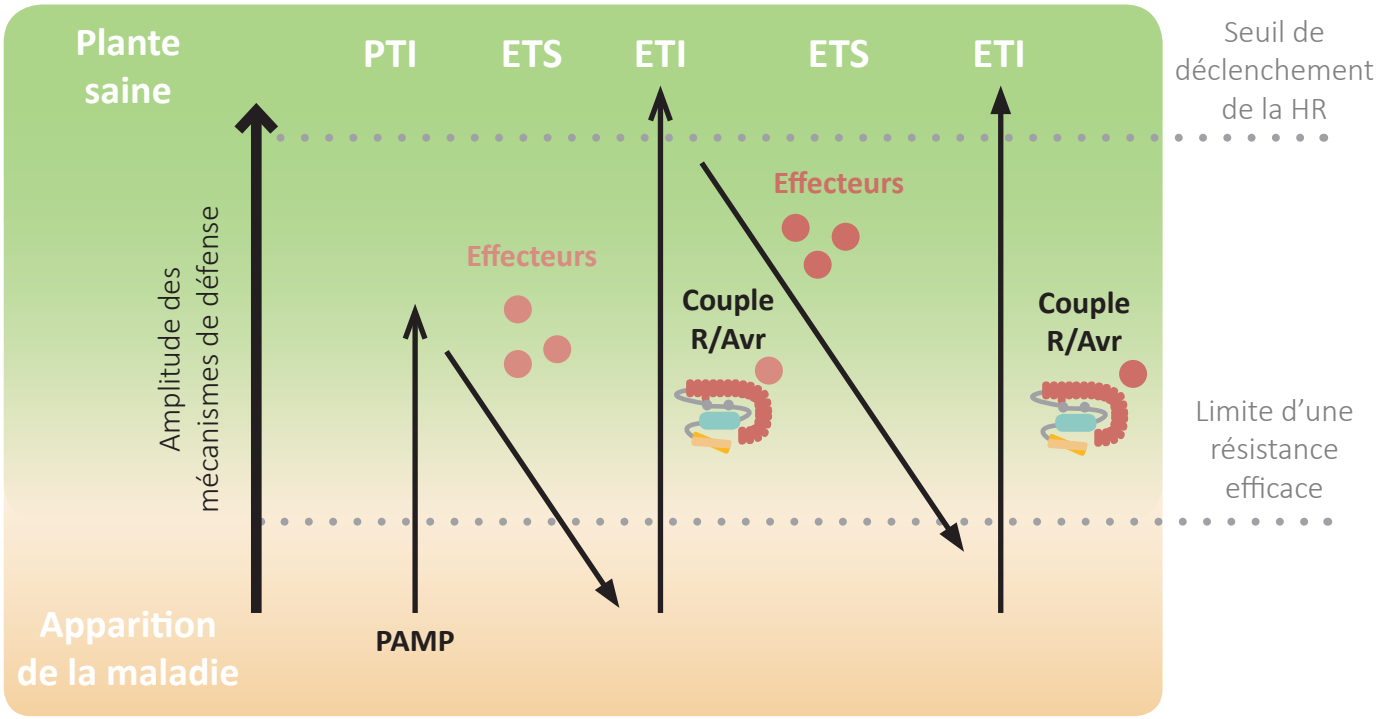


Figure 25 : Le modèle en zigzag illustre le rendement quantitatif du système immunitaire de la plante.
Le modèle de l'immunité végétale est représenté en 4 mouvements :

Le premier mouvement est la détection des PAMP, DAMP ou MAMP par la plante via les PRR ce qui déclenche la PTI (*PAMP-triggered immunity*).

Au cours du second mouvement les agents pathogènes produisent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI ou qui favorisent la nutrition et la dispersion des agents pathogènes, ce qui entraîne une sensibilité déclenchée par l'effecteur (ETS, *effector-triggered susceptibility*).

Au cours du troisième mouvement , un effecteur est reconnu par une protéine NB-LRR, activant l'immunité déclenchée par effecteur (ETI, *effector-triggered immunity*), une version amplifiée de la PTI qui dépasse souvent un seuil d'induction de la réponse hypersensible (HR).

Dans le quatrième mouvement, certains isolats d'agent pathogène sécrètent de nouveaux effecteurs qui permettent de supprimer l'ETI.

La sélection favorise les nouveaux allèles NBS-LRR qui peuvent reconnaître l'un des effecteurs nouvellement acquis, ce qui entraîne à nouveau une ETI.

Réalisé à partir du modèle (Jones and Dangl, 2006).

Une approche résumée par **Vleeshouwers et al. (2008)** sur la base de l'effectoromique vise à utiliser des séquences codantes des effecteurs pour identifier des gènes de résistance chez la plante. En sachant que les gènes *Avr* reconnus par la plupart de gènes de résistance appartiennent à la famille des effecteurs de type RXLR **(Stassen and Van den Ackerveken, 2011)** et que l'expression transitoire de gènes *Avr* en présence du gène de résistance correspondant conduit à une HR **(Scofield et al., 1996; Bendahmane et al., 2000)**, il est possible d'identifier des gènes *Avr* par expression transitoire d'effecteurs RXLR chez des plantes portant des gènes de résistance. L'effecteur reconnu par le gène de résistance donnera lieu à une HR. Réciproquement, l'expression d'effecteurs sur des plantes résistantes dont les bases génétiques ne sont pas connues peut amener à l'identification de nouveaux gènes de résistance par l'apparition d'une HR **(Figure 26).** Cette approche peut être applicable par un crible à plus ou moins haut-débit, en prenant garde de valider l'avirulence de l'effecteur par des analyses génétiques *via* un test de co-ségrégation avec la résistance à la maladie. Pour cela, l'effecteur est exprimé au sein d'une population générée par le croisement d'un parent résistant et donc réactif à l'effecteur avec un parent sensible. Il est alors possible de vérifier que l'apparition de HR a lieu chez des individus présentant une résistance à l'agent pathogène. Le crible est réalisé sur une gamme d'espèces interfertiles avec l'espèce agronomique d'intérêt, ce qui permet une génération rapide d'hybrides résistants par introgression. Il est également possible de valider le couple R/Avr *via* une co-expression directe, par agroinfiltration dans *N. benthamiana*, de l'effecteur avec le gène de résistance, dans le cas où ce dernier serait cloné.

L'approche décrite par Vleeshouwers a permis l'identification accélérée de nouveaux gènes R de la pomme de terre contre *P. infestans* **(Vleeshouwers and Oliver, 2014).** Elle s'est également avérée efficace dans le cadre de la recherche de gènes de résistance contre deux autres oomycètes phytopathogènes : *Plasmopara halstedii* et *Bremia lactucae* qui provoquent respectivement le mildiou du tournesol et de la laitue.

Chez la laitue, l'équipe du Pr Jeuken a exprimé 16 effecteurs RXLR sur 150 lignées génétiques de laitues résistantes, *L. saligna* **(Giesbers et al., 2017)**. L'expression transitoire de l'effecteur RXLR BIN31 a conduit à l'apparition de nécroses de type HR chez 5% des *L. saligna*. Ces lignées ont alors été évaluées pour la co-segragation de la HR avec la résistance à *B. lactucae*. Des populations F1 et F2 ont été obtenues en croisant un parent qui répond à l'effecteur et un parent qui ne répond pas. Une population BC1 a également été obtenue par rétrocroisement avec le parent qui ne répond pas à l'effecteur. BIN31 a été exprimé sur les trois populations. L'apparition de HR a été comparée avec la distribution de la résistance dans les populations, révélant une co-ségrégation avec un gène de résistance dominant.

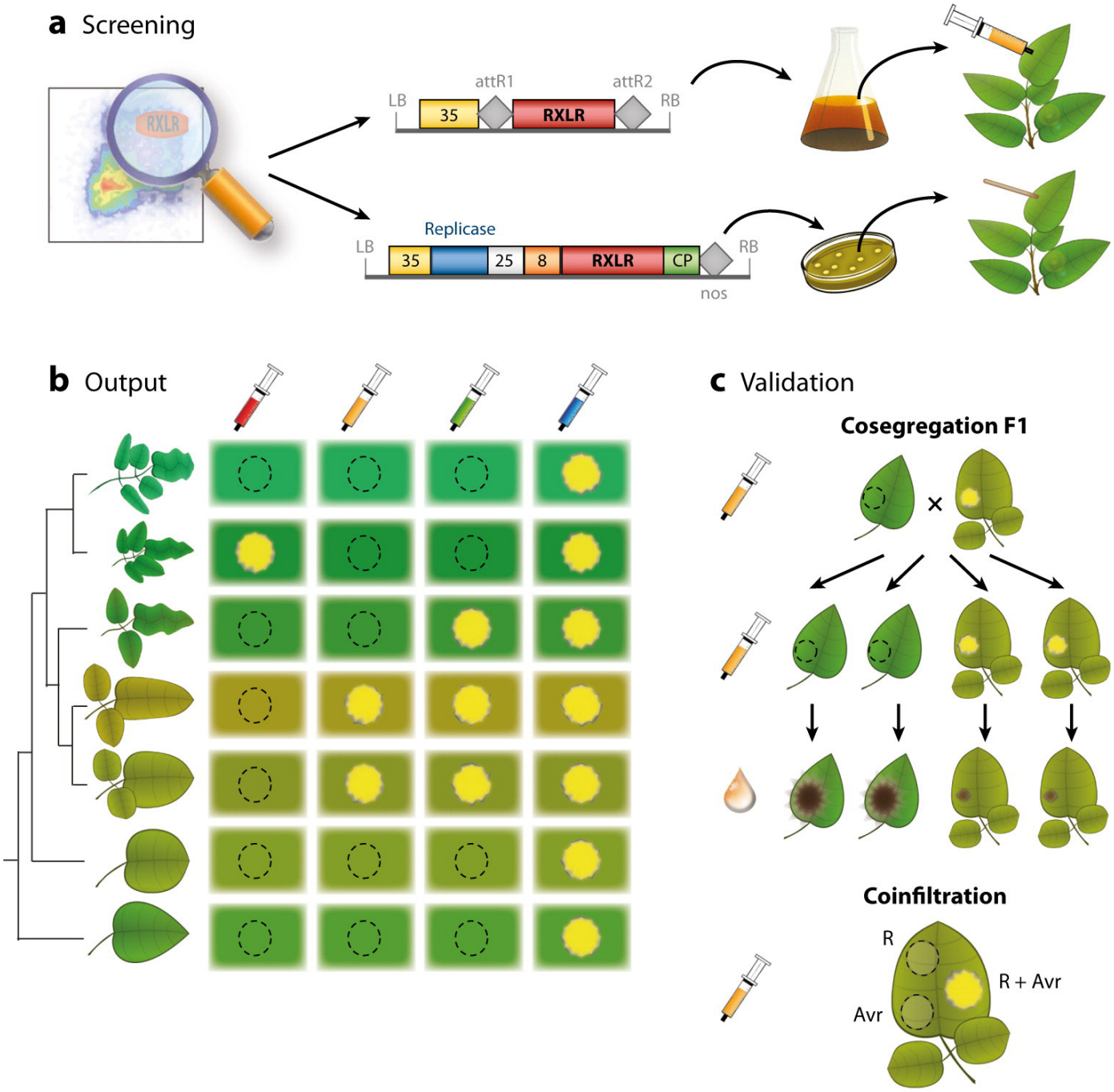


Figure 26 : Identification de couples de gènes *R/Avr.* (A) Identification de séquences génomiques codant pour des effecteurs en cherchant le motif caractéristique RXLR et clonage dans des vecteurs d'expression. Les constructions sont ensuite introduites dans *A. tumefaciens* qui permet une expression transitoire du transgène chez la plante hôte. **(B)** Un crible est réalisé en exprimant chacun des effecteurs clonés (rouge, jaune, vert et bleu) sur une gamme d'individus résistants (représentés par des feuilles de formes et de couleurs différentes). L'apparition de HR sur les tissus transformés témoigne de la correspondance d'un gène *R* avec l'effecteur exprimé. **(C)** La validation du couple *R/Avr* est réalisée de deux manières. La première est basée sur la co-ségrégation de la réponse à l'effecteur avec la résistance à *P. viticola* au sein des individus issus d'une même population (créée à partir d'un parent qui induit une HR après expression de l'effecteur). La seconde est la co-expression du gène R cloné avec l'effecteur. Extrait de (Vleeshouwers et al., 2011).

Concernant le mildiou du tournesol, de nombreux cas de contournement des résistances commercialisées ont été observés. L'utilisation de résistances durables combinées à des pratiques culturales réfléchies est primordiale. L'équipe du Dr Godiard a criblé 30 effecteurs RLXR conservés sur 16 lignées de tournesol résistantes **(Pecrix et al., 2018)**. Cinq effecteurs ont conduit à l'apparition de HR. Grâce aux infiltrations réalisées sur deux générations F3, il a été observé que l'effecteur PhRXLRC01 co-ségrège avec le QTL de résistance dominant P22. L'approche a aussi facilité le processus de réduction de l'intervalle du QTL dans une région génomique qui code 39 gènes exprimés au cours d'une infection par le mildiou, dont 8 gènes NBS-LRR candidats.

Situation actuelle de l'effectoromique chez *P. viticola*

Ces dernières années ont été témoin d'une progression importante dans la création de ressources transcriptomiques **(Mestre et al, 2012; Yin et al., 2015; Mestre et al., 2016)** et génomiques **(Dussert et al., 2016; Yin et al., 2017; Brilli et al., 2018)** de *P. viticola*. Ces ressources ont permis d'accéder aux effecteurs de cet oomycète pour des isolats de différentes origines **(Mestre et al., 2016; Yin et al., 2017; Liu et al., 2018)** et d'identifier des effecteurs qui semblent être conservés entre des espèces d'oomycètes, qui seraient des bons candidats pour aborder la recherche de gènes de résistance **(Mestre et al., 2016).** Pour un nombre important de ces effecteurs, l'étude de leur possible fonction comme suppresseurs des défenses des plantes, ainsi que leur localisation cellulaire ont été décrits **(Xiang et al., 2016),** conduisant à quelques résultats notables. Ainsi, il a été montré qu'un effecteur RXLR induit une réponse immune chez *N. benthamiana* **(Xiang et al., 2017)** et qu'un deuxième est capable de supprimer les défenses de la plante par le biais de la suppression de l'accumulation de ROS et, par conséquent, réduit l'expression de gènes de défense **(Xiang et al., 2016).**

Les gènes de résistance au mildiou de la vigne décrits dans le chapitre précédent sont localisés dans des régions riches en gènes de type NLR, et le seul gène cloné, *Rpv1*, appartient à cette famille **(Feechan et al., 2013)**. À ce jour, les gènes *Avr* de *P. viticola* reconnus par ces gènes R n'ont pas été identifiés. Identifier les gènes *Avr* correspondant aux gènes R de la vigne permettrait de mieux connaître l'interaction plante-agent pathogène et de mieux appréhender les chances de durabilité des résistances utilisées.

Objectifs

Cette thèse s'inscrit dans une démarche de création variétale de vignes résistantes à *Plasmopara viticola*, oomycète causant le mildiou, à partir des connaissances acquises dans la littérature sur l'agent pathogène et sur les espèces de vignes résistantes à la maladie. Le principal inconvénient de la création de variétés résistantes est le fort potentiel de contournement des gènes de résistance par l'oomycète. Afin de pallier le risque de mettre à disposition des viticulteurs des vignes dont la résistance au mildiou serait rapidement inefficace, le programme de sélection développé par l'équipe de Génétique et Amélioration de la Vigne (GAV) de l'INRA de Colmar, dans laquelle j'ai effectué ma thèse, vise à pyramider des gènes de résistance de manière stratégique.

L'objectif du projet de thèse est d'utiliser les connaissances sur les effecteurs de *P. viticola* pour identifier de nouveaux gènes de résistance au mildiou potentiellement durables. À long terme, les gènes de résistance identifiés seront incorporés dans les programmes de création de variétés de vignes résistantes au mildiou. Pour atteindre cet objectif, deux stratégies ont été utilisées.

Dans un premier temps des gènes de résistance de type récepteur, reconnaissant les effecteurs conservés de *P. viticola,* ont été recherchés. Le fait que les effecteurs soient conservés est révélateur de leur importance dans le pouvoir infectieux ou dans la fitness de *P. viticola*. Les résistances ciblant ces effecteurs devraient *a piori* être durables.

Dans un second temps la caractérisation fonctionnelle de ces effecteurs a été réalisée dans le but d'identifier leurs cibles moléculaires et pouvoir ainsi proposer des résistances alternatives chez la vigne.

1. Identification de gènes de résistance qui reconnaissent des effecteurs conservés de *P. viticola*

« L'effectoromique est une approche qui consiste à identifier des effecteurs essentiels à la virulence du pathogène et, par leur étude, à trouver des gènes de résistance forts et potentiellement durables »

(Vleeshouwers et al., 2011).

Une première étape pour aboutir à mon objectif est l'obtention d'une sélection d'effecteurs RXLR la plus propice à nous conduire à l'identification de gènes de résistance durable chez la vigne. Cette sélection a été faite au laboratoire avant le début de la thèse. Deux critères ont été utilisés pour sélectionner des effecteurs candidats essentiels de *P. viticola* : leur expression précoce au cours de

l'infection, un moment clef qui détermine l'issu de l'interaction, et leur faible variabilité intra-spécifique.

Une fois les effecteurs RXLR candidats obtenus, ils serviront d'appât pour identifier la présence de gènes de résistances. Pour cela, l'apparition d'une réponse immunitaire sous forme de HR sera suivie chez les vignes après expression d'un transgène codant un de ces effecteurs candidats. Un double criblage est visé :

Le premier est réalisé sur une gamme de génotypes issus de croisements entre *V. vinifera* sensible et des vignes résistantes, portant séparément les facteurs de résistance *Rpv1*, *Rpv2* et *Rpv3*. L'induction de réactions de défense de type HR par ces génotypes indiquera si une reconnaissance d'un de ces effecteurs dépend de *Rpv1*, *Rpv2* ou *Rpv3,* et conduira à l'identification du gène *Avr* pour ces gènes *R*. La spécificité de la réponse de type HR par rapport à la présence du gène *R* pourra être évaluée sur des populations en ségrégation.

Le second criblage est réalisé sur une gamme de vignes résistantes asiatiques et américaines dont les bases génétiques de la résistance ne sont pas toujours connues. Cette approche permettra d'identifier des nouveaux gènes de résistance liés à la détection d'un de ces effecteurs.

2. Compréhension du rôle des effecteurs RXLR dans la stratégie d'infection de *P. viticola*.

Le second axe a pour but de caractériser fonctionnellement des effecteurs candidats sélectionnés. La compréhension du mécanisme sous-jacent à la fonction d'un effecteur permet d'identifier ses cibles moléculaires et ainsi potentiellement de développer des facteurs de résistance alternatifs. Ainsi par le biais d'un criblage de collection de vignes cultivées ou sauvages, on peut identifier des variants de cette cible ayant perdu la capacité d'interagir avec l'effecteur, et qui pourraient fonctionner comme des gènes de résistance récessifs.

En conditions idéales, l'analyse fonctionnelle d'effecteurs doit se faire directement sur les organismes hôtes et pathogènes. Par exemple, pour vérifier et comprendre le rôle d'un effecteur dans le pouvoir infectieux de *P. viticola* nous devrions inactiver son expression ou il serait possible de le faire exprimer chez la plante hôte. Cependant *P. viticola* et la vigne sont respectivement impossible et très difficile à transformer. C'est pourquoi il a été nécessaire de se tourner vers l'expression des effecteurs candidats chez des espèces modèles, notamment *N. benthamiana*.

La fonction principale attribuée aux effecteurs des oomycètes étant la suppression des défenses, l'analyse fonctionnelle débutera donc par un criblage de l'effet de l'effecteur sur les défenses

de la plante. Cette fonction sera vérifiée en étudiant leur capacité à empêcher le développement de nécrose de type HR ainsi que la production de phytoalexines induites par la présence du PAMP INF1.

Pour ces effecteurs montrant un effet sur les réponses immunes de la plante, plusieurs paramètres seront étudiés en vue d'une caractérisation fonctionnelle plus fine :

1 - Identification des compartiments d'adressage cellulaire de l'effecteur dans la cellule hôte, par expression de l'effecteur couplé à un marqueur fluorescent.

2 - Identification des voies métaboliques végétales ciblées par l'effecteur chez l'hôte, par analyse métabolomique de tissus foliaires qui expriment transitoirement l'effecteur.

3 - Identification des cibles protéiques de l'effecteur dans la cellule hôte, par immunoprécipitation d'effecteurs tagués, suivi d'identification de protéines par spectrométrie de masse.

4 – Vérification de l'action de l'effecteur sur le pouvoir infectieux de différents agents pathogènes par inoculation des pathogènes sur des tissus foliaires de vigne et de *N. benthamiana* exprimant les effecteurs de façon transitoire.

Chapitre 1 : Recherche d’effecteurs de *P. viticola* reconnus par les vignes résistantes

Les recherches décrites dans ce chapitre constituent l'axe principal original de ma thèse, dont le but est d'identifier de nouvelles sources de résistance durable à la vigne contre le mildiou. Nous avons choisi une stratégie d'effectoromique avec une sélection de gènes effecteurs RXLR essentiels pour l'agent pathogène. L'hypothèse de départ est que les gènes de résistance reconnaissant ces effecteurs seront *a priori* plus durables, car la perte ou la mutation de ces effecteurs aura un effet délétère pour l'agent pathogène. La recherche de gènes de résistance sera faite par expression transitoire d'effecteurs chez des sources de résistance ; la présence d'un gène de résistance reconnaissant l'effecteur sera mise en évidence par l'apparition d'une mort cellulaire.

Les résultats initiaux obtenus avec cette approche m'ont amené à rechercher des stratégies alternatives, en particulier concernant l'import des effecteurs dans les cellules de vigne. J'ai choisi de produire ces effecteurs en système hétérologue puis d'infiltrer les protéines purifiées.

Dans un souci de clarté, une section expliquant les différentes étapes de la stratégie de recherche de résistances durables est présentée avant les résultats.

1. Stratégie de recherche de résistances durables

Le principe de notre stratégie repose sur un crible de gènes codant pour des effecteurs RXLR candidats de *P. viticola* considérés comme essentiels. Les effecteurs essentiels sont définis ici comme ceux étant peu variables entre les souches et exprimés lors des étapes précoces de l'infection. Nous faisons l'hypothèse que les effecteurs exprimés tôt dans le cycle infectieux et présents chez un grand nombre d'isolats de *P. viticola* interviendront dans des processus clefs de l'infection et seront fondamentaux pour le pouvoir pathogène. Ces effecteurs seront exprimés transitoirement par agroinfiltration sur différents génotypes de vigne, en particulier des vignes américaines et asiatiques possédant des facteurs de résistance non-identifiés à ce jour. Il est attendu que si un gène de résistance correspondant à l'effecteur est présent dans le génome d'un des génotypes étudiés, une réponse de mort cellulaire sera observée. En parallèle, ces gènes seront exprimés sur des de vignes hybrides possèdant les gènes ou QTLs de résistance *Rpv1*, *Rpv2* et/ou *Rpv3* avec le but d'identifier le gène d'avirulence correspondant.

1.1 Sélection d'effecteurs RXLR candidats de *P. viticola*

L'identification et la sélection de gènes candidats sont deux étapes déterminantes pour la suite de cette étude. Le but est d'utiliser dans le crible les séquences des effecteurs les plus propices à nous conduire à des gènes de résistance durables. L'identification et la sélection des effecteurs RXLR

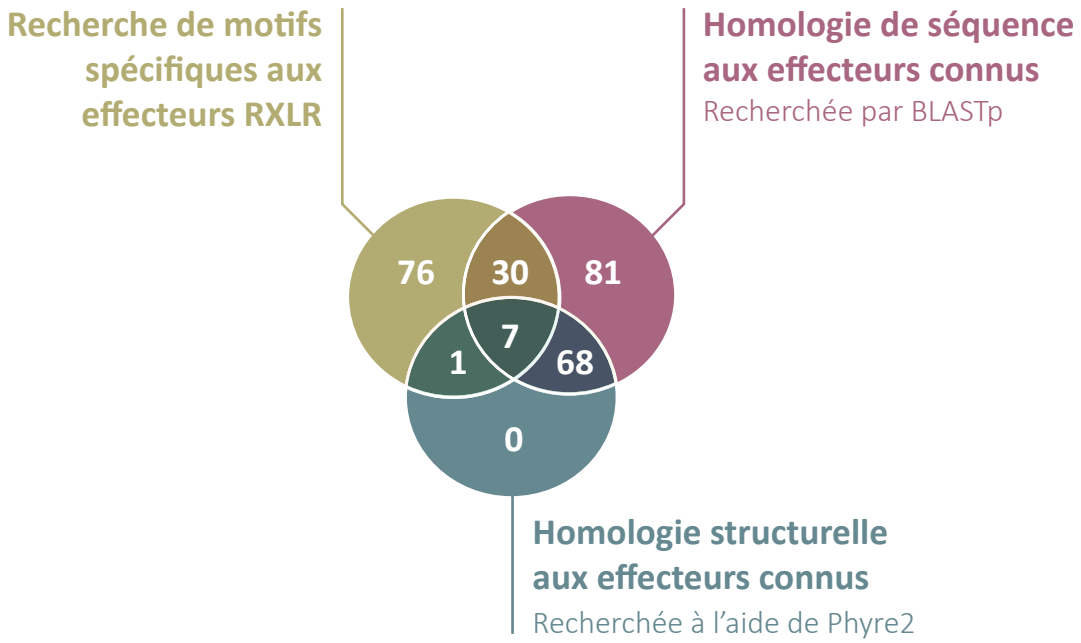


Figure 27 : Critères d'identification des effecteurs RXLR putatifs de *P. viticola.*
Les séquences codantes pour des effecteurs RXLR ont été recherchées au sein du protéome de *P. viticola via* différentes approches: la recherche de motifs spécifiques aux effecteurs RXLR (en vert), la recherche d'homologique de séquence (en bleu) et de structure (en bordeau) avec des effecteurs RXLR connus dans les protéomes de *P. sojae, P. halstedii, P. infestans, H. arabidopsidis.* Au total, 256 séquences putatives ont été identifiées.

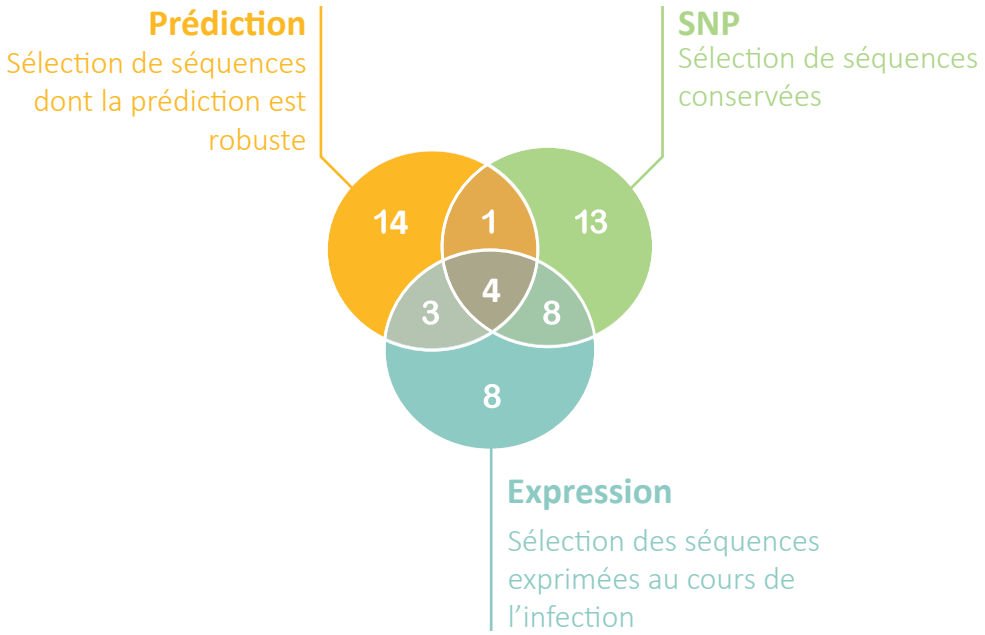


Figure 28 : Critères de sélection des effecteurs RXLR candidats.
Plusieurs critères de sélection ont été appliqués sur les 256 effecteurs putatifs identifiés. Vingt-deux gènes ont été séléctionnés (en jaune) pour la présence de motifs spécifiques aux RXLR et une expression au cours de l'infection confirmée par RNA-seq. Vingt-six séquences ont été séléctionnées (en vert) pour leur conservation à l'aide de l'analyse de SNP au sein de 27 isolats de *P. viticola* et dont l'expression a été confirmée par RNA-seq. Vingt-trois séquences ont été séléctionnées (en bleu) pour présenter une expression forte à 48 hpi et la présence de motifs spécifiques aux effecteurs RXLR. Au total, 51 effecteurs putatifs ont été séléctionnés.

candidats dans le protéome de *P. viticola* ont été réalisées avant le début du projet de thèse ; en conséquence, ces processus ne seront pas abordés en détail ici.

L'identification d'effecteurs RXLR dans le protéome de *P. viticola* a été réalisée suivant deux types d'approches : i) Un blast sur les séquences protéiques (blastp) contre une base de données d'effecteurs RXLR connus et ii) une mise en évidence de motifs RXLR-dEER par recherche d'expressions régulières (regex, *Regular expression*) et aussi à l'aide de modèles de Markov cachés (HMM). Après un tri des séquences basé sur la présence d'un peptide signal et l'absence de motifs transmembranaires, une homologie structurelle des gènes candidats obtenus avec des effecteurs RXLR connus a été recherchée. Les détails du processus d'identification d'effecteurs et les résultats obtenus sont présentés dans la Section 1 du Chapitre 3, car ils ont été intégrés dans l'article **(Combier et al.)** soumis à publication.

Un certain nombre de données de séquençage de *P. viticola* sont disponibles et régulièrement mises à jour par de nouvelles techniques de séquençage. Dans un premier temps le transcriptome de spores germées *in vitro* de l'isolat SC a été obtenu par séquençage Sanger, puis quelques années plus tard par séquençage 454 à partir de spores germées *in vitro* et de feuilles infectées **(Mestre et al., 2016)**. Enfin, la technologie Illumina Solexa a permis le séquençage du génome de cet oomycète à partir de la souche PV221 puis à partir de 27 isolats différents.

L'identification d'effecteurs RXLR décrite ci-dessus a mis en évidence 256 séquences candidates **(Figure 27)**. Ensuite, trois critères ont été utilisés pour sélectionner des candidats prédits comme essentiels à la virulence de *P. viticola* : 1) la robustesse de la prédiction, 2) la variabilité de l'effecteur dans une collection d'isolats de *P. viticola,* basée sur le reséquençage de 27 isolats, et 3) l'expression de l'effecteur lors de l'infection, sur la base de données de RNA-Seq à 48 heures post-infection (hpi) **(Figure 28)**.

Les 37 effecteurs dont l'identification a été considérée la plus robuste (identifiées par Blast et recherche de motif) et ceux montrant une faible variabilité (définie comme un nombre de SNPs non-synonymes ≤ 6) ont été retenus à condition que leur niveau d'expression à 48 hpi soit détectable dans les trois répétitions des expériences de RNA-Seq. En parallèle, les 35 effecteurs les plus fortement exprimés à 48 hpi ont été retenus pourvu qu'ils aient été identifiés par recherche de motif par au moins une des méthodes utilisées.

In fine, ce processus a conduit à la sélection de 51 effecteurs, dont la répartition selon critères de sélection est présentée dans la **(Figure 28)**. Vingt-cinq d'entre eux seront utilisés pour la recherche de résistances durables dans le cadre de la thèse. Nous avons choisi les 16 sélectionnés sur la base d'au moins deux critères, et 9 autres montrant une forte expression au cours de l'interaction *P. viticola / V. vinifera* **(Tableau 4)**.

Nom de l'effecteur	Nom original	Taille (aa)	Position RXLR	Motif RXLR	Position DEER	Prédiction sur Phyre2	Homologues
Pv08	Plvit221r1_S0008g07301	149	33	RFLR	76		1
Pv19	Plvit221r1_S0464g40214	276	48	RTLQ	61		1
Pv24	Plvit221r1_S0035g12798	123	28	QHLR	42		1
Pv38	Plvit221r1_S0012g08108	186	37	RQKR	62		1
Pv40	Plvit221r1_S0023g10568	112	56	RFLR	76		2
Pv41	Plvit221r1_S0008g07299	134	56	RRLR	76	Avr3a4, effecteur RXLR de *P. capsici* (23.7%)	1
Pv44	Plvit221r1_S0464g40210	270	42	RTLQ	55		1
Pv52	Plvit221r1_S0042g14463	333	44	RGLR	55	Régulateur de réponse aspartate phosphatase, Kinesin light-chain 1 (99.9%)	2
Pv53	Plvit221r1_S0214g30354	513	47	RFLR	62		0
Pv55	Plvit221r1_S0411g38958	414	48	RKLR	-		0
Pv57	Plvit221r1_S0229g31250	183	40	RRLR	60	Avr3 a11, effecteur RXLR de *P. capsici* (81.9%)	2
Pv58	Plvit221r1_S0008g07056	149	51	RSLR	74		0
Pv62	Plvit221r1_S0545g41401	116	48	RILR	60		0
Pv63	Plvit221r1_S0098g21208	202	48	RRLR	58		0
Pv64	Plvit221r1_S0278g33823	96	31	RSLR	-		1
Pv65	Plvit221r1_S0256g32728	151	37	RLLR	49		2
Pv67	Plvit221r1_S0295g34737	95	46	RLLR	-		0
Pv68	Plvit221r1_S0293g34653	425	38	RDLR	-	Phosphotransférase (100%)	1
Pv69	Plvit221r1_S0018g09472	180	51	RALR	-	Protéine de liaison au mannose et au glucose (100%)	1
Pv70*	Plvit221r1_S0092g20511	111	40	HNLR	57		0
Pv72	Plvit221r1_S0062g17319	431	33	REER	54	Atr1, effecteur de *H. arabidopsidis* (79.8%)	1
Pv73	Plvit221r1_S0008g07303	134	56	RFRR	-		0
Pv74	Plvit221r1_S0156g26436	207	57	RYLQ	67	Mob1 de la famille des phoceines (80.1%)	1

Tableau 4 : Liste des effecteurs RXLR candidats sélectionnés pour le crible. En blanc les gènes qui ont pu être amplifiés et clonés dans un vecteur binaire pour expression transitoire à l'aide d'*A. tumefaciens.* En gris, les effecteurs séléctionnés qui n'ont pas pu être clonés au cours de la thèse. *, deux allèles de Pv70 ont été clonés.

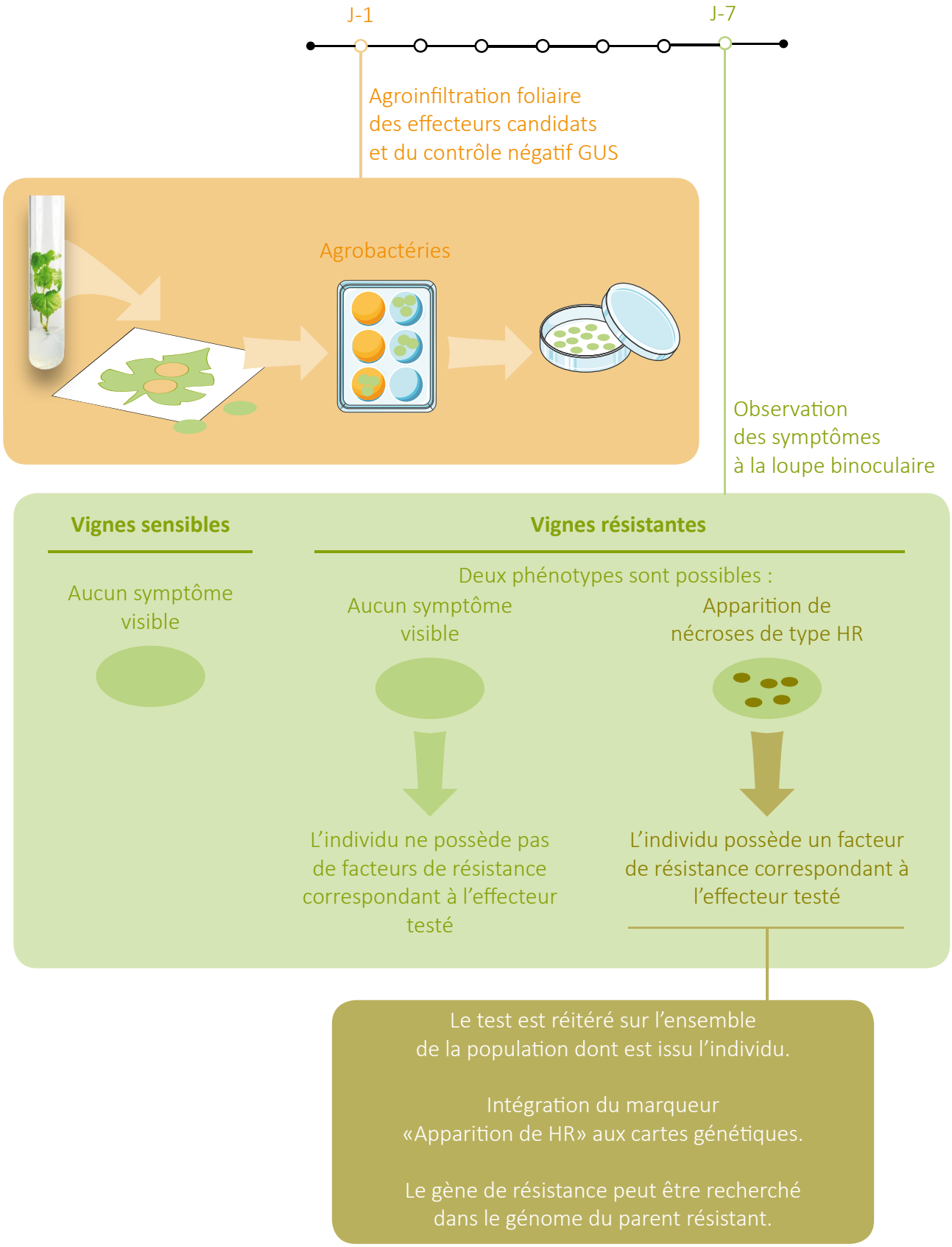


Figure 29 : Procédure utilisée pour identifier des vignes qui possèdent un gène de résistance.
Sur les vignes maintenues *in vitro* ou en serres, les feuilles de rang 2 à partir de l'apex sont récoltées et découpées à l'emporte-pièce puis leur face abaxiale est submergée dans une suspension d'*A. tumfaciens* porteuse du gène codant pour l'effecteur testé ou pour le contrôle négatif GUS ou Myba1. L'adjuvant Silwet L-77® (0.03%) est utilisé pour augmenter la surface de contact entre la suspension bactérienne et le tissu végétal grâce à ses propriétés d'hyper mouillant et de pénétrant. Les disques sont ensuite lavés à l'eau ultra-pure et déposés sur papier Watman humide en boite de Pétri. A partir de 6 jours après agroinfiltration (jpa), les disques sont observés et photographiés à la loupe binoculaire. Des marques de HR sont recherchées sur les disques.

1.2 Choix de la technique de transformation chez la vigne

La transformation transitoire de vigne reposait initialement sur une technique de bombardement de particules d'or sur des calls ou des suspensions cellulaires**,** cette méthode n'est pas compatible avec le crible d'un grand nombre de gènes.

Le bombardement sur des feuilles de vigne n'a pas été décrit dans la littérature. Grâce aux techniques de transformation transitoire de vigne dépendante d'*A. tumefaciens* développés au laboratoire, ainsi que les récentes améliorations apportées par le Dr Lizamore et le Dr Winefield qui permettent de s'affranchir d'une infiltration sous vide, il est possible de réaliser un crible des effecteurs de façon plus rapide **(Santos-Rosa et al., 2008; Lizamore and Winefield, 2015)**. L'affranchissement de l'infiltration sous vide se base sur l'utilisation d'agents mouillants tensio-actifs fréquemment utilisés en agriculture, en particulier l'agent mouillant Silwet L-77®, dont l'efficacité à réduire la tension superficielle et améliorer la transformation génétique a été prouvée dans la transformation d'*A. thaliana* par immersion floral (Floral Dip) **(Clough and Bent, 1998)**. Cependant, cette technique n'est pas sans limitations. En effet, celle-ci peut provoquer des nécroses sur les tissus transformés **(Lizamore and Winefield, 2015)**. Par ailleurs, un effet de l'âge des feuilles de vigne sur l'agro-infiltration a été démontré. En effet, seulement la première feuille étalée, c'est-à-dire la plus jeune complètement développée, présente une expression importante du transgène **(Santos-Rosa et al., 2008)**, faisant que seule une feuille par plante peut être utilisée dans le crible.

Malgré ces limitations, près de 150 disques foliaires peuvent être transformés par un opérateur expérimenté en une journée par agroinfiltration à l'aide du Silwet L-77®, ce qui nous a fait retenir cette technique pour nos expérimentations.

1.3 Plan d'expérimentation

Comme énoncé plus tôt, le but de cette thèse est d'identifier de nouveaux gènes de résistance *a priori* durables. Les gènes de résistance capables de détecter la présence des effecteurs candidats sélectionnés sont recherchés à l'aide d'un crible. Celui-ci se base sur l'expression hétérologue par agroinfiltration des effecteurs dans les tissus foliaires et l'observation de l'activation de défense végétale de type HR. Deux types d'expériences seront effectuées, qui sont décrites ci-dessous et résumées dans la figure **(Figure 29)**.

Identification de couples R/Avr

Un premier crible est réalisé sur des vignes hybrides portant des facteurs de résistance connus dans le but d'identifier des gènes d'avirulence, **(Tableau 5).** Les génotypes utilisés sont issus de trois

Nom code de la population d'origine	Parenté de la population d'origine	Nom code de l'individu hybride	Phénotype	Origine de la résistance			Maintien de la lignée en serre ou en Culture *in Vitro*
				Rpv1	Rpv2	Rpv3	
Population G	[(*V. vinifera* x *M. rotundifolia* cv. G52) x *V. vinifera*] x *V. vinifera* cv. Syrah	0044G	Sensible	S	-	-	CIV et serre
		0125G	Résistant	R	-	-	CIV et serre
		0239G	Résistant	R	-	-	CIV et serre
		0259G	Sensible	S	-	-	CIV et serre
Population H	(*V. vinifera* x *M.rotundifolia* cv. Trayshed) x V. *vinifera* cv. Cabernet Sauvignon	7001H	Résistant	R	S	-	CIV
		7011H	Sensible	S	S	-	CIV
		7035H	Résistant	R	R	-	CIV
		7050H	Résistant	S	R	-	CIV et serre
		7054H	Sensible	S	S	-	CIV
		7039H	Sensible	S	S	-	Serre
		7056H	Sensible	S	S	-	Serre
		7115H	Résistant	R	S	-	Serre
		7180H	Résistant	R	R	_	Serre
Population 18	*V. vinifera* cv. Chardonnay x hybride Bianca	18.013	Résistant	-	-	R	CIV
		18.031	Résistant	-	-	R	CIV et serre
		18.102	Sensible	-	-	S	CIV et serre
		18.110	Sensible	-	-	S	CIV
		18.030	Sensible	-	-	S	Serre
		18.044	Sensible	-	-	S	Serre
		18.063	Résistant	-	-	R	Serre
		18.093	Résistant	-	-	R	Serre

Tableau 5 : Liste des hybrides utilisés pour le crible. Le facteur de résistance Rpv1 a été identifié dans les parents résistants *M. rotundifolia* cv. G52 et cv. Trayshed. Le facteur de résistance Rpv2 a été identifié dans le parent résistant *M. rotundifolia* cv. Trayshed. Le facteur de résistance Rpv3 a été identifié dans le parent résistant hybride Bianca. R: l'individu possède l'allèle de résistance au QTL . S: l'individu ne possède pas l'allèle de résistance au QTL . «-» : le facteur de résistance n'est pas présent chez les parents, CIV : *Culture in vitro*

croisements différents qui ségrégent pour les facteurs de résistance Rpv1, Rpv2 et Rpv3. Rpv1 et Rpv2 sont issus de *M. rotundifolia* et ségrégent dans les populations nommées G et H ; Rpv3 est issu du parent Bianca et ségrége dans la population nommée 18. Exprimer transitoirement les effecteurs RXLR candidats de *P. viticola* chez ces individus permettra d'identifier l'éventuelle apparition d'une mort cellulaire associée à la présence des facteurs de résistance Rpv1, Rpv2 ou Rpv3. Des génotypes issus des mêmes populations mais qui ne portent pas les facteurs de résistance seront utilisés comme témoins.

Identification de nouveaux gènes de résistance

Pour identifier des nouveaux gènes de résistance, un second crible est réalisé sur des vignes résistantes américaines et asiatiques **(Tableau 6)**. Un ou des facteur(s) génétique(s) de résistance ont été déjà décrit(s) pour certaines de ces espèces, mais les bases génétiques de la résistance ne sont pas connues pour toutes. Potentiellement, de nouveaux facteurs de résistance sont à déceler au sein de ces vignes. L'induction d'une HR chez ces génotypes lors de l'expression des effecteurs sera le signe d'une interaction de l'effecteur avec un facteur génétique de résistance, connu ou non. L'éventuelle implication de Rpv1, Rpv2 ou Rpv3 sera discriminé par les résultats du premier crible.

Dans la situation où l'apparition de la HR dépend d'un gène de résistance encore inconnu, la prochaine étape serait de l'identifier. Pour ce faire, une approche par cartographie génétique peut être utilisée. Cette approche consiste à localiser la région du génome impliquée dans l'interaction grâce à une carte génétique. Cette démarche nécessite de réitérer l'expression de l'effecteur sur une population dérivée de l'espèce résistante. Grace au génotypage et phénotypage de cette population, l'apparition de la HR pourra être corrélée avec la résistance et plus tard associée avec du polymorphysme génétique à des loci moléculaires. Des cartes génétiques sont déjà produites au laboratoire avec des marqueurs SSR pour des populations dérivées de différentes espèces : *V. lincecumii, V. cordifolia, V. riparia* Gloire de Montpelier.

La région génomique porteuse de la résistance associée à l'effecteur peut être connue par transposition des cartes génomiques sur les cartes physiques. En réduisant l'intervalle génétique contenant le gène de résistance à l'aide de nouveaux marqueurs et par la génération de nouvelles recombinaisons par croisement, il est possible d'identifier la séquence codant pour le gène de résistance correspondant. Il est attendu que la détection de l'effecteur dépende d'un récepteur de la famille des NBS-LRR, ce qui permet d'orienter la recherche et de réduire le panel de gènes candidats. Il n'est pas envisagé d'aborder les travaux de cartographie et identification de gène de résistance dans le cadre de la thèse, pour des raisons d'ordre temporel.

Genre	Espèce	Cépage/ Accession	Origine	Résistance au mildou	Facteur de résistance identifié	Publication associée au facteur de resistance	Main-tient de la ligné
Vitis	*V. vinifera*	Syrah 150.col.73	France	non			serre
		Kishmish vatkana 90525.Col.1	Ouzbékistan	non			CIV et serre
		Bronner	Allemagne	Forte			CIV
	V. rupestris	8068.mtp.6	Amérique	Forte	Rpv 3	Welter et al 2007 Bellin et al. 2009 Di Gaspero et al. 2012 Zyprian et al. 2016	CIV et serre
	V. amurensis	8003.col1	Chine	Forte	Rpv 10 Rpv 8 Rpv 12	Blasi et al. 2011 Schwander et al. 2012 Venuti et al. 2013	CIV
	V. coignetiae	8028.col1	Japon	Très forte			CIV
	V. monticola	8053.mtp2	Amérique	Très forte			CIV
	V. riparia	Gloire de Montpellier	Américaine (porte-greffe Européen)	Forte	Rpv 5 Rpv 6	Di Gaspero et al. 2012 **Moreira et al. 2011** Marguerit et al. 2009 Guillaumie et al. 2013	CIV
		9006.col1	Amérique				CIV
		8064.mtp48	Amérique				Serre
	V. cordifolia	8029.Mtp1	Amérique	Forte			Serre
	V. lincecumii	8051.col1	Amérique	Très forte			Serre
Muscadinia	*M. rotundifolia*	Regale	Amérique	Totale	Rpv 1 Rpv 2	Merdinoglu et al. 2003 Wiedemann-Merdinoglu et al. 2006	CIV
Hybride	*V. vinifera* *M. rotundifolia*	22-8-78 (hybride)	Amérique	Moyenne	Rpv 1		CIV
	V. labrusca	Concord 6542.col.1 (hybride)	Amérique	Moyenne			CIV

Tableau 6 : Liste des lignées de vigne utilisées pour le crible. Si possible est précisé en gris le n° d'identification de la collection ampélographique du Domaine de Vassal (INRA, Montpellier). Les vignes sont maintenues en serre et/ou en CIV au laboratoire.

Sources :

- http://ephytia.inra.fr/fr/C/6064/Vigne-Cepages-et-bioagresseurs,
- http://www.vignevin-sudouest.com, http://www.vivc.de/,
- Les cépages résistants ICV,
- Données non-publiées du laboratoire

2. Résultats

2.1 Recherche de résistances durables par agroinfiltration d'effecteurs essentiels chez la vigne

Clonage d'effecteurs

Les séquences des 25 effecteurs sélectionnés sont vouées à être clonées chez *A. tumefaciens*, une bactérie tellurique largement utilisée en laboratoire pour transformer de façon stable ou transitoire du matériel végétal **(Kapila et al., 1997; Gelvin, 2003).** Dix-huit des 25 effecteurs candidats ont pu être amplifiés par PCR à partir d'ADNc et d'ADNg extrait de l'isolat SC de *P. viticola* **(Tableau 4, lignes blanches)**. Pour garantir que les protéines seront bien exprimées dans la cellule végétale, les gènes ont été clonés sans leur peptide de sécrétion. Les séquences ont été clonées dans un vecteur binaire et transformées dans le vecteur biologique *A. tumefaciens*. Des allèles ont pu être clonés pour deux effecteurs, nommés Pv70 et Pv55.

Expression transitoire d'effecteurs dans des feuilles de vigne

Étant donné qu'il existe des différences d'efficacité de transformation transitoire entre génotypes de vigne, nous avons utilisé un marqueur de transformation pour valider l'efficacité de transformation sur chaque phénotype et pour chaque expérience. Le contrôle de transformation utilisé au laboratoire est VvMyba1, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse d'anthocyanes **(Kobayashi et al., 2005).** L'intérêt de ce gène comme rapporteur réside dans sa facilité d'utilisation et son faible coût de suivi : la coloration induite est visible à l'œil nu et sa détection ne nécessite aucun équipement particulier. De plus, aucune diffusion de la pigmentation dans les cellules voisines n'a été observée **(Li et al., 2011; Lizamore and Winefield, 2015)**. Son utilisation est donc préférable aux rapporteurs traditionnels GUS et GFP. GUS implique une coloration destructive des échantillons et en plus le produit de la réaction diffuse entre les cellules, ce qui ne permet pas de rendre compte de l'efficacité réelle d'une transformation. La GFP est une protéine fluorescente qui nécessite d'être excitée sous lumière ultraviolette. De plus, la faible intensité du signal rapportée chez la vigne oblige à utiliser un microscope **(Santos-Rosa et al., 2008)**. L'expression de vvMyba1 dans des disques de vigne est visible par l'accumulation d'anthocyanine en ilots bordeaux sur les disques transformés **(Lizamore and Winefield, 2015)**. Ces ilots correspondent aux régions épidermiques où la transformation a été efficace. Des agrobacteries porteuses du gène GUS et des infiltrations avec le tampon de résuspension des bactéries ont également été utilisées au cours du crible pour vérifier l'effet de la pratique expérimentale sur les tissus foliaires.

L'observation des symptômes de l'expression transitoire a lieu à 6 et 11 jours post-agroinfiltration (jpa). L'accumulation d'anthocyanes suite à l'expression de VvMyba1 n'est pas toujours observable à 6 jpa, selon le génotype et le matériel végétal utilisé. Par ailleurs, à 11 jours parfois les disques supportent mal les stress mécaniques lié à la manipulation, se nécrosent et masquent un potentiel phénotype associé au transgène.

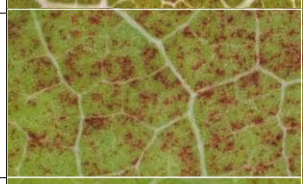
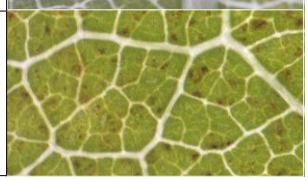
Les observations de l'expression de VvMyba1 sur les différents génotypes ont montré que l'apparition des ilots bordeaux n'est pas systématique et que, comme il était attendu, le nombre d'ilots maximal observé diffère entre génotypes **(Figure 30)**. Après expression du contrôle négatif GUS, des brunissements de type nécroses apparaissent sur les tissus, ce qui arrive aussi avec un contrôle tampon d'infiltration sans agrobactérie **(Figure 31)**. Ces nécroses apparaissent en points épars et généralement elles sont présentes en faible quantité. La quantité de ces nécroses et leur fréquence d'apparition sont aléatoires sur chaque génotype et entre différents lots de plantes. Ces nécroses seront donc à prendre en compte pour le crible des effecteurs sur les différents génotypes.

L'ensemble des effecteurs clonées ont été exprimés sur chaque génotype de vigne au minimum trois fois au cours de la thèse et sur 4 à 5 disques pour chaque réplica. Un total de 612 combinaisons effecteur/génotype ont été réalisées. Aucun symptôme majeur n'a été observé en dehors des nécroses induites par l'expérimentation. Aucune correspondance entre la présence des nécroses et celle d'un gène de résistance, connu ou nouveau, n'a pu être mise en évidence dans le cadre de ces expériences.

Suivi de l'expression de gènes marqueurs après expression transitoire d'effecteurs RXLR dans des feuilles de vigne

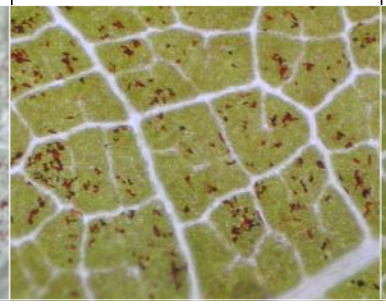
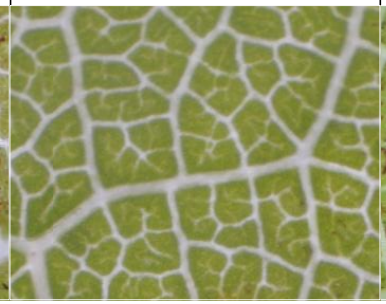
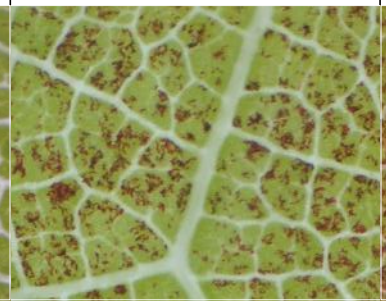
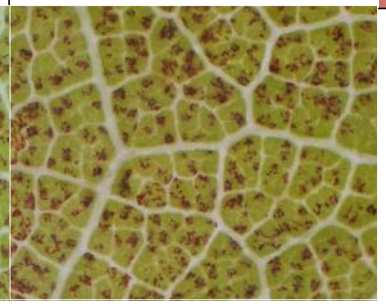
Puisque la présence de nécroses est susceptible de masquer l'observation macroscopique d'une réponse de type HR sur les disques de vigne, j'ai décidé de suivre des marqueurs spécifiques de l'induction de HR. Cependant, à la différence des cellules animales, il est extrêmement difficile de différencier les types de mort cellulaire chez les plantes, tant au niveau microscopique comme moléculaire **(Van Doorn et al., 2011)**. De plus, les marqueurs déjà décrits ne se prêtent pas à une utilisation dans un crible semi-automatisé et dont l'efficacité d'agroainfiltration reste souvent faible. Par exemple, le suivi des phytoalexines par excitation sous lumière bleue n'est pas viable sur des disques de vigne agroinfiltrés, car le faible nombre d'ilots transformés rend difficile l'observation de ce marqueur.

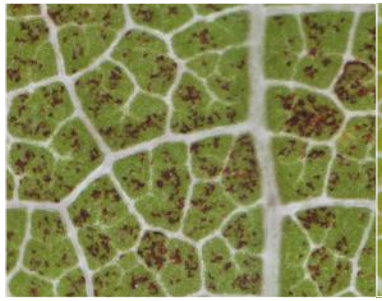
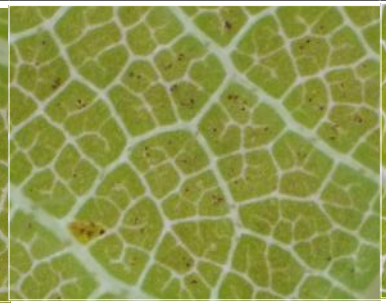
Je me suis donc tournée vers la vérification de l'expression du gène marqueur de mort cellulaire *VvHSR*. Une induction de *VvHRS1* a été observée après infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinera* **(Bezier, 2002)** ou expression transitoire de sa protéine nécrotique NEP1

Nom de la population		
Population G	0044G	
	0125G	
	0239G	
	0259G	
Population 18	18.013	
	18.031	
	18.102	
	18.110	
	18.030	
	18.044	
	18.093	

Nom de la population		
Population H	7001H	
	7011H	
	7035H	
	7050H	
	7054H	
	7039H	

Figure 30 : Variabilité de la production d'anthocyanine des disques de vigne qui exprime *VvMyba1*. La première feuille étalée de vigne cultivée *in vitro* est sectionnée et agroinfiltrée en disque à l'aide du surfactant Silwet L-77 (0.03%) pendant 10 minutes. Les photographies sont réalisées à la loupe binoculaire 11 jours après agroinfiltration. Les disques présentant le maximum de cellules transformées sont utilisés dans la figure. L'apparition et le nombre de colorations bordeaux sont détectées aléatoirement entre les génotypes de vigne, les individus d'un même génotype et les répétitions.

Vitis					Genre
V. coignetiae	*V. rupestris*	*V. vinifera*			Espèce
8028.col1	8068.mtp.6	Bronner	Kishmish vatkana 90525.Col.1	Syrah 150.col.73	Cépage
					

Vitis				Genre
V. cordifolia	*V. riparia*			Espèce
8029.Mtp1	8064.mtp48	9006.col1	Gloire de Montpellier	Cépage
				

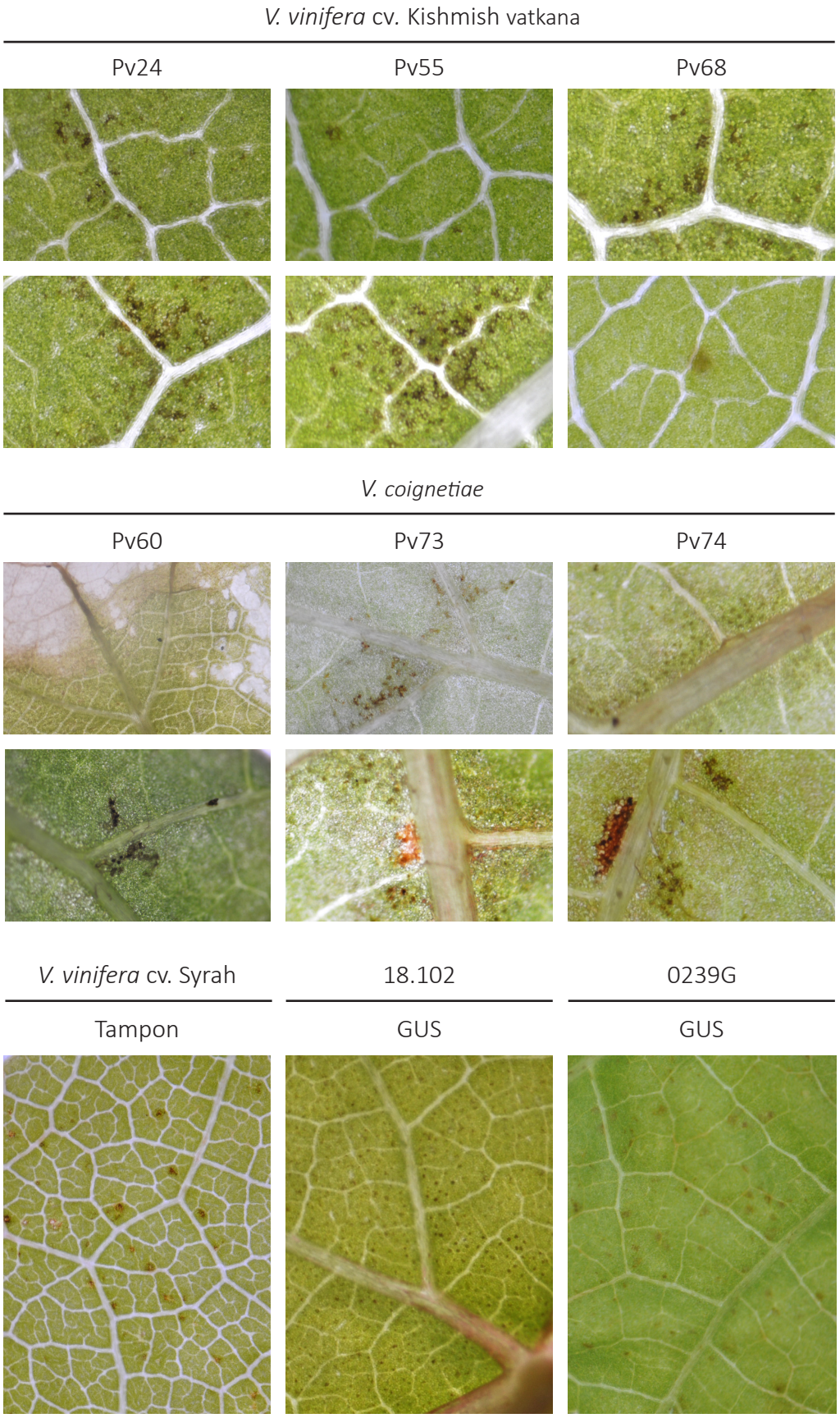


Figure 31 : L'agroinfiltration de disques foliaires de vigne induit des nécroses à la surface de l'épiderme. La première feuille étalée de vigne cultivée *in vitro* est sectionnée et agroinfiltrée en disque à l'aide du surfactant Silwet L-77 (0.03%) pendant 10 minutes. Les photographies sont réalisées à la loupe binoculaire 11 jours après agroinfiltration. L'apparition et le nombre de colorations brunes, ainsi que les décolorations chloroplastiques, sont détectées aléatoirement entre les génotypes de vigne, les répétitions et les conditions testées.

(Chong et al., 2014). Par ailleurs, l'expression de *VvHSR1* est induite lors de la mise en place de la résistance au mildiou par le gène *Rpv3* **(Casagrande et al., 2011)**.

Le suivi de l'expression de *VvHSR* a été fait par RT-PCR semi-quantitative cinq jours après agroinfiltration. Des expériences de validation de l'approche montrent que la sensibilité de l'expression de *VvHSR* aux stress mécaniques et chimiques induits par l'expérimentation peut varier entre expériences et entre génotypes **(Figure 32).** La détection d'une réponse de type HR après expression des effecteurs RXLR candidats sur disques de vigne en mesurant l'accumulation du transcrit *VvHSR* semble possible, mais les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution, et plusieurs répétitions des expériences seront sans doute nécessaires

2.2 Approches alternatives pour l'identification de gènes Avr et de résistances durables

Au vu des difficultés rencontrées avec la stratégie d'expression transitoire par agroinfiltration d'effecteurs RXLR sur des feuilles de vigne, d'autres approches ont été abordés au cours de la thèse pour identifier des couples R/Avr et des nouveaux gènes de résistance.

2.2.1 Recherche d'un couple gène R/Avr *via* expression hétérologue sur *N. benthamiana*

Un problème associé au crible basé sur l'expression transitoire d'effecteurs sur feuilles de vigne est l'absence de contrôle positif, c'est à dire un couple gène R/Avr identifié chez la vigne et *P. viticola* qui, quand on exprime le gène Avr en présence du gène R, déclenche une HR. Dès lors, nous n'avions pas la certitude que le déclenchement d'une nécrose de type HR par nos approches serait détectable avec le bruit de fond causé par le Silwet L-77®.

Parmi les facteurs de résistance contre le mildiou identifiés chez la vigne, le gène *Rpv1* a été identifié et cloné **(Feechan et al., 2013)**. L'identification du gène *Avr* correspondant à *Rpv1* non seulement augmenterait notre connaissance du pathosystème mais aussi permettrait de disposer d'un témoin pour confirmer ou infirmer la validité de notre approche. L'expression transitoire de couples R/Avr chez *Nicotiana benthamiana* pour étudier leurs interactions et les réponses qu'ils induisent a été largement décrite dans la littérature **(Bendahmane et al., 2000; Zhang et al., 2004; Moffett et al., 2002)**.

Les 18 effecteurs de type RXLR clonés au cours de la thèse, plus 14 autres clonés avant mon arrivée ont été co-exprimés avec *Rpv1* sur des feuilles de *N. benthamiana via* une agroinfiltration réalisée par la pression d'une seringue sans aiguille. L'apparition de nécroses a été suivie sur les six

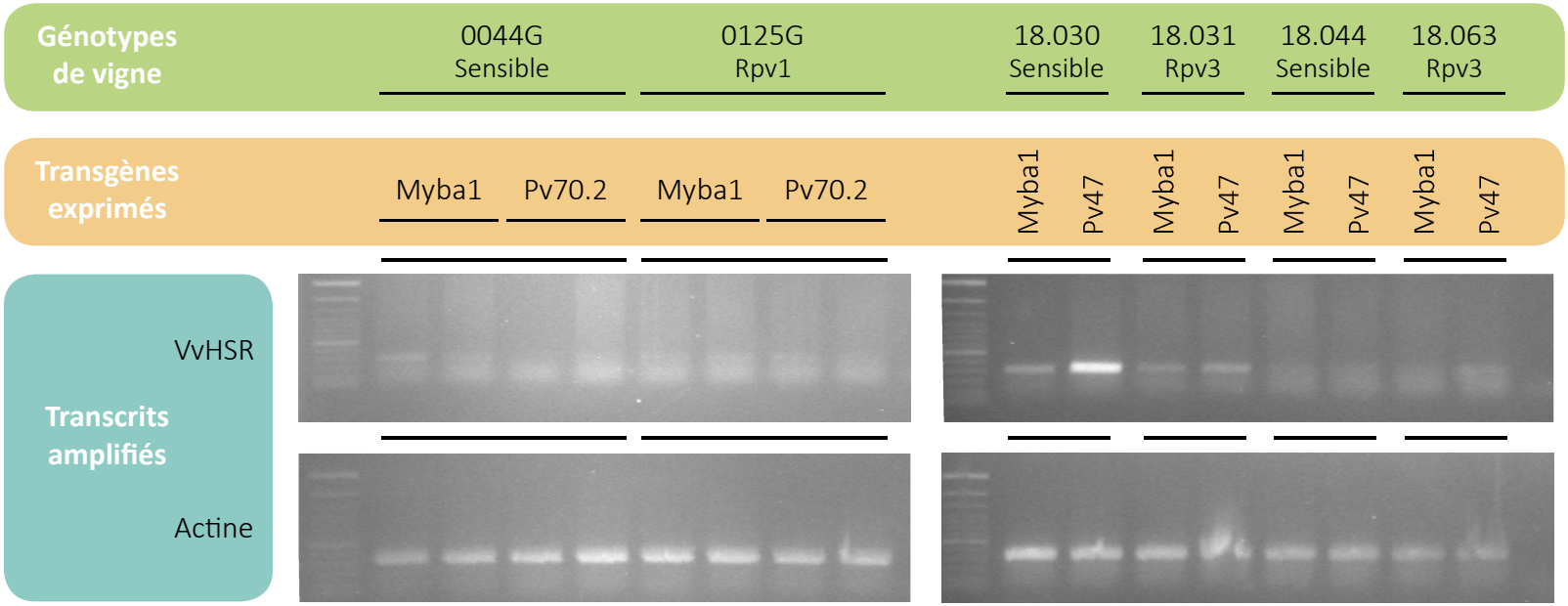


Figure 32 : Suivi de l'expression du gène marqueur de la HR, VvHSR, sur des disques de vigne exprimant les effecteurs candidats Pv70.2 et Pv47. La première feuille étalée de vigne cultivée in vitro est sectionnée et des disques sont agroinfiltrés avec *A. tumefaciens* en présence du surfactant Silwet L-77 (0.03%) pendant 10 minutes. Deux jours après l'agroinfiltration, les ARN sont extraits et les transcrits sont amplifiés par RT-PCR.

jours suivants **(Figure 33)**. Aucun des effecteurs testés n'a conduit à une induction de mort cellulaire, suggérant qu'ils ne sont pas reconnus par *Rpv1* dans les conditions de notre test.

2.2.2 Infiltration foliaire des effecteurs RXLR candidats après production hétérologue par *Pichia pastoris*

Les freins principaux aux cribles des effecteurs RXLR candidats sur les génotypes de vigne reposent sur la faible efficacité de la transformation génétique du modèle, réduisant la disponibilité des effecteurs candidats dans les tissus végétaux, et aussi sur le stress phyto-toxique dû à l'agroinfiltration. Une alternative qui permettrait de s'affranchir de ces obstacles serait de produire l'effecteur en amont de l'infiltration des disques de vigne. Elle repose sur une expression hétérologue de protéines et une infiltration directe de la protéine purifiée dans les tissus végétaux. Dans cette stratégie, nous faisions l'hypothèse que la protéine, une fois dans l'apoplasme, serait capable de rentrer dans les cellules à l'aide du motif RXLR. J'ai choisi une approche d'expression hétérologue par la levure *Pichia pastoris*. C'est une approche à moyen débit mise en place par le Dr Jean-Baptiste Lopez au cours de son doctorat sous la direction de l'Assoc. Prof. Radutoiu et du Pr Stougaard à l'Institut for Molekylærbiologi og Genetik de l'Université de Århus au Danemark. Cette méthode a été utilisée pour une approche d'effectoromique afin d'identifier des gènes de résistance contre la ramulariose de l'orge, une maladie induite par le champignon *Ramularia collo-cygni*. Grâce à l'aide financière permise par une bourse EMBO de mobilité courte-durée, j'ai eu l'opportunité d'être formée par l'équipe danoise pour transposer l'approche aux effecteurs RXLR candidats de *P. viticola*.

Procédure du clonage en levure des effecteurs RXLR candidats

Les séquences des effecteurs candidats sont clonées dans le plasmide pPICZα-GFP optimisé par le Dr. Lopez à partir du plasmide commercial pPICZα. Ce plasmide commercial place l'expression des effecteurs sous le contrôle d'un promoteur AOX1 (*Alcohol oxidase 1*) inductible au méthanol **(Tschopp et al., 1987)** et permet l'insertion du peptide de sécrétion du α-factor de levure. Les protéines clonées seront donc sécrétées dans le milieu de culture. Ce vecteur possède également le gène SH du blé qui permet une sélection à l'antibiotique zéocine. Les améliorations apportées ont permis l'insertion de la région codante GFP en C-terminal, en amont des tags myc et histidine originaux **(Figure 34).**

L'approche a été appliquée à 28 effecteurs candidats de *P. viticola* (comprenant les 25 effecteurs RXLR séléctionnés ainsi que trois effecteurs WY présentés plus tard dans ce manuscrit). Le frein possible à cette approche est que l'entrée des effecteurs RXLR dans les cellules végétales après infiltration n'ait pas lieu de façon autonome. Afin de confirmer la validité de la stratégie, la séquence

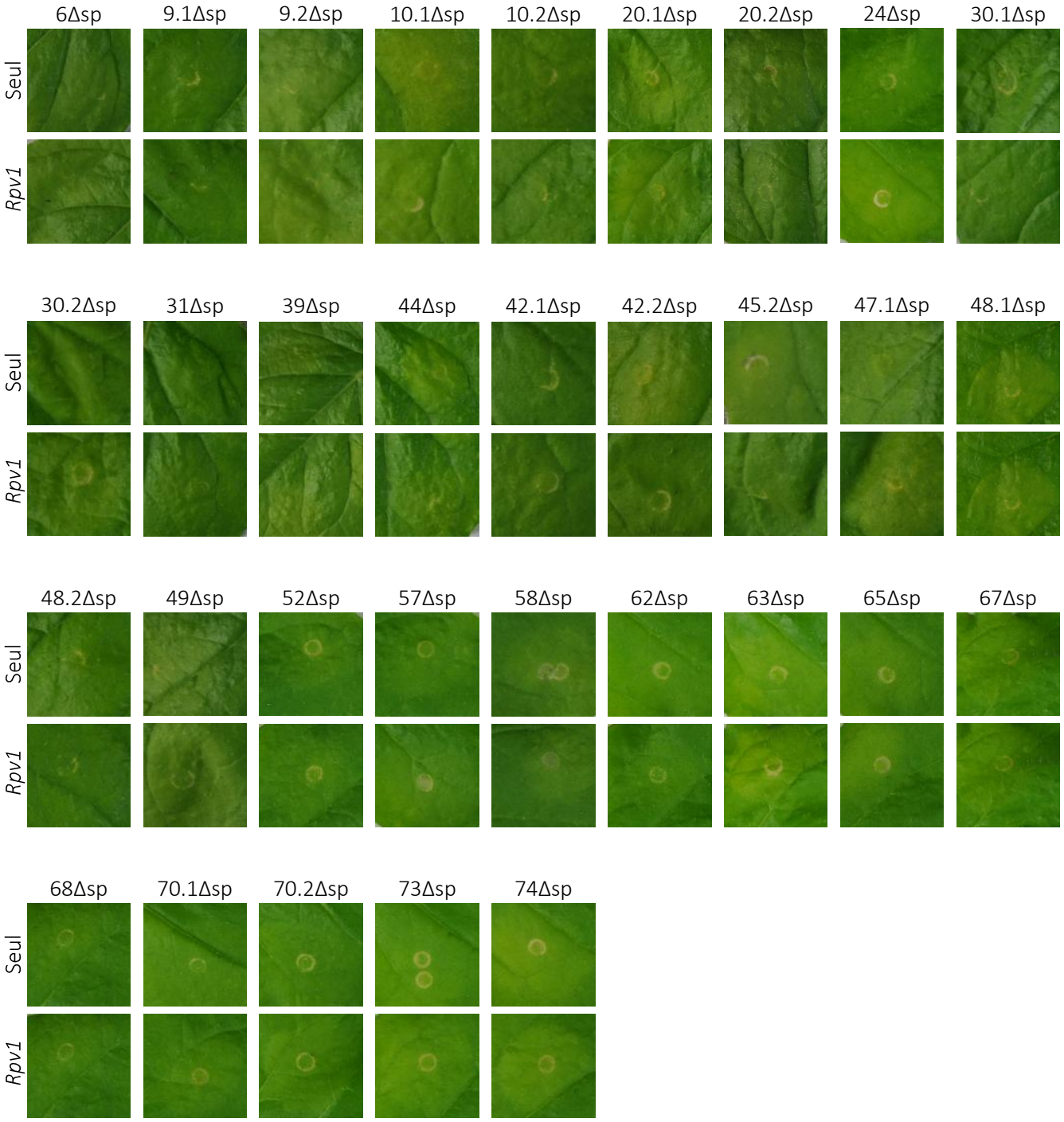


Figure 33 : Co-expression de *Rpv1* et des effecteurs RXLR de *P. viticola* chez *N. benthamiana.* Agroinfiltration de constructions permettant l'expression transitoire des effecteurs candidats RXLR sans leur peptide signal dans des feuilles de *N. benthamiana.* Les photographies des feuilles (face supérieure) ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration. Les expériences ont été répétées 3 fois.

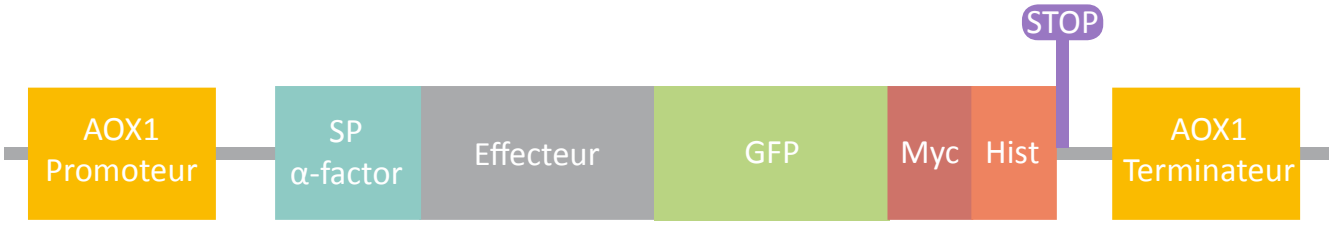


Figure 34 : Schéma de la construction de Ppiczα-GFP. Le promoteur AOX1 peut être induit par méthanol et reprimé par glucose. Le peptide signal de la levure est optimisé pour contenir le même site d'initiation que le peptide endogène. Adapté de la thèse de Jean-Baptiste Lopez.

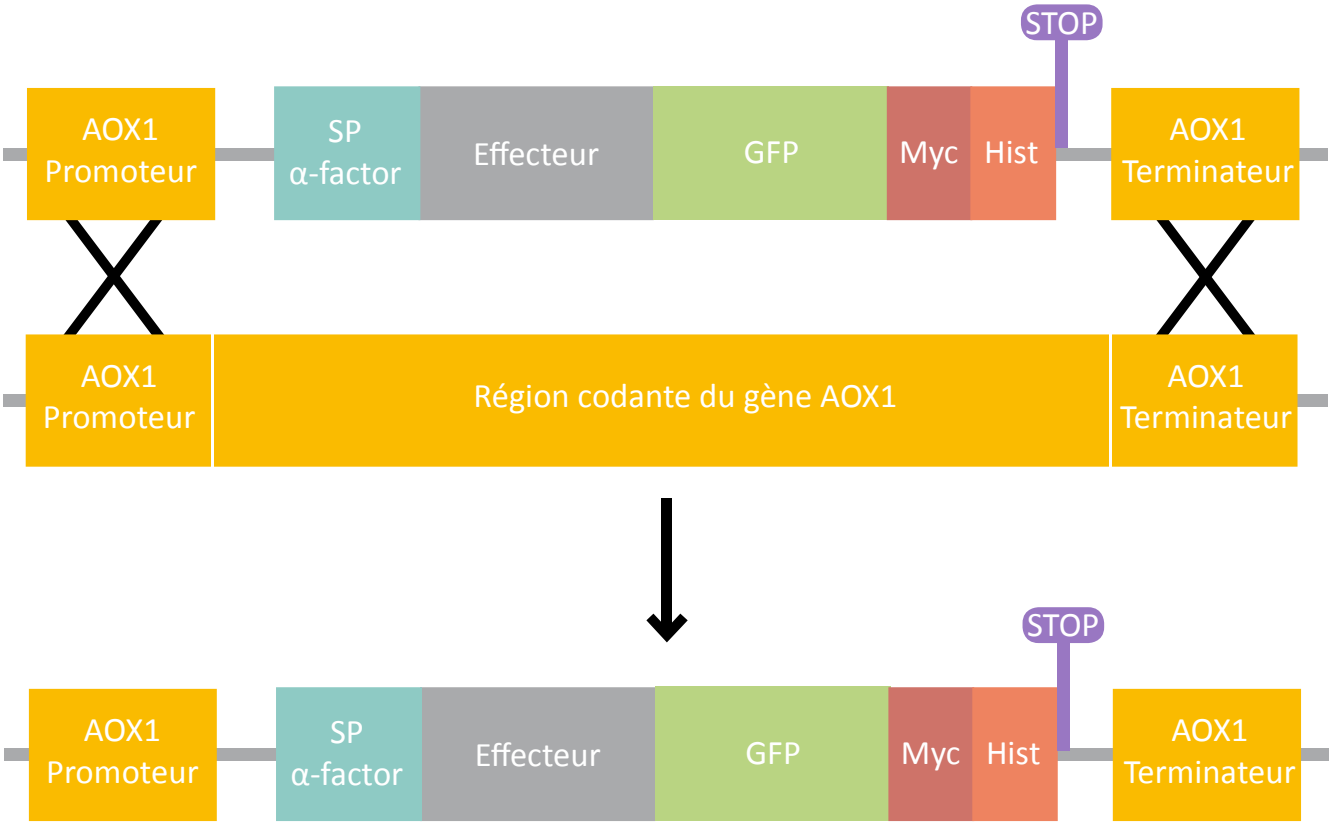


Figure 35 : Schéma de la recombinaison de la construction dans la séquence de AOX1 présente dans le génome de *P. pastoris*. Adapté de la thèse de Jean-Baptiste Lopez.

du motif RXLR de Avr3a, un effecteur intracellulaire de *Phytophthora infestans*, a été clonée fusionnée en N-terminal du gène marqueur GFP.

Le clonage est effectué en deux étapes. La première se fait dans *E. coli* en haut débit avec la technologie de clonage SLIC (*Sequence-and Ligation-Independent Cloning*) **(Li and Elledge, 2012)**. Le clonage est validé par séquençage. La seconde étape est la transformation de *P. pastoris,* où les constructions sont directement insérées dans le génome de la levure **(Figure 35)**. Ce type de clonage peut conduire à des insertions multiples **(Ahmad et al., 2014),** par conséquent une sélection sous haute concentration d'antibiotique permet de conserver les clones produisant le plus de protéine. De ce fait, la production ne sera jamais équivalente pour les différentes constructions malgré une concentration de méthanol inducteur identique. Dix-huit des 28 effecteurs candidats, plus les contrôles, ont été clonés.

Procédure de production des effecteurs RXLR candidat par *P. pastoris*

Les effecteurs clonés sont placés sous le contrôle d'un promoteur inductible au méthanol et sont fusionnés avec un peptide de sécrétion de levure. La croissance de la levure dans un milieu avec du méthanol permettra donc la sécrétion des protéines dans le milieu de culture. Après deux jours de croissance dans le milieu sélectif, les levures sont transférées dans un milieu d'induction WM8 dépourvu de sucre. Le milieu est supplémenté par 5 % de méthanol qui est utilisé par la levure comme unique source de sucre, cette caractéristique permet un contrôle de transformation. *P. pastoris* est connue pour secréter un faible nombre de protéine dans le surnageant ; de ce fait, l'effecteur peut arriver à constituer jusqu'à 80% des protéines du milieu de culture. Une simple centrifugation permet d'obtenir un surnageant de culture enrichie en effecteur.

Une première validation de l'expression de protéines peut être faite rapidement. La fluorescence de la GFP permet de contrôler sous lumière UV le niveau de production et de sécrétion des constructions dans le surnageant des milieux de culture. Le surnageant des cellules de levure non transformées n'a montré aucune fluorescence au contraire des levures transformées avec les constructions GFP et RXLR GFP (motif RXLR de Avr3A fusionné à la GFP) **(Figure 36)**. La production des effecteurs candidats et l'absence de clivage de la GFP peut être validée par électrophorèse de protéines et coloration au bleu de Coomassie.

Pour valider la stratégie d'infiltration directe de protéines RXLR, les surnageants de culture de levures non-transformées et transformées par pPICZα-GFP ou pPICZα-RXLR-GFP ont été infiltrées dans des feuilles de *N. benthamiana* **(Figure 37)**. Six heures après infiltration, la fluorescence de la GFP a été observée par microscopie confocale. L'infiltration du surnageant de levure non transformée n'a pas montré de fluorescence **(Figure 37, A)**. Après infiltration de pPICZα-GFP, des signaux ont été observées

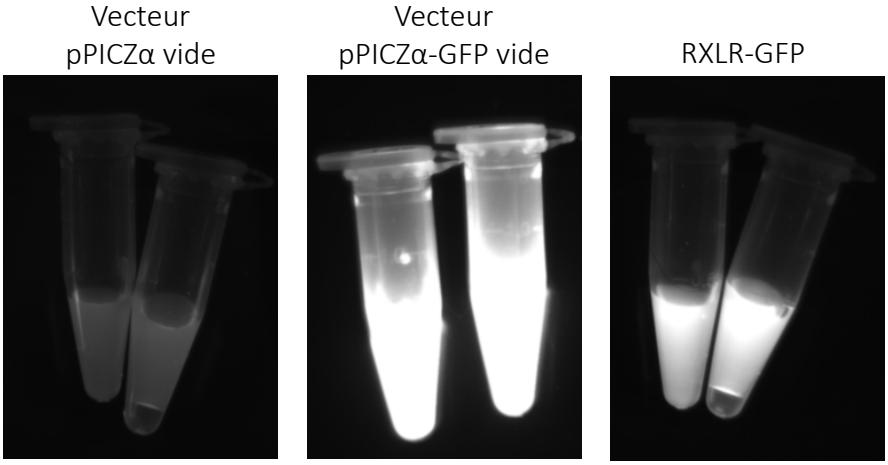


Figure 36 : Vérification de la production de GFP par *P. pastoris* transformé. Photographies prises à 6 jours post induction sous lumière bleue. Les cultures qui sont transformées avec le vecteur vide pPICZα ne permettent pas de voir de fluorescence contrairement aux cultures qui sont transformées par le vecteur vide pPICZα-GFP et la construction pPICZα-RXLR-GFP.

sur les contours des cellules épidermiques **(Figure 37, B et C)**. Des zooms réalisés permettent d'observer un dédoublement du signal au niveau des membranes, ce qui laisserait entendre que la GFP peut diffuser à travers la paroi **(Figure 37, Zoom 1).** Des renforcements du signal punctiformes aux niveaux des membranes sont visibles et peuvent potentiellement correspondre à des plasmodesmes **(Figure 37, Zoom 2)**. De très rares noyaux sont visibles **(Figure 37, D)**. Les tissus foliaires infiltrés par la construction pPICZα-RXLR-GFP ont montré une localisation de la fluorescence très similaire à celle observée pour pPICZα-GFP, cependant le signal semble plus diffus autour des membranes **(Figure 38, A et B).** La GFP libre a une localisation au noyau et au cytoplasme ; l'absence de signal nucléaire pour la GFP avec la construction pPICZα-RXLR-GFP suggère donc que la protéine de fusion ne rentre pas dans les cellules végétales.

Infiltration des effecteurs RXLR candidats purifiés sur des disques de vigne

Le milieu inducteur utilisé par le Dr Lopez avait été optimisé pour permettre une infiltration foliaire directe des effecteurs chez l'orge et *N. benthamiana.* Ainsi, une simple centrifugation isole le milieu non phyto-toxique concentré en effecteur, ce qui permet de se soustraire à une étape de purification. Des tests d'infiltration sous-vide de ce même milieu ont été réalisés sur vigne. Un blanchiment et une coloration brune ont été observés sur certaines feuilles sur la semaine qui suit l'infiltration **(Figure 39).** Le milieu semble être phyto-toxique pour les feuilles de vigne. Deux stratégies sont possibles pour remédier à ce frein : la première est d'optimiser le milieu pour la vigne ; la seconde est de purifier les effecteurs à l'aide des tag myc ou histidine et les resuspendre dans un milieu non toxique pour la vigne.

Finalement, des problèmes non identifiés ont fait que la production des effecteurs n'a pas pu être reproduite au laboratoire de Colmar, nécessitant une nouvelle transformation des levures. Dans ces circonstances et vu les résultats peu encourageants obtenus pour la fusion RXLR-GFP **(Figure 38)**, cette approche a été suspendue.

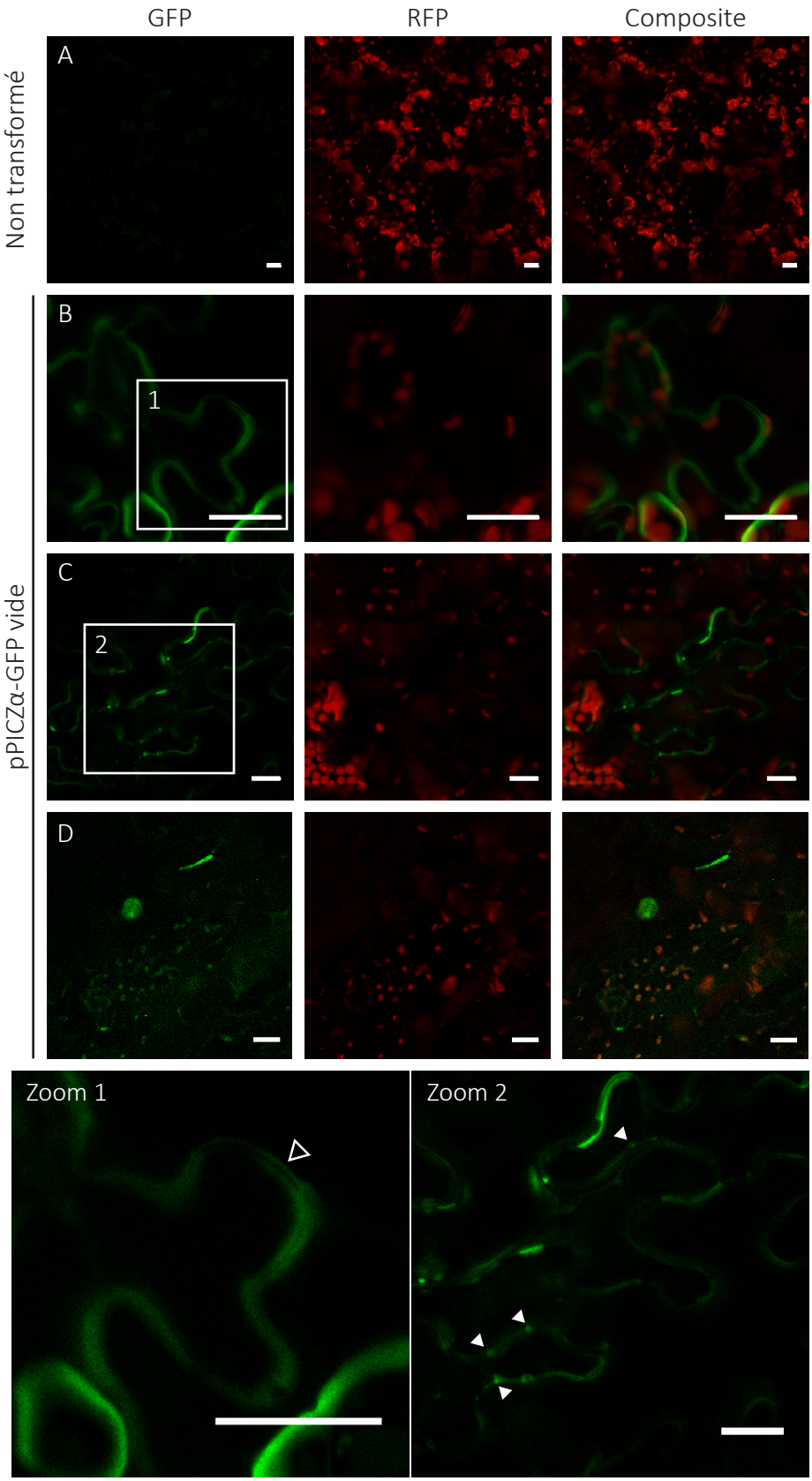


Figure 37 : Infiltration d'une protéine GFP chez *N. benthamiana* produite chez *P. pastoris*. Une souche de *P. pastoris* transformée à l'aide d'une construction permettant la sécrétion d'une protéine GFP est cultivée en milieu nutritif 24h avant d'être transférée en milieu d'induction supplémenté en méthanol pendant 24h. 100 µl de surnageant de culture de levure est infiltré dans des feuilles de *N. benthamiana*. La fluorescence est observée 6 heures après infiltration (hpi) par microscopie confocale. Pour chaque ligne, une image en fluorescence verte (GFP) ou rouge (Plastes) et une image superposant les fluorescences sont montrées. **(A)** Les feuilles de *N. benthamiana* sont infiltrées par le surnagent d'une culture de *P. pastoris* non transformée. **(B à D)** Les feuilles de *N. benthamiana* sont infiltrées par le surnageant d'une culture de *P. pastoris* qui exprime et sécrète la GFP. **(B et Zoom 1)** Le signal GFP est dédoublé à l'interface entre les cellules épidermiques (flèches vides). **(C et Zoom 2)** Des renforcements du signal sont visibles entre les cellules épidermiques (flèches pleines). **(D)** De rares signaux nucléaires sont visibles. Barre d'échelle : 25 µm.

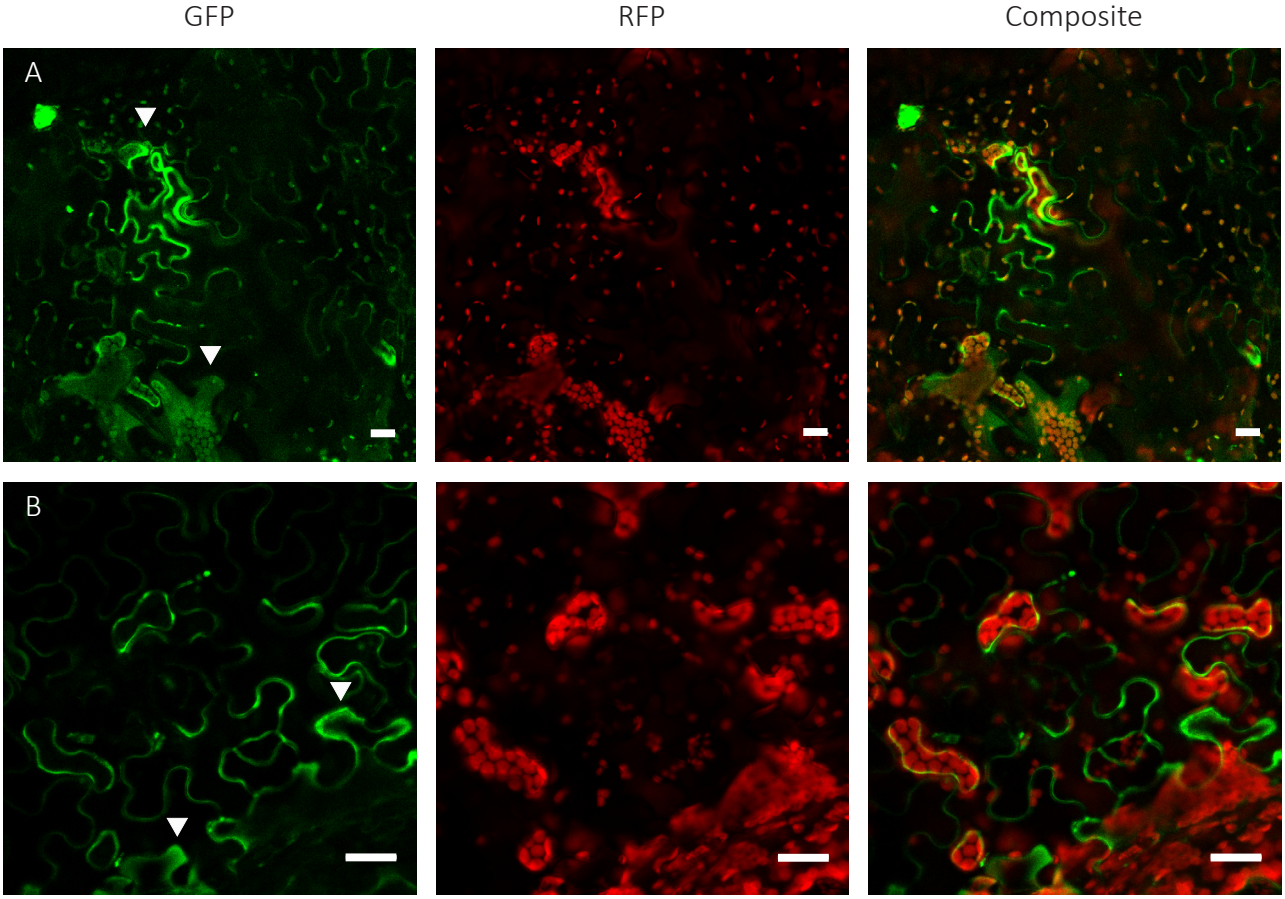


Figure 38 : Infiltration d'une protéine RXLR-GFP chez *N. benthamiana* produite chez *P. pastoris.* Une souche de *P. pastoris* transformée à l'aide d'une construction permettant la sécrétion d'une protéine chimérique RXLR-GFP est cultivée en milieu nutritif 24h avant d'être transférée en milieu d'induction supplémenté en méthanol pendant 24h. 100 µl de surnageant de culture de levure est infiltré dans des feuilles de *N. benthamiana*. La fluorescence est observée 6 heures après infiltration (hpi) par microscopie confocale. Pour chaque ligne, une image en fluorescence verte (GFP) ou rouge (Plastes) et une image superposant les fluorescences sont montrées. **(A et B)** Observation des cellules épidermiques de *N. benthamiana* infiltrées. Flèches pleines: fluorescence spécifique de la GFP potentiellement intracellulaire. Barre d'échelle : 25 µm.

3. Discussion

La stratégie de recherche de gènes de résistance par expression transitoire d'effecteurs n'a pas permis d'identifier de nouvelles résistances.

Notre hypothèse de départ était que l'expression transitoire par agroinfiltration d'effecteurs de type RXLR sur des plantes de vigne pourrait conduire à l'apparition d'une mort cellulaire de type HR que signifierait l'identification d'un nouveau gène de résistance et/ou du gène d'avirulence chez l'agent pathogène. Dix-huit effecteurs conservés et exprimés ont été donc utilisés pour cribler des espèces résistantes dans le but d'identifier des potentielles résistances durables. En parallèle, ces gènes ont été aussi exprimés sur des génotypes de vigne portant des gènes de résistance connus, avec le but d'identifier les gènes *Avr* correspondants. Aucune de ces expériences n'a conduit à l'identification d'une mort cellulaire associée à un effecteur.

Une première explication pour ce résultat serait le nombre d'effecteurs utilisés. Seulement 18 effecteurs RXLR ont été testés sur 51 effecteurs candidats à fort potentiel, et ces derniers ont été sélectionnés à partir d'un total de 256 effecteurs candidats. Ouvrir le crible à un plus grand nombre d'effecteurs pourrait nous amener à l'apparition d'une HR incontestable qui validerait notre stratégie.

Le choix d'effecteurs aurait aussi pu jouer un rôle dans l'échec de la stratégie. La sélection d'effecteurs sur la base de leur expression à 48 hpi pourrait correspondre à un temps un peu tardif. Choisir des effecteurs exprimés plus tôt dans le cycle infectieux serait une alternative à prendre en compte. En effet, les observations microscopiques de tissus de vigne infectés par le mildiou montrent la présence d'haustoria à 24 hpi **(Diez-Navajas et al., 2008)**. Par ailleurs, l'expression d'effecteurs RXLR de *P. viticola* dès 6 hpi a été montrée **(Mestre et al., 2012; Gómez-Zeledón and Spring, 2018)** et l'effecteur RXLR de *Phytophthora parasitica* PSE1, très précocement exprimé, a été montre comme jouant un rôle dans la virulence de l'agent pathogène **(Evangelisti, 2013)**. Malheureusement, très peu de reads de RNA-Seq ont été obtenus à 24 hpi, nous empêchant d'établir de claires différences d'expression entre effecteurs candidats à des temps précoces. Par ailleurs, la sélection d'effecteurs conservés peut avoir influencé l'absence de résultats dans la recherche de gènes d'avirulence correspondant à des gènes de résistance connus. En effet, la pression de sélection exercée par un gène de résistance conduit à une variabilité du gène d'avirulence correspondant, qui peut être détectée dans des analyses de génétique de populations en forme de sélection positive. Les gènes très conservés utilisés lors de notre crible n'auront pas subi ces forces de sélection. Il est donc peu probable qu'ils correspondent à des gènes *Avr*. L'utilisation de gènes plus variables, idéalement montrant des signatures de sélection positive, pourrait être une stratégie plus productive pour la recherche de gènes *Avr*.

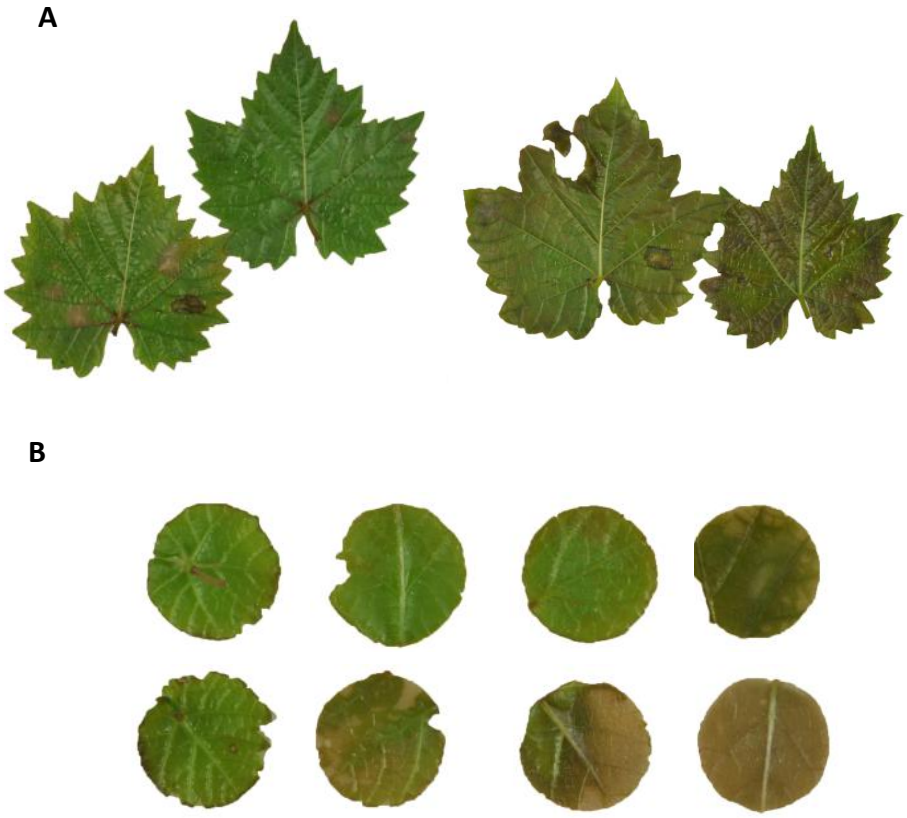


Figure 39 : Le milieu WM8 est responsable de l'apparition de symptômes nécrotiques sur *V. vinifera* cv. Syrah. La première feuille étalée de vigne cultivée in vitro est sectionnée et infiltrée par du milieu WM8. L'infiltration a été réalisée sous vide en trois étapes de deux minutes, **(A)** en feuilles entières et **(B)** en disques. Les photographies ont été réalisées 10 jours après infiltration.

Un autre facteur qui pourrait expliquer l'absence de résultats serait que la méthodologie d'expression transitoire utilisée ne soit pas adaptée à l'objectif : en effet, le niveau d'expression obtenu est limité et nous n'avons pas de couple R/Avr connu pour être utilisé comme témoin et valider notre démarche. De plus, l'efficacité de la transformation est variable selon les génotypes, ce qui avait déjà été décrit **(Santos-Rosa et al., 2008) (Zottini et al., 2008).** Un problème supplémentaire réside dans le fait que la procédure induit des morts cellulaires. En effet les symptômes de type HR que nous recherchons et les brunissements provoqués par l'expérimentation sont difficiles voire impossibles à discerner. Sur des plantes très réceptives à la transformation comme *V. vinifera* cv. Syrah, le nombre des ilots nécrotiques en conditions contrôles reste très inférieur au nombre d'ilots qui présentent la coloration bordeau en condition VvMyba1. Sur les génotypes plus réfractaires, le nombre d'ilots colorés par l'expression de VvMyba1 et nécrosés dans les conditions contrôle sont très proches. Le crible est donc opérationnel seulement pour les génotypes qui se transforment facilement.

L'utilisation d'*A. tumefaciens* comportait le risque d'observer l'apparition de réactions de défense sur des tissus foliaires **(Kuta and Tripathi, 2005)**. En effet cette bactérie est pathogène de vigne **(Hemstad and Reisch, 1985; Perl et al., 1996; Zheng et al., 2003; Armijo et al., 2016)**. La production de ROS et l'apparition de nécroses a déjà été observé en réponse à *A. tumefaciens* en contact avec des tissus foliaires, des explants et des embryons de vigne **(Pu and Goodman, 1992; Deng et al., 1995; Perl et al., 1996; Das et al., 2002)**. Cependant, nos observations de nécroses lors d'infiltrations faites avec le tampon de resuspension des bactéries montrent que ce sont principalement la manipulation et le tampon utilisé qui seraient en cause des brunissements observés au cours de nos expérimentations. L'induction de nécrose par l'adjuvant Silwet L-77® sur des disques foliaires de vigne a déjà été décrite **(Lizamore and Winefield, 2015).** Les auteurs mentionnent l'apparition de nécroses à forte concentration de Silwet L-77® (au-dessus de 0.10%(v/v)) ou lorsque le temps de contact est prolongé (20 min) et ils préconisent de rechercher un équilibre entre la concentration de Silwet L-77® et le temps de traitement selon les génotypes pour des résultats optimaux. Nous avons observé l'apparition des nécroses à des concentrations et temps de contact (à 0.03% (v/v) de Silwet L-77® et 10 min de traitement) considérés comme étant optimaux **par (Lizamore and Winefield, 2015)**. Nos tests n'ont cependant pas été réalisés sur les mêmes génotypes de vigne que l'équipe Néo-Zélandaise.

Une solution possible aux problèmes d'induction de mort cellulaire consisterait à changer la méthode d'agroinfiltration. Récemment, Brilli et ses collaborateurs ont montré que l'expression transitoire de l'effecteur RXLR PVITv1008311 de *P. viticola* conduit au déclenchement d'une HR foliaire chez *V. riparia* **(Brilli et al., 2018)**. La différence entre leur approche de la nôtre est technique : l'agroinfiltration reprend celle détaillée par **(Zottini et al., 2008)** qui utilise une seringue sans aiguille.

Cette infiltration permet de la transformation sur une aire qui se limite à la zone de pression de la seringue. La zone est limitée mais reste suffisante pour observer le déclenchement d'un HR. En revanche l'apparition de nécrose non spécifique par des dégradations mécaniques arrive souvent *via* cette pratique **(Zottini et al., 2008)**. Toutefois, cet effecteur pourra être utilisé comme contrôle positif de notre approche. La première étape sera de reproduire le phénotype observé par **(Brilli et al., 2018).** L'agroinfiltration de *V. riparia* avec Myba1 n'a pas montré une très grande efficacité de transformation sur ce cépage. Cet effecteur permettrait de réaliser une comparaison des deux techniques d'agroinfiltration, l'une dépendante du Silwet L-77® et l'autre de l'utilisation de la seringue, sur un génotype difficile à transformer. Par ailleurs, d'autres auteurs ont décrit des techniques d'agrotransformation foliaire de vigne sur plante entière basée sur la combinaison de l'utilisation d'un agent surfactant, des blessures créées par sonication, et de l'infiltration sous vide à haute pression **(Ben-Amar et al., 2013)**. Cependant, cette méthode exerce aussi un stress important sur la plante.

Finalement, d'autres voies sont possibles pour la recherche de gènes R *via* effectoromique, cependant elles font appel à des compétences et des matériels qui ne sont pas disponibles au laboratoire. Par exemple, la transformation de cultures cellulaires est potentiellement plus facile que celle réalisée au cours de la thèse. Cette approche nécessite cependant la mise en place de cultures cellulaires pour chacune des lignées testées et leur maintien en continu au laboratoire, ce qui comporte une charge de travail considérable et dont le succès peut être très génotype dépendant.

Les approches alternatives utilisées pour la recherche de gènes de résistance et de couples R/Avr ont aussi des limitations.

Des approches alternatives ont été abordées pour essayer de contourner le problème du faible niveau d'expression transitoire chez la vigne et les nécroses souvent associées à la procédure.

Une première tentative a consisté à profiter du clonage du gène *Rpv1* **(Feechan et al., 2013)** pour le co-exprimer avec les effecteurs chez *N. benthamiana*, en espérant voir apparaitre une réponse d'HR. Ces expériences non seulement pouvaient conduire à l'identification du gène *Avr* pour *Rpv1* mais aussi elles pourraient fournir un contrôle positif pour le crible par agroinfiltration chez la vigne. Cependant, le criblage d'une trentaine d'effecteurs n'a pas conduit à l'identification de mort cellulaire. Comme c'était le cas pour les expériences chez la vigne, cet échec est probablement la conséquence du faible nombre d'effecteurs utilisés pour le crible. Il est également envisageable que ce gène de résistance ne fonctionne pas normalement chez *N. benthamiana,* comme il a été montré pour d'autres cas d'expression hétérologue **(Bent and Mackey, 2007).** Cependant, la facilité de réalisation de cette expérience nous amène à l'utiliser dans le futur au fur et à mesure que des nouveaux effecteurs seront clonés.

Expression hétérologue en levure

Dans une stratégie d'effecteromique, la production des effecteurs par des levures suivie de l'infiltration directe de la protéine purifiée est une approche très intéressante pour remplacer l'agroinfiltration chez les plantes peu réceptives à la transformation génétique, comme c'est le cas de la vigne. La fusion au marqueur GFP et les étiquettes histidine et myc permettent de suivre la localisation de la protéine par microscopie à fluorescence ou par immunolocalisation, et aussi de rechercher les interactants par co-immunoprécipitation. Cette technique prometteuse nécessite cependant des mises au point. Des résultats récents obtenus par l'équipe de l'Université d'Aarhus montrent que le tag GFP à tendance à être clivé pour 40% des protéines. Ce clivage peut réduire d'autant l'efficacité de la purification dépendant de la GFP. Un autre point à modifier serait l'utilisation du méthanol comme inducteur du promoteur AOX1. Le méthanol étant un composé toxique, les risques liés à son utilisation pourront être évités en utilisant un promoteur AOX1 rendu inductible au glucose-glycérol **(Wang et al., 2017a).**

L'infiltration des effecteurs purifiés dans les tissus se fait *via* les stomates par pression physique à l'aide d'une seringue sans aguille ; les protéines infiltrées se retrouvent dans l'apoplasme et franchissent facilement les parois cellulaires pour avoir accès aux membranes des cellules ; en effet, bien que la paroi constitue une barrière, l'eau et les particules de taille inférieure à 4 nm peuvent diffuser à travers **(Lodish et al., 2000)**. Cette approche est donc très efficace pour l'étude des effecteurs apoplastiques, qui exercent leur fonction à l'extérieur des cellules, mais elle n'a pas été validée pour les effecteurs intracellulaires. Au niveau de la membrane plasmique, l'entrée de protéines est plus complexe. Elle peut avoir lieu par des transporteurs actifs et spécifiques ou *via* la voie d'endocytose, mais par cette dernière voie les éléments internalisés restent séparés du cytoplasme par les membranes vésiculaires. Au cours de l'infection les agents pathogènes développent des interfaces d'échange pour notamment permettre l'internalisation ; ainsi, oomycètes et champignons développent des haustoria en contact avec la membrane cellulaire invaginée et différenciée appelée EHM (de l'anglais *Extra Haustorial Matrix*) **(Hardham, 2007)**. Chez les champignons, des hyphes différenciés peuvent directement sécréter des effecteurs capables de traverser paroi et membrane cellulaire pour atteindre le cytoplasme des cellules de l'hôte. D'après les analyses de séquences des effecteurs, les motifs responsables de la translocation se situent dans le domaine N-terminal et différents motifs comme RXLR, LFLAK et CHXC chez les oomycètes, RGD chez les toxines de certains nécrotrophes, sont supposés impliqués dans ce processus **(Schornack et al., 2010; Petre and Kamoun, 2014**).

Certains auteurs ont proposé que l'entrée des effecteurs RXLR dans la cellule végétale pouvait avoir lieu en absence de l'agent pathogène. En effet, le trafic d'effecteurs RXLR couplés à la GFP du

compartiment apoplastique au cytoplasme a été observée pour des effecteurs de *P. sojae,* entre autre Avr1b **(Kale et al., 2010; Sun et al., 2013).** Cependant, ces travaux ont fait l'objet de controverse dans la communauté scientifique, et les mécanismes qui permettent aux agents pathogènes filamenteux l'internalisation des effecteurs restent actuellement inconnus et constituent une question fondamentale en phytopathologie **(Petre and Kamoun, 2014**). De plus, dans les expériences décrites dans ces travaux l'incubation des protéines a été réalisée au niveau racinaire, et l'absorption par les poils racinaires, bien que contrôlée par des transporteurs actifs, reste un mécanisme très sollicité par rapport aux cellules de l'épiderme foliaire. Les différences dans la composition et l'organisation des membranes des deux organes peuvent être importantes et aussi impliquer une translocation différente des effecteurs RXLR. En conséquence, l'approche d'infiltration de protéines purifiées présentait le risque que les effecteurs candidats RXLR purifiés infiltrés dans l'apoplasme ne soient pas internalisés dans les cellules végétales.

Les résultats obtenus avec la construction RXLR-GFP, qui conduit à l'expression de la GFP fusionnée avec le motif RXLR de Avr3A de *P. infestans* en N-terminal, semblent confirmer l'absence d'internalisation de la protéine, même si ces expériences doivent être répétées. De plus, les travaux de Wawra et collaborateurs ont montré qu'un clivage du motif RXLR d'Avr3a par l'oomycète, ainsi qu'une acétylation de la protéine clivée, ont lieux avant sa sécrétion, à l'image de ce qui a été décrit pour les effecteurs au motif similaire PEXEL chez l'agent du paludisme **(Boddey et al., 2010; Hofmann, 2017; Wawra et al., 2017)**. Le motif RXLR ne serait alors plus nécessaire à la translocation chez l'hôte mais uniquement au cours de la sécrétion par l'agent infectieux. Dans la majorité des études qui se basaient sur une expression hétérologue en plante, les effecteurs conservaient le RXLR dans la séquence codante. Cette découverte implique de revisiter les recherches précédentes, car le motif RXLR ne devrait pas faire partie de la protéine à l'intérieur de la plante en conditions d'infection. Les constructions en levure des effecteurs candidats de *P. viticola* ont été dessinées en conservant le motif RXLR, ce qui paradoxalement pourrait être un frein à l'internalisation cellulaire dans le cas où le motif se révèle nécessaire à la sécrétion et ne joue pas de rôle dans l'internalisation. Toutes ces observations nous ont conduits à arrêter le projet de façon temporaire.

4. Conclusion

La stratégie de recherche de gènes de résistance et de couples R/Avr à l'aide de l'expression transitoire d'effecteurs candidats n'a pas conduit à des résultats positifs. Le faible nombre d'effecteurs utilisés est probablement la raison principale de cet échec. De plus, le faible niveau d'expression obtenu avec la méthodologie utilisée, le bruit de fond, la variabilité d'expression entre génotypes et l'absence d'un contrôle positif de nature R/Avr, compliquent l'interprétation des résultats. Des

méthodes alternatives, comme l'infiltration directe dans les feuilles de protéines purifiées suite à leur expression en levure, ont été essayées mais il semblerait que cette méthode ne permette pas l'internalisation des effecteurs dans les cellules végétales.

Toutes ces circonstances nous ont amené à mettre de côté cette approche dans le cadre de la thèse, au profit d'une étude fonctionnelle des effecteurs de *P. viticola*, étude qui sera décrite dans les prochains chapitres.

Chapitre 2 : Caractérisation fonctionnelle d’effecteurs RXLR candidats

En parallèle à l'utilisation des effecteurs de *P. viticola* pour l'identification de gènes d'avirulence et la recherche de résistances durables chez la vigne, une analyse fonctionnelle des effecteurs de *P. viticola* a été démarrée au cours de cette thèse. Il existe trois stratégies pour étudier la fonction d'un effecteur d'un organisme phytopathogène. La première est d'inactiver son expression dans le microorganisme. La seconde est de sur-exprimer le gène à l'aide d'un promoteur fort. La dernière est d'exprimer ce gène dans la plante hôte. Aucune de ces approches n'est facile à mettre en place pour le modèle *P. viticola-V. vinifera.* En conséquence, nous avons choisi d'exprimer des effecteurs de *P. viticola* dans des plantes modèles aisément transformables transitoirement : *N. benthamiana* ***(Bashandy et al., 2015; Leuzinger et al., 2013; Sheludko et al., 2007)****, N. tabacum* ***(Sparkes et al., 2006)*** *et N. occidentalis.* Travailler sur des *Nicotiana* est une approche courante dans l'étude des interaction plantes-pathogène **(Goodin et al., 2008)**. Il sera néanmoins nécessaire de valider tous les résultats obtenus sur la plante hôte elle-même avant de valider le rôle de l'effecteur dans l'interaction vigne-mildiou.

Ce chapitre décrit le criblage phénotypique d'effecteurs de la famille RXLR et l'analyse fonctionnelle préliminaire de l'un d'entre eux, nommé Pv44. La progression rapide de nos concurrents dans l'étude des effecteurs de type RXLR nous a convaincu de mettre en pause l'étude de cette famille dans le cadre de la thèse pour nous concentrer sur l'étude des effecteurs à motif WY et plus particulièrement sur deux effecteurs potentiels dont l'expression transitoire *in planta* donnait lieu à un phénotype : Pv33 et Pv47. Ces résultats seront présentés dans les chapitres 3 et 4.

1. Étude fonctionnelle des effecteurs RXLR de *P. viticola*

1.1 Criblage des effecteurs RXLR sur *N. benthamiana*

Les effecteurs des organismes phytopathogènes ont pour fonction de modifier le métabolisme de la plante hôte pour favoriser l'infection. Une modification essentielle pour la réussite de l'infection est la suppression de défenses végétales. En effet, plusieurs effecteurs de différents organismes phytopathogènes (oomycètes, champignons, bactéries) suppriment les défenses de la plante **(Göhre and Robatzek, 2008)**. J'ai donc étudié la capacité des effecteurs RXLR de *P. viticola* à supprimer les défenses végétales. Parallèlement, j'ai aussi évalué la capacité de ces effecteurs à induire des réponses immunitaires chez la plante, ce qui a été décrit pour plusieurs effecteurs RXLR chez *P. viticola* **(Liu et al., 2018b; Xiang et al., 2016, 2017).**

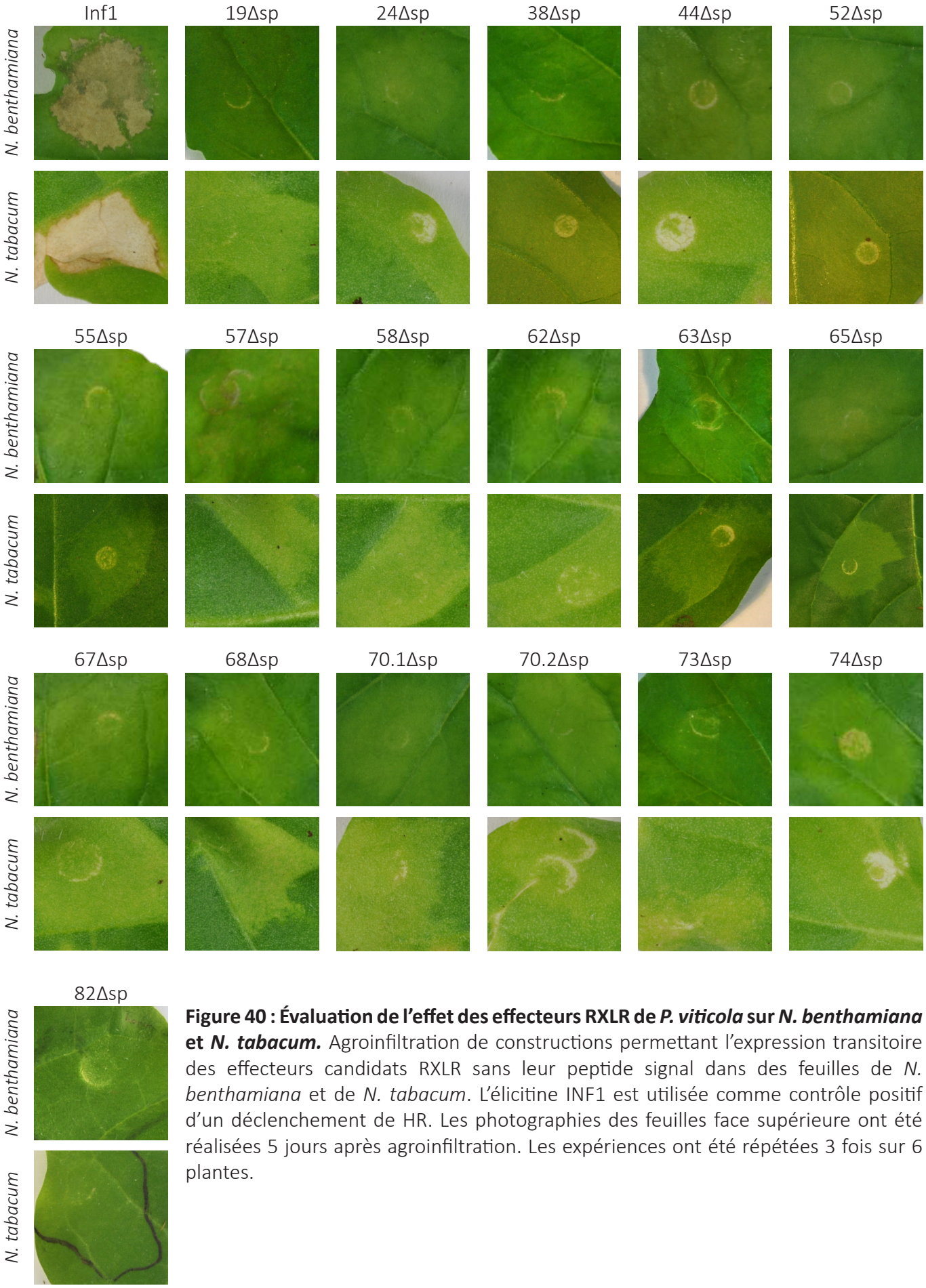


Figure 40 : Évaluation de l'effet des effecteurs RXLR de *P. viticola* sur *N. benthamiana* et *N. tabacum*. Agroinfiltration de constructions permettant l'expression transitoire des effecteurs candidats RXLR sans leur peptide signal dans des feuilles de *N. benthamiana* et de *N. tabacum*. L'élicitine INF1 est utilisée comme contrôle positif d'un déclenchement de HR. Les photographies des feuilles face supérieure ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration. Les expériences ont été répétées 3 fois sur 6 plantes.

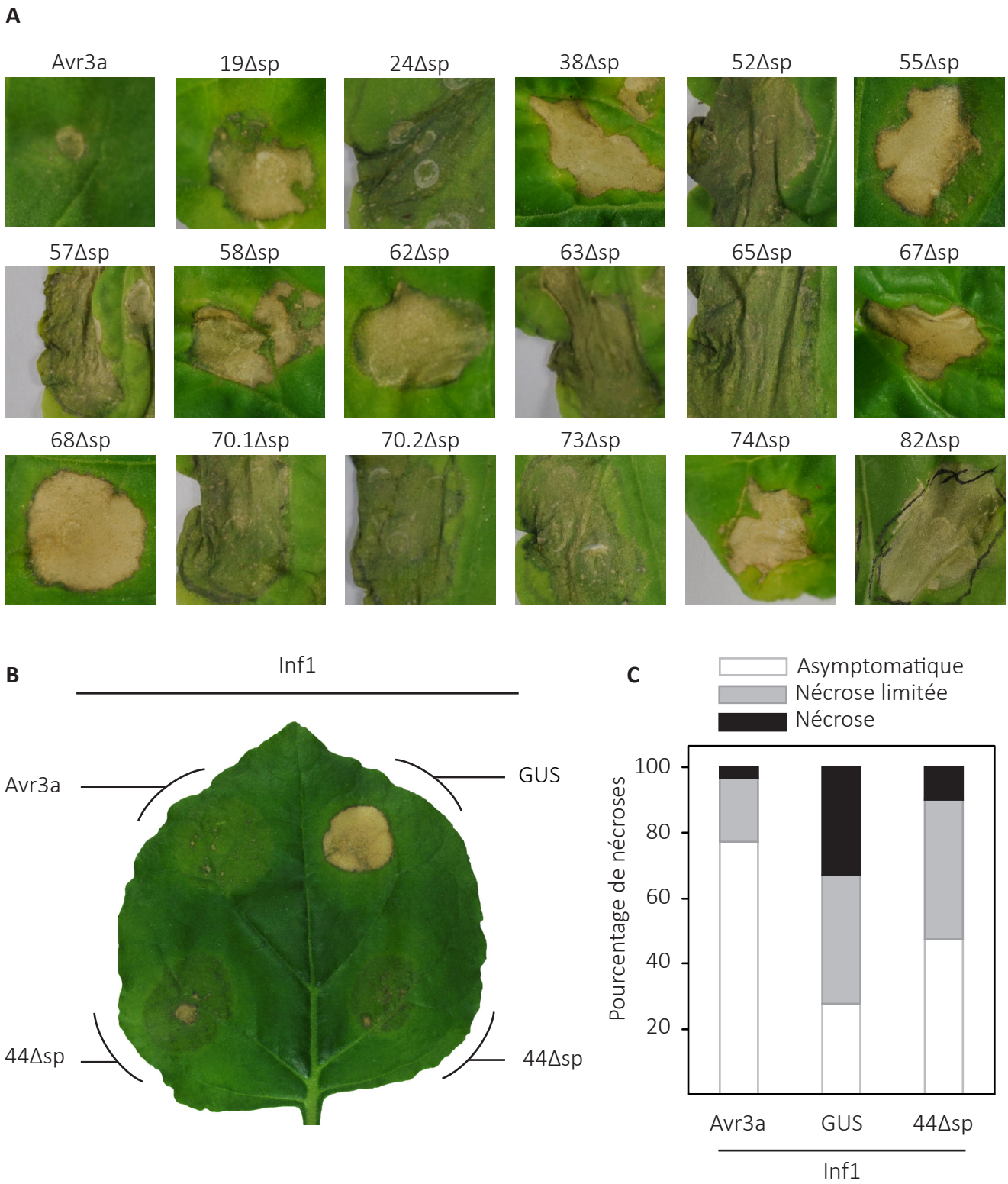


Figure 41 : Évaluation de la capacité de suppression de la HR de INF1 par les effecteurs RXLR candidats de *P. viticola*. Agroinfiltration de constructions permettant l'expression transitoire des effecteurs candidats RXLR sans leur peptide signal dans des feuilles de *N. benthamiana* suivie 24h après par l'agroinfiltration de INF1. Avr3a est utilisé comme contrôle positif d'un blocage de la mort cellulaire et GUS comme contrôle négatif. Les photographies ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration. Les expériences ont été répétées 3 fois sur 10 plantes.

1.1.1 Évaluation de la capacité des effecteurs RXLR d'induire la mort cellulaire chez *N. benthamiana*

La capacité des effecteurs RXLR candidats de *P. viticola* à provoquer une mort cellulaire végétale a été évaluée. Chacun des effecteurs décrits dans le Chapitre 1 a été exprimé transitoirement par agroinfiltration sur feuilles de *N. benthamiana* (**Figure 40)**. Les effecteurs ont été clonés sans leur peptide signal pour assurer leur expression dans la cellule végétale. Les symptômes ont été observés entre 4 et 6 jours après l'agroinfiltration. Contrairement au contrôle positif INF1 aucune nécrose n'est détectée sur les tissus agroinfiltrés. Parmi les 18 effecteurs testés, aucun effecteur n'a déclenché de mort cellulaire chez *N. benthamiana et N. tabacum*.

1.1.2 Évaluation de la capacité de suppression de défenses des effecteurs RXLR

La suppression de mécanismes de défense par des effecteurs de type RXLR a déjà été décrite de nombreuses fois pour plusieurs pathosystèmes. L'étude de la capacité d'inhiber la HR déclenchée après la reconnaissance du PAMP INF1 de l'oomycète *Phytophthora infestans* permet un criblage rapide et facile de la suppression des défenses de la plante. La capacité de suppression de la HR induite par INF1 a été testée pour chacun des effecteurs candidats. L'effecteur RXLR de *P. infestans* AVR3a qui est capable de bloquer la HR déclenchée par INF1 **(Bos et al., 2006)** a été utilisé comme témoin positif. Les constructions ont été agroinfiltrées séquentiellement au cours de l'expérimentation : en premier lieu l'effecteur puis INF1 vingt-quatre heures plus tard (afin de s'assurer que l'expression de l'effecteur précède celle de l'élicitine) **(Figure 41)**. Pour 17 effecteurs étudiés, la nécrose induite par INF1 est toujours présente **(Figure 41, A)**. En présence de Pv44, la proportion de tissus nécrosés est plus faible **(Figure 41, B)**. Pv44 réduit la HR induite par INF1.

1.2 Analyse fonctionnelle de l'effecteur Pv44 de *P. viticola*.

Suite aux résultats du criblage, les mécanismes d'action de Pv44 sont étudiés. La recherche de la localisation subcellulaire et l'effet sur le développement de différents agents pathogènes chez *N. benthamiana* initient la caractérisation fonctionnelle de l'effecteur Pv44.

1.2.1 Validation du phénotype de suppression de mort cellulaire.

Avant d'approfondir les recherches, des expériences supplémentaires ont été réalisées pour valider le phénotype de suppression de mort cellulaire de Pv44. Étant donné l'effet de Pv44 sur la HR induite par INF1, un contrôle de la bonne transformation par INF1 a été effectué. En effet il est

envisageable que Pv44 inhibe le transfert de l'ADNt et que l'absence de mort cellulaire observée soit causée par l'absence d'expression d'*INF1*. Pour le vérifier, l'agroinfiltration de l'effecteur a été suivie par celle du gène marqueur GFP (*Green Fluorescence Protein*) **(Figure 42)**. Si l'effecteur causait une inhibition de la transformation par Agrobacterium, on devrait observer un signal GFP diminué ; en cas contraire, un signal GFP inchangé. De façon surprenante le signal est augmenté en présence de Pv44 et également d'AVR3a. Le test de suppression par Pv44 de la mort cellulaire déclenchée par INF1 est donc validé.

Lors des différentes expériences d'agroinfiltration de Pv44 sur N. benthamiana, des lésions ont pu apparaître transitoirement sur les tissus transformés **(Figure 43, A)**. Ces lésions sont visibles uniquement sur la face inférieure des feuilles. L'observation des patchs sous lumière bleue à 5 jpa a conduit à la détection d'un signal **(Figure 43, B)** qui pourrait correspondre à la production de phytoalexines **(Langcake and Pryce, 1976)**. Ces symptômes apparaissent de façon très sporadique entre chaque répétition et pourraient expliquer en partie l'augmentation de la fluorescence observée lors de l'infiltration séquentielle de Pv44 et GFP.

1.2.2 Localisation cellulaire de Pv44 chez *N. benthamiana*

La localisation subcellulaire de Pv44 chez *N. benthamiana* été recherchée. Pour connaître le compartiment cellulaire d'adressage de Pv44, sa séquence sans peptide signal (44Δsp) a été fusionnée à la GFP pour obtenir la construction 44Δsp-GFP **(Figure 44)**. La GFP libre, qui est localisée dans le cytoplasme et le noyau, a été utilisée comme contrôle **(Figure 44, A)**. Les observations microscopiques révèlent que le signal de 44Δsp-GFP s'accumule majoritairement dans le cytoplasme avec un faible signal dans le noyau, moitié moins important que celui de GFP **(Figure 44, B et C)**. D'après ces observations il est probable que la localisation majoritaire de Pv44 soit le cytoplasme et qu'une diffusion de l'effecteur dans le noyau, ou un clivage de la GFP, soient responsables de la faible localisation nucléaire. En complément de ces observations, des points de 0.5 à 1 µm marqués à la GFP et non marqués ont été aussi observés **(Figure 44, D)**.

1.2.3 Étude de l'effet de l'expression de Pv44 sur les défenses de la plante

La suppression des défenses par un effecteur impliquerait que les plantes exprimant cet effecteur soient plus sensibles à des agents pathogènes. Au cours de la thèse, j'ai eu l'occasion de tester l'effet de l'expression de Pv44 sur les défenses de la plante à l'aide de cinq agents pathogènes aux stratégies d'infection diverses : les oomycètes *P. viticola* et *P. parasitica* respectivement biotrophe et hémibiotrophe, le virus X de la pomme de terre (PVX) et le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Il faut noter qu'il s'agit de recherche exploratoire, très fréquemment les résultats qui n'ont

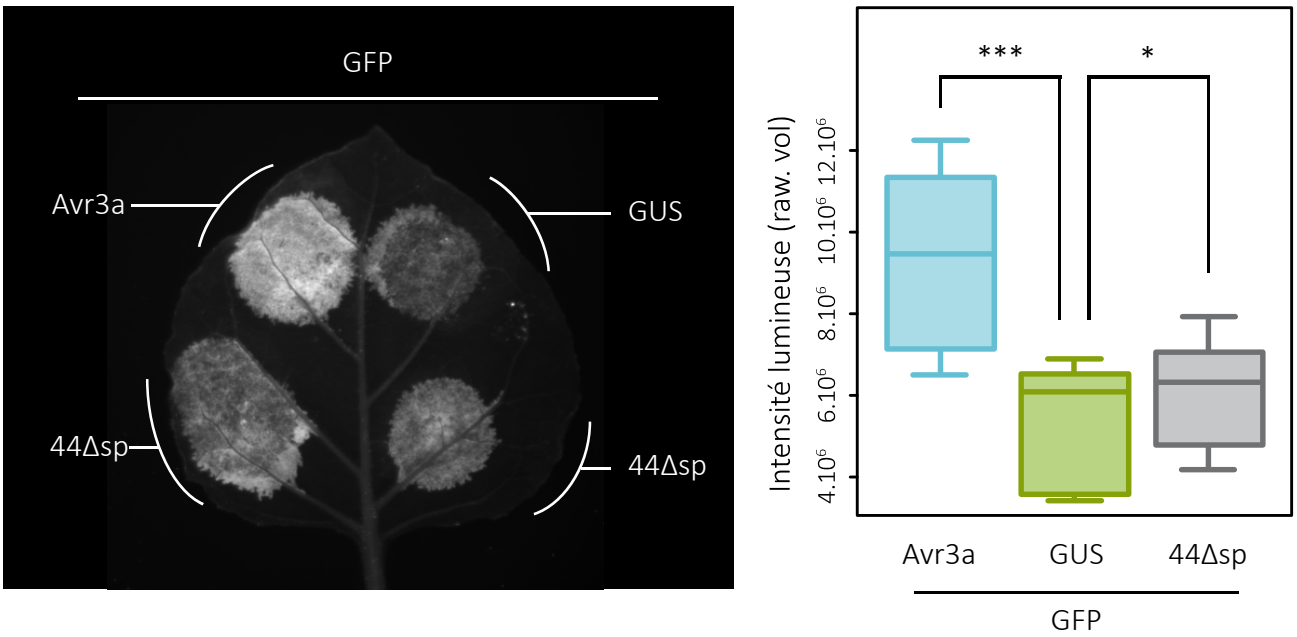


Figure 42 : Vérification du succès de l'agroiniltration de GFP après Pv44. Agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de *44Δsp* dans des feuilles de *N. benthamiana* suivi 24h après par l'agroinfiltration de GFP. Les photographies ont été réalisées 4 jours après agroinfiltration sous lumière bleue. L'intensité lumineuse des patchs a été mesurée par ImageJ. Les expériences ont été répétées sur 10 plantes. Les résultats ont été obtenus sur un réplicat représentatif parmi trois. La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk avant analyse à l'aide d'un test T de Student apparié. Les différences significatives sont indiquées par un astérisque (P-value ≤ 0.05) ou trois astérisques (≤ 0.001).

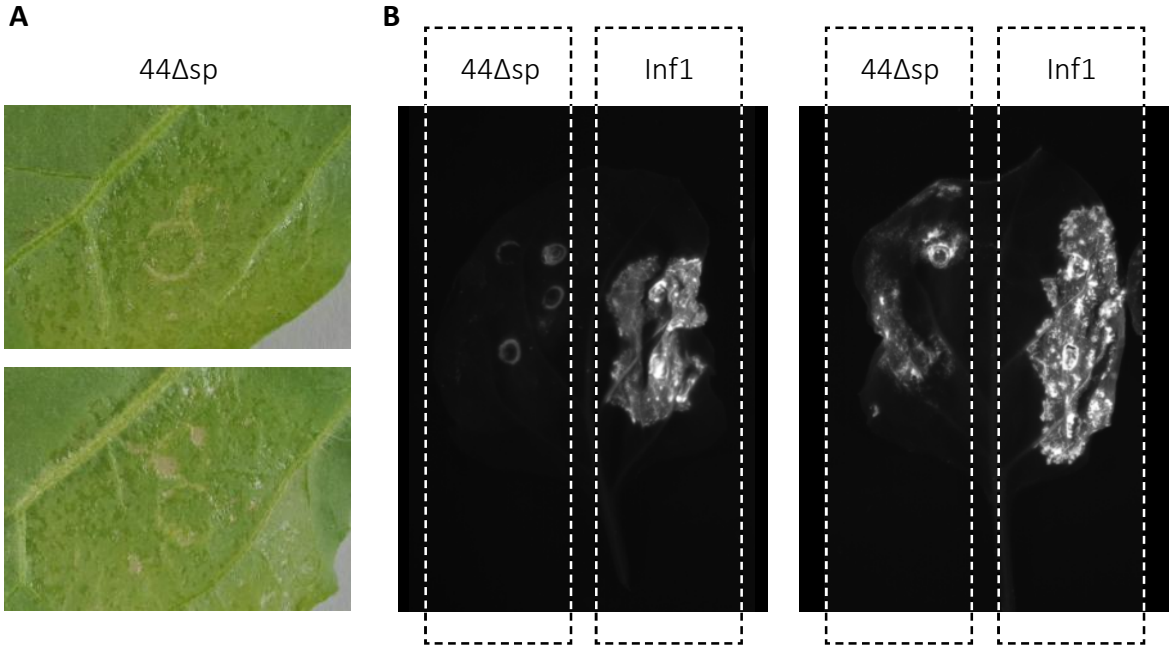


Figure 43 : Pv44 induit des lésions sur *N. benthamiana* et la production de phytoalexines. Symptômes observés sur la face inférieure des feuilles de *N. benthamiana* après agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de *Pv44* sans son peptide signal (44Δsp). Les photographies ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration **(A)** sous lumière blanche et **(B)** sous lumière bleue. L'élicitine Inf1 est utilisée comme contrôle positif. Les expériences ont été répétées 3 fois sur 6 plantes.

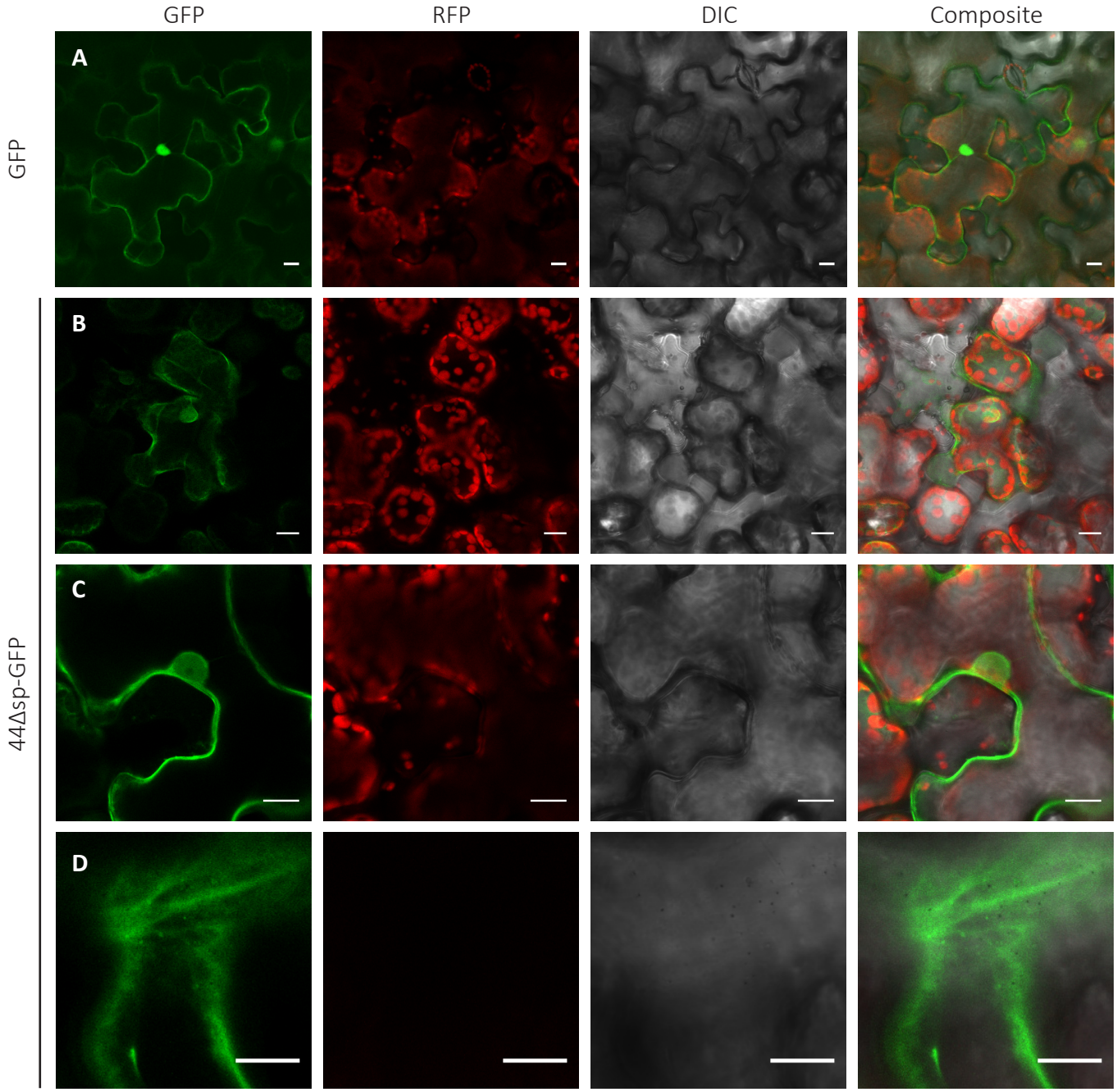


Figure 44 : Localisation de Pv44 dans le cytoplasme et les noyaux de *N. benthamiana*. Agro-infiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de *44Δsp-GFP* et de *GFP* (utilisée comme témoin) dans des feuilles de *N. benthamiana*. Les photographies ont été réalisées 2 jours après agroinfiltration au microscope confocal. **(A)** Photographie d'une cellule qui exprime *GFP*. **(B et C)** Photographies de deux cellules différentes qui expriment *44Δsp-GFP*. **(D)** Zoom du cytoplasme d'une cellule qui exprime *44Δsp-GFP*. Pour chaque ligne, une image en fluorescence verte (mGFP ou 44Δsp-GFP) ou rouge (plastes), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. Barre d'échelle : 15 µm.

pas donné lieu à des effets marqués au premier test n'ont pas été réitérés. L'ensemble des tests phytopathologiques dans cette thèse répond au même schéma expérimental : l'effecteur (ici en l'occurrence, Pv44) ou le gène rapporteur GUS, utilisé comme témoin, est exprimé transitoirement en feuilles et l'agent pathogène est inoculé le jour où le transgène s'exprime au maximum, c'est-à-dire deux jours après l'agroinfiltration **(Figure 45)**. La progression de l'agent pathogène est observée à la fin du cycle d'infection ; elle est notée par des symptômes de chloroses, de nécroses foliaires ou par la densité de l'agent pathogène. Les résultats sont ensuite comparés à ceux du témoin GUS.

Effet de l'expression de Pv44 sur l'infection par *Plasmopara viticola*

L'implication de l'effecteur Pv44 dans l'infection par *P. viticola* a été vérifiée. Pour cela l'effecteur est exprimé transitoirement sur disques de vigne selon les techniques détaillées au Chapitre 1. Les symptômes de sporulation sont évalués suivant une échelle de sporulation **(Figure 46, A)**. Il existe une échelle (de 1, très faible résistance, à 9, très élevée) utilisée au laboratoire. Elle est inspirée du code 452 mis en place par l'organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) **(OIV, 2009)**, qui tient compte du recouvrement de la sporulation sur le disque et l'apparition de points nécrotiques de type HR. Cependant, elle ne convient pas à un test sur disques transformés transitoirement, car cette manipulation laisse souvent apparaitre des nécroses indissociables d'une HR. L'échelle utilisée est donc une version simplifiée qui prend en compte uniquement le niveau de sporulation des disques.

Les tests phytopathologiques sont réalisés sur des vignes résistantes *V. cordifolia, V. lincecumii, V. riparia, V. rupestris* ; une vigne sensible, *V. vinifera* cv. Syrah, et des vignes issues de populations de ségrégation où des individus sont porteurs des gènes de résistance *Rpv1*, *Rpv2* et *Rpv3* **(Figure 46, B)**. Trois contrôles négatifs d'agroinfiltration sont utilisés : le tampon seul et des transformations par les marqueurs GUS et le facteur de transcription d'anthocyanes Myba1. La sporulation observée est identique entre les trois conditions contrôles (Tampon, GUS et Myba1) sur les vignes avec un fort niveau de résistance *V. cordifolia*, *V. lincecumii*, *V. riparia* et *V. rupestris*. Sur les vignes sensibles, *V. vinifera* cv. Syrah ou celles issues de croisements, le niveau de résistance entre les conditions contrôles (GUS, Myba1 et Tampon) est variable et est à prendre en compte pour l'estimation de l'effet de Pv44. Le niveau de sporulation sur chaque génotype de vigne après expression transitoire de 44Δsp a été évalué **(Figure 47)**. L'observation de la sporulation sur les disques qui expriment 44Δsp et GUS a montré une variabilité similaire à celle des contrôles. Dans ces conditions expérimentales, Pv44 seul ne semble pas perturber la sporulation de *P. viticola*. Cependant il faut noter que la totalité du disque n'exprime pas le transgène mais uniquement quelques ilots cellulaires épars. Ce faible niveau de transformation peut altérer l'effet estimé de Pv44 sur l'infection de *P. viticola*. Pour remédier à cette

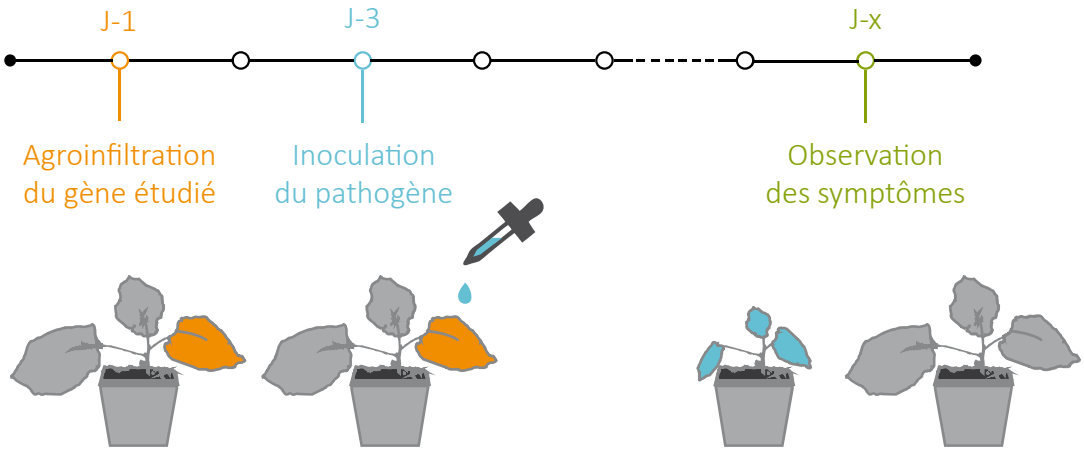


Figure 45 : Processus expérimental utilisé pour les tests phytopathologiques.
Agroinfiltration de constructions permettant l'expression transitoire des effecteurs candidats RXLR sans leur peptide signal dans des feuilles des plantes hôtes suivie 48h après par l'inoculation de l'agent pathogène. Les observations des symptômes sont réalisées en fin de cycle d'infection. Les expérimentations sont réalisées sur plante entière, sur feuilles sectionnées ou sur disques foliaires.

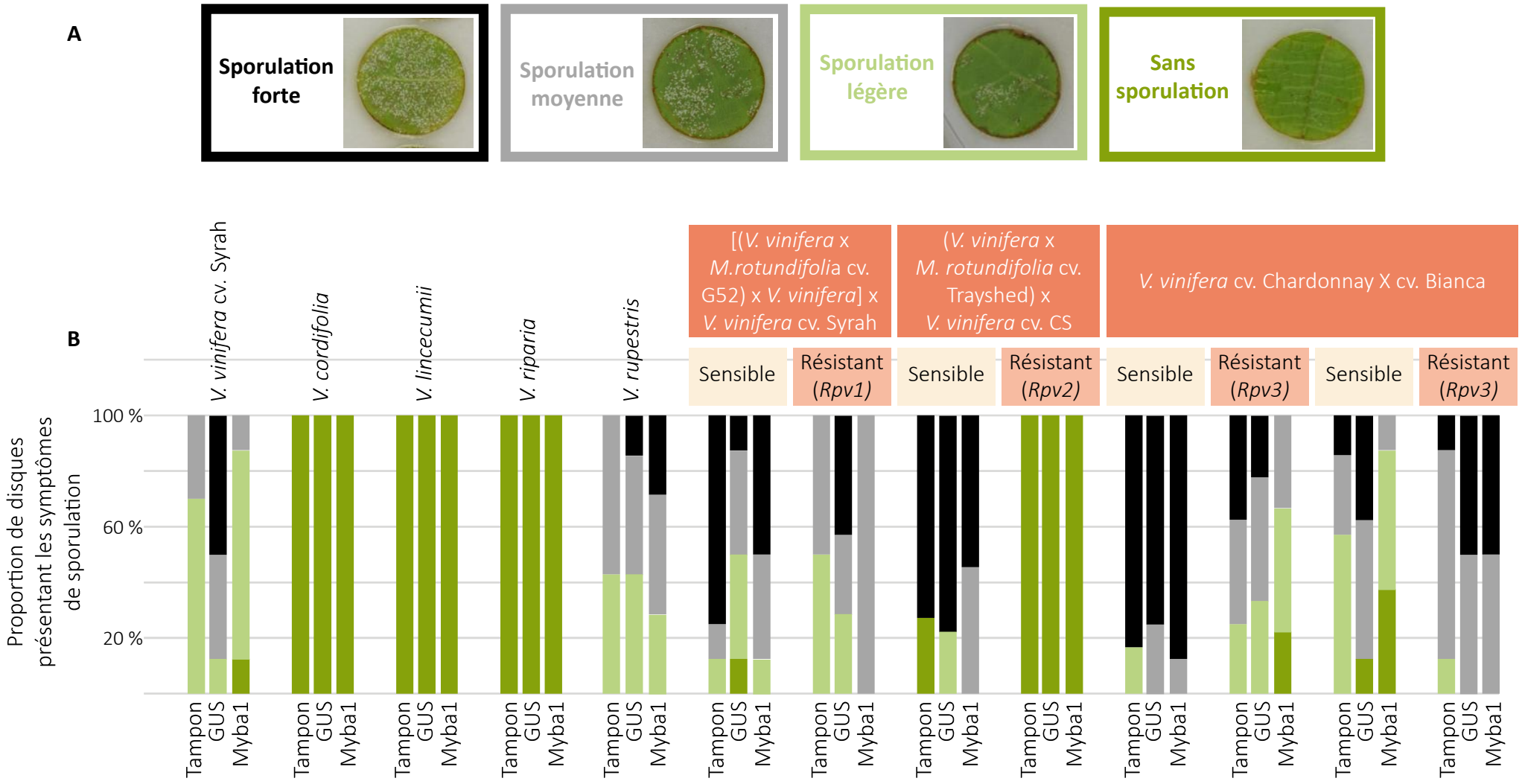
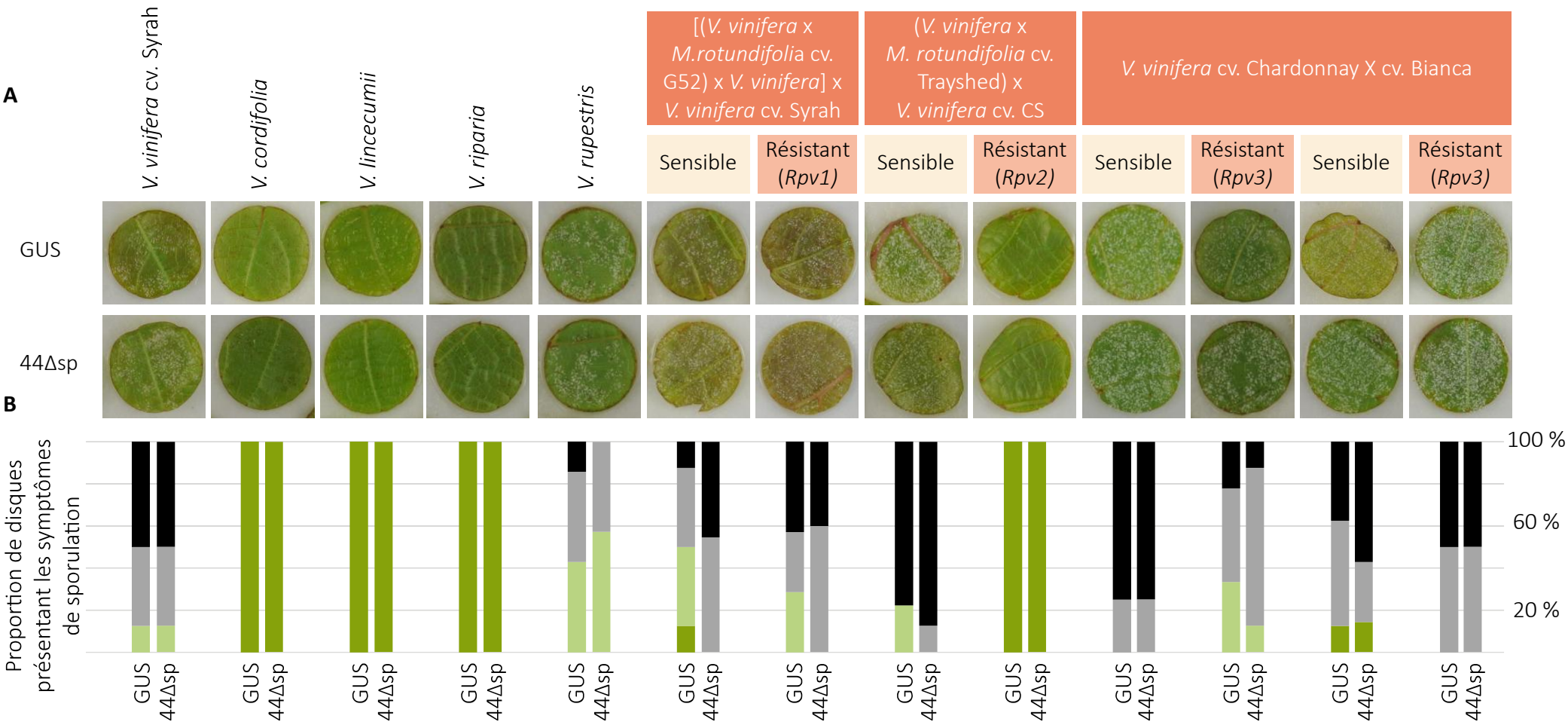


Figure 46 : Échelle de sporulation et contrôle utilisé dans les tests phytopathologiques sur disques de vigne transformés
Des disques de vigne sont transformés transitoirement par agroinfiltration des constructions GUS et Myba puis inoculés 48 hpa par une suspension de sporanges de *P. viticola* à 2.10^5 sp/ml. **(A)** A 6 jpi les disques sont photographiés et les symptômes sont estimés visuellement selon quatre niveaux : non sporulant (vert foncé), sporulation légère (vert clair), sporulation moyenne (gris), sporulation forte (noir). **(B)** Les proportions de chaque symptôme par condition sont représentés sous forme d'histogramme. Huit disques issus de plantes différentes ont été utilisés par construction. CS : Cabernet Sauvignon.



Sporulation forte
Sporulation moyenne
Sporulation légère
Sans sporulation

Figure 47 : L'expression transitoire de Pv44 ne semble pas perturber l'infection de *P. viticola*.
Des disques de vigne sont transformés transitoirement par agroinfiltration des constructions 44Δsp et GUS, puis inoculés 48 hpa par une suspension de sporanges de *P. viticola* à 2.10^5 sp/ml. **(A)** A 6 jpi les disques sont photographiés et les symptômes sont estimés visuellement selon quatre niveaux : non sporulant (vert foncé), sporulation légère (vert clair), sporulation moyenne (gris), sporulation forte (noir). **(B) Les proportions de chaque symptôme par condition sont représentés sous forme d'histogramme.** 8 disques issus de plantes différentes ont été utilisés par construction.

difficulté, les tests phytopathologiques qui suivent ont été réalisés sur le modèle *N. benthamiana* facile à transformer transitoirement.

Effet de l'expression de Pv44 sur l'infection par *Phytophthora parasitica*

L'effet de Pv44 face à un agent pathogène de la même classe que *P. viticola*, l'oomycète hémi-biotrophe *Phytophthora parasitica,* a été étudié chez *N. benthamiana*. *P. parasitica* est un agent pathogène racinaire, mais en condition forcée il peut infecter les parties foliaires d'une plante hôte. Le test a été effectué trois fois sur des lots différents de plantes. Pour les deux premiers lots, les spores de l'agent pathogène ont été infiltrées sur la totalité de la feuille transformée. Dans ce cas, les feuilles qui expriment GUS ou 44Δsp présentent les mêmes symptômes (données non présentées). Pour le troisième lot, les spores du pathogène ont été infiltrées sur une petite aire et l'expansion de l'agent pathogène dans le reste du tissu foliaire a été mesurée **(Figure 48)**. Les aires d'infections de l'oomycète observées lors de ces expériences sont identiques entre les deux conditions. L'expression transitoire de Pv44 n'affecte pas le développement de l'infection de cet agent pathogène sur *N. benthamiana*.

Effet de l'expression de Pv44 sur l'infection par *Botrytis cinerea*

Pour évaluer l'effet de Pv44 sur l'infection par un agent pathogène avec un mode de vie différent, j'ai utilisé le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea,* qui infecte aisément les feuilles de *N. benthamiana.* Les spores de l'agent pathogène sont déposées sous forme de gouttes sur la surface des feuilles détachées et les aires d'expansion sont mesurées quatre jours plus tard **(Figure 49)**. Cette aire est aisément distinguable par une forte nécrose brun clair sur les feuilles et est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Nos résultats montrent que les aires sur les tissus qui expriment GUS ou Pv44 ne présentent aucune différence significative entre les deux conditions. La présence de Pv44 n'impacte pas le développement de l'agent pathogène sur cet hôte.

Effet de l'expression de Pv44 sur l'infection par le virus X de la pomme de terre (PVX)

Finalement, j'ai étudié l'effet de Pv44 sur l'infection de *N. benthamiana* par le virus X de la pomme de terre (PVX). Les symptômes provoqués par son infection ne sont pas très marqués : une mosaïque chlorotique légère apparait sur les feuilles. En conséquence, une version fusionnée à la GFP a été utilisée pour suivre facilement l'infection de PVX **(Baulcombe et al., 1995)**. Le virus est inoculé par agroinfiltration et dix jours après l'agroinfiltration la progression du virus est suivie sous UV **(Figure 50. A)**. La dispersion du virus est inchangée entre les plantes qui expriment GUS et Pv44 **(Figure 50. B)**. L'effecteur semble n'avoir aucun impact sur l'expansion du virus.

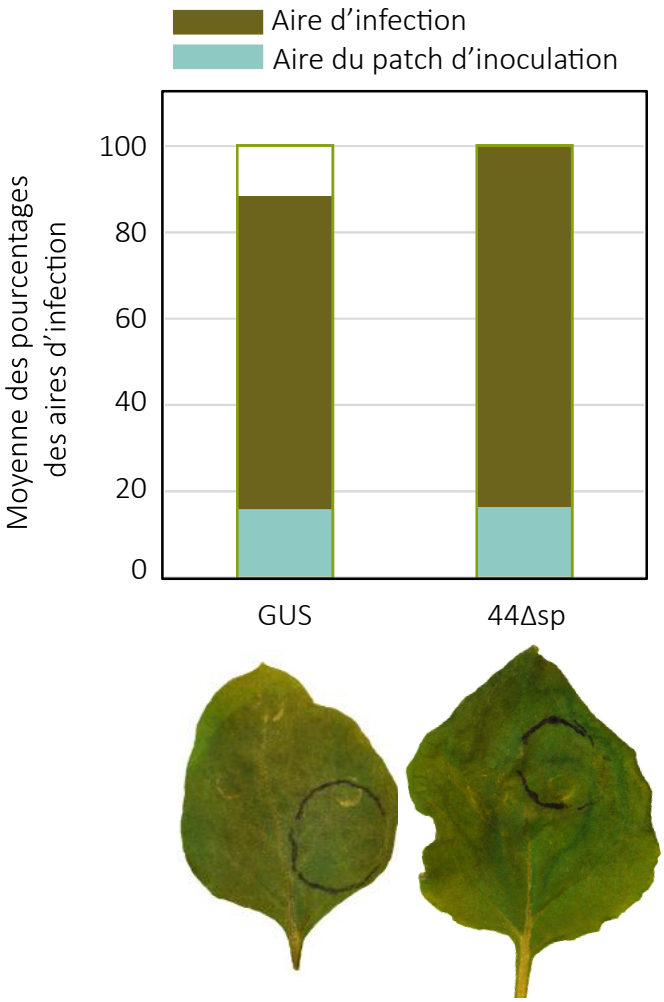


Figure 48 : Pv44 ne contribue pas à l'infection de *P. parasitica*.
N. benthamiana a été infiltré par 50 µL de spores de *P. parasitica* à une concentration de 1 sp/ml, deux jours après agroinfiltration avec des constructions permettant l'expression de 44Δsp ou GUS (n=14). Les symptômes ont été pris en photographie à 5 jours après inoculation. La surface des feuilles, l'aire d'infection et l'aire du patch d'inoculation des spores de *P. parasitica* ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. La moyenne des ratios des aires d'infection sur la surface totale de la feuille est représentée sous forme d'histogramme. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Wilcoxon-Mann & Whitney.

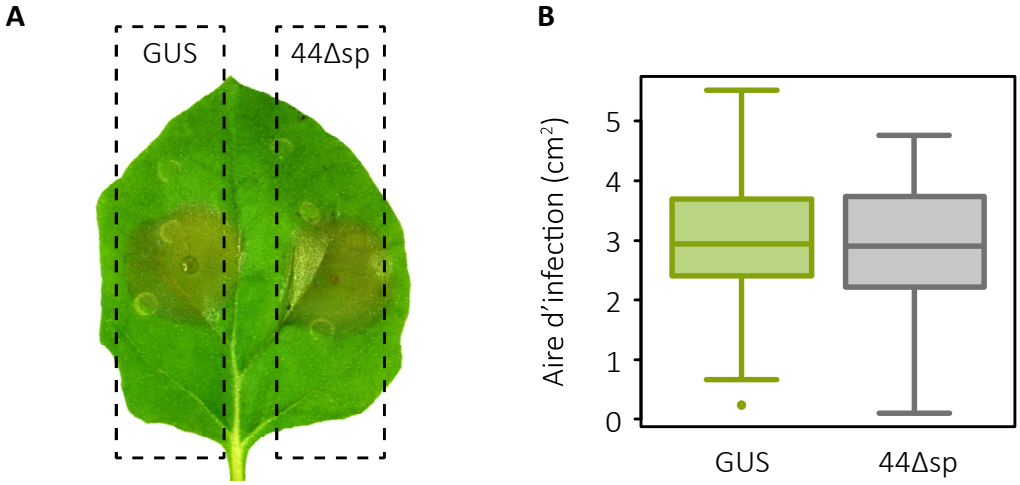


Figure 49 : Évaluation de la sensibilité de *N. benthamiana* à *Botrytis cinerea* après expression de Pv44. Les feuilles *N. benthamiana* sont agroinfiltrées avec des constructions permettant l'expression transitoire de GUS sur la partie gauche des feuilles et de 44Δsp sur la partie droite. 2 jours après l'agroinfiltration, 5 µL de spores de *B. cinerea* à 5.10^5 sp/ml sont déposés sur chaque côté de la feuille détachée. **(A)** Photographie des symptômes d'infection représentatifs et **(B)** représentation des aires de lésions causées par *B. cinerea* mesurées à 4 jpi. La normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk et les données ont été analysées par un test de Wilcoxon apparié. L'expérimentation a été réalisée sur trois réplicats distincts dans le temps (n1 = 11 ; n2 = 4 ; n3 = 11).

2. Discussion

Le criblage de 18 effecteurs candidats pour l'induction de mort cellulaire et la suppression de défenses chez *N. benthamiana* a conduit à l'identification d'un gène, *Pv44* qui supprime la mort cellulaire induite par INF1 et occasionnellement provoque des nécroses et la production de phytoalexines chez la plante. Cependant, l'expression de cette protéine, qui a une localisation majoritairement cytoplasmique, ne semble pas avoir un effet sur les défenses de la plante contre différents agents pathogènes.

Pv44 induit occasionnellement la mort cellulaire chez *N. benthamiana*

Les effecteurs RXLR identifiés dans le génome de *P. viticola* ont été exprimés chez *N. benthamiana* avec le but d'identifier des gènes induisant une réponse de mort cellulaire. Des 18 effecteurs testés, seul Pv44 induisait des lésions tissulaires, lésions faibles qui apparaissent de façon sporadique et uniquement sur la face inférieure des feuilles. Leur apparition peut dépendre de l'état développemental ou du niveau de stress, biotique ou abiotique, subi par la plante au cours des manipulations. Par exemple, les plantes sont déplacées de la serre aux chambres confinées L2 quelques heures avant l'agroinfiltration ; la température extérieure lors du transfert pourrait avoir un effet sur le résultat des expériences.

Les lésions sont accompagnées d'une production de phytoalexines, une observation qui laisse penser que Pv44 est détecté par *N. benthamiana* et induit le déclenchement de défenses végétales. Cette détection peut être directe ou indirecte. La reconnaissance directe de l'effecteur nécessite un gène de résistance correspondant. La reconnaissance indirecte dépend des perturbations exercées par cet effecteur sur le métabolisme cellulaire. La distance phylogénétique entre la vigne, hôte de *P. viticola*, et *N. benthamiana* une Solanacée, me fait privilégier l'hypothèse d'une reconnaissance indirecte. Des analyses métabolomiques permettraient d'identifier la ou les voies perturbées par Pv44, des analyses qui pourraient se complémenter avec une recherche d'interactant par immunoprécipitation. En prenant en compte la localisation intracellulaire de Pv44, l'effecteur pourrait cibler une protéine libre dans le cytoplasme, perturbant son bon fonctionnement au point de conduire au déclenchement d'une mort cellulaire programmée.

Pv44 supprime la HR induite par INF1

Parmi les 18 effecteurs candidats, seul Pv44 s'est montré capable de supprimer partiellement la HR déclenchée par INF1. Six de ces 18 effecteurs ont été étudiés par une équipe dirigé par le Prof. Jiang Lu: Pv63, appelé PvRXLR11 par l'équipe, Pv52 (PvRXLR13), Pv58 (PvRXLR17), Pv67 (PvRXLR20),

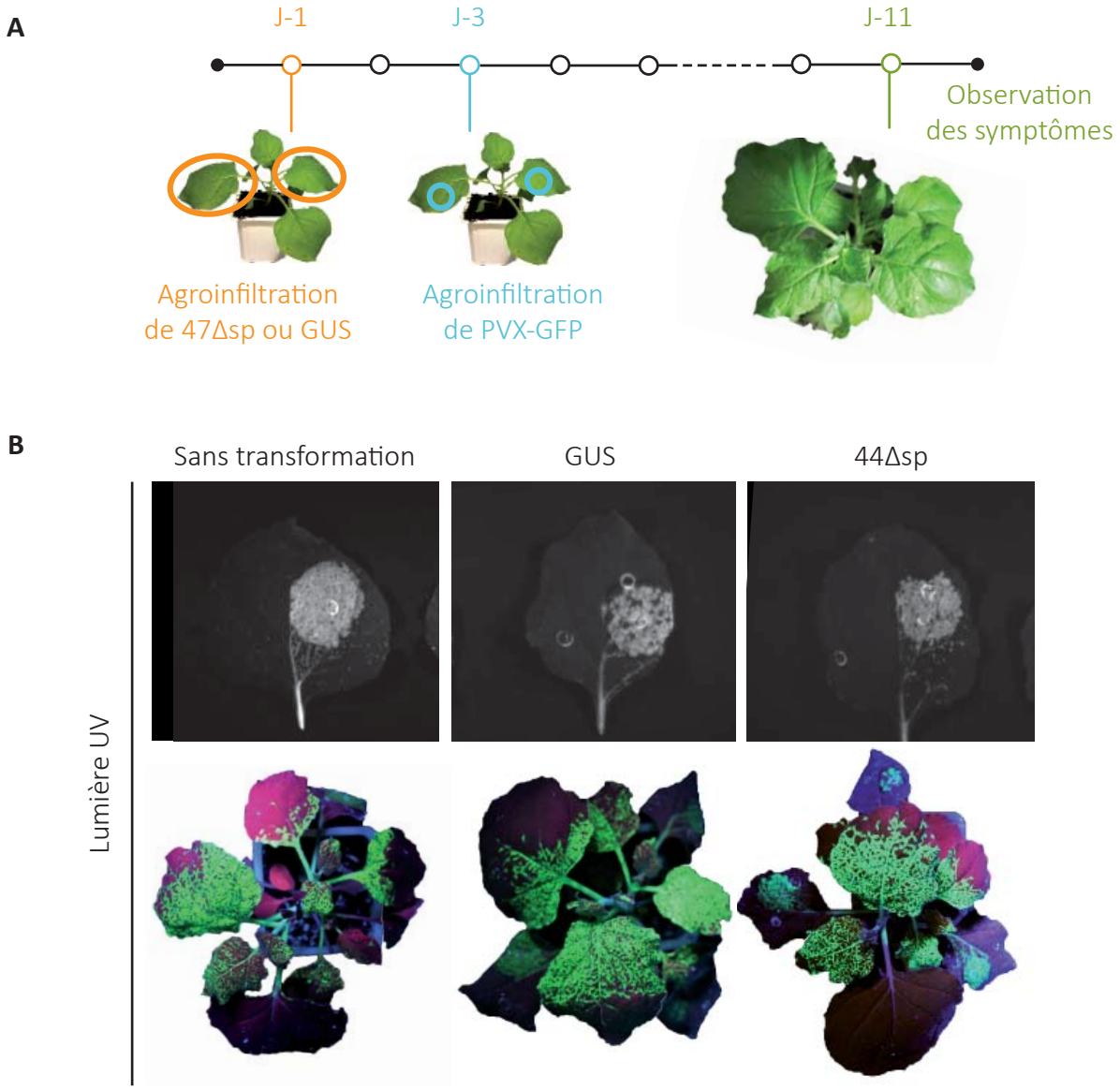


Figure 50 : L'expression de 44Δsp n'interfère pas avec l'infection de PVX. (A) Agroinfiltration de l'effecteur candidat Pv44, sans son peptide signal (44Δsp) sur deux feuilles entières de *N. benthamiana* suivi de l'agroinfiltration d'un patch de PVX-GFP à 2 jpa. L'agroinfiltration de GUS a été utilisée comme contrôle négatif. **(B)** Les feuilles agroinfiltrées et les plantes entières ont été photographiées sous lumière UV. Le test a été réalisé sur 4 plantes par condition.

Pv65 (PvRXLR30), Pv57 (PvRXLR41), Pv62 (PvRXLR9) **(Liu et al., 2018b; Xiang et al., 2016)**. Étonnamment, ils observent une suppression de la HR pour chacun d'entre eux. Deux grandes différences distinguent les expérimentations présentées par l'équipe du Prof. Jiang Lu et celles réalisées au cours de la thèse. La première est l'intervalle de temps qui sépare les agroinfiltrations ; dans leurs conditions, INF1 est exprimé 12h après les effecteurs, contre 24h pour les expérimentations décrites dans ce manuscrit. La seconde concerne les plasmides utilisés pour les constructions ; dans les expériences menées par l'équipe du Prof. Jiang Lu, le même type de plasmide permet l'expression de l'effecteur et de INF1, tandis que dans nos conditions les effecteurs et INF1 sont clonés dans des plasmides binaires différents. Le risque dans l'utilisation consécutive du même vecteur viral c'est un phénomène d'exclusion lors de la seconde agroinfiltration. En effet, il a été décrit que lorsque deux constructions exprimant des protéines fluorescentes différentes clonées dans le même vecteur viral sont exprimées ensemble, les deux protéines fluorescentes ne se retrouvent jamais sur la même cellule (Dietrich and **Maiss, 2003; Giritch et al., 2006)**. Dans le cadre de nos expériences, cette exclusion conduirait à une absence d'expression d'INF1 et en conséquence une absence de mort cellulaire. Les recherches de l'équipe du Pr Jiang utilisent comme contrôle négatif l'expression de la GFP, mais le plasmide utilisé pour ce contrôle n'est pas précisé.

Compréhension de l'effet de Pv44 sur l'induction de mort cellulaire et l'infection par des agents pathogènes.

L'expression de Pv44 supprime la mort cellulaire induite par INF1. Pour valider le phénomène de suppression de mort cellulaire et dans l'hypothèse qu'une succession d'agroinfiltrations pourrait inhiber l'expression d'INF1, le gène marqueur *GFP* a été utilisé pour suivre l'expression d'un transgène en présence de Pv44. De façon surprenante une augmentation du signal du transgène fluorescent a été observée. Trois hypothèses peuvent expliquer cette augmentation :

La première serait que Pv44 bloque les défenses végétales et facilite une deuxième transformation par *A. tumefaciens*, une hypothèse plausible au vu de sa capacité à stopper la HR. Cependant, les tests phytopathologiques réalisés en présence de Pv44 n'ont pas présenté de variation dans le développement des agents pathogènes, notamment suite à l'infiltration d'*A. tumefaciens* porteuse de la séquence de PVX. La capacité de Pv44 à bloquer les défenses ne semble pas être suffisante pour améliorer l'infection des bioagresseurs. L'hypothèse selon laquelle la transformation par *A. tumefaciens* serait plus efficace en présence de cet effecteur ne semble pas être la bonne.

La deuxième hypothèse serait que Pv44 supprime le silencing du transgène *GFP*, augmentant son expression. Le silencing des ARNm est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes à l'aide de petits ARN. Il est assuré par un complexe protéique qui utilise des

petits ARN de 20 à 30 nucléotides pour réprimer l'expression de certains gènes cibles. Le silencing étant aussi un mécanisme de défense contre les virus, ces derniers ont développé des suppresseurs de silencing comme stratégie de contre-défense **(Moissiard and Voinnet, 2004)**. Cette capacité de suppresseur de silencing a également été observée chez les effecteurs RXLR de *P. sojae* PSR1 et PSR2, qui bloquent des mécanismes de silencing et augmentent ainsi sa virulence **(Qiao et al., 2013)**. PSR1 cible PINP1, une protéine nucléaire dont l'absence perturbe le bon assemblage des complexes impliqués dans la production de petits ARNs endogènes en tige boucle, les ARNmi **(Qiao et al., 2015)**. Pour répondre à cette question, j'ai observé par Northern-Blot les quantités de petits ARNs et d'ARNm de *GFP* suite à l'expression de Pv44. Cette expérience, réalisée une seule fois, n'a pas été concluante mais l'expression de Pv44 ne semblait pas avoir un grand effet sur la quantité des petit ARNs et d'ARNm de GFP. Des expériences additionnelles permettront de valider ou mettre à l'écart un éventuel rôle de la suppression du gène silencing dans l'augmentation du signal GFP.

La troisième hypothèse serait que les signaux mesurés ne proviennent pas exclusivement de la GFP. En effet, certains composés aromatiques produits par *N. benthamiana,* comme les phytoalexines, fluorescent aux mêmes longueurs d'onde que la GFP. En accord avec cette hypothèse, Pv44 induit une mort cellulaire faible accompagnée de la production de phytoalexines. Par ailleurs, cette hypothèse pourrait réconcilier la suppression de la mort cellulaire d'INF1 avec l'absence d'effet sur le développement des différents agents pathogènes utilisés ; la réponse immune induite par Pv44 pourrait contrecarrer la suppression de défenses, résultant en absence d'effet sur l'infection. L'origine de l'augmentation du signal GFP semble donc provenir vraisemblablement de l'addition de la fluorescence des phytoalexines. Des expériences de Western-blot permettraient de valider que la quantité de GFP exprimée suite à l'expression de Pv44 est la même que dans le contrôle.

Pv44 localise majoritairement dans le cytoplasme

La protéine Pv44 fusionnée à la GFP est détectée dans le cytoplasme mais aussi légèrement dans le noyau. Le nucléole lui n'a pas été marqué. Ce type de localisation est fréquente pour les effecteurs RXLR : l'équipe du Pr. Jiang Lu travaillant sur *P. viticola* a montré que 22 des 23 effecteurs étudiés s'accumulent dans le noyau et 16 d'entre eux se retrouvent également dans le cytoplasme **(Xiang et al., 2016)**. Chez *H. arabidopsidis*, 33% des effecteurs RXLR ont présenté une localisation nucléaire et cytoplasmique **(Caillaud et al., 2012)**. Dans la même étude, seuls 6% des effecteurs se situent uniquement dans le cytoplasme. Curieusement le signal nucléaire de Pv44-GFP est faible par rapport au signal cytoplasmique. La présence dans le noyau peut avoir de nombreuses explications :

- Un clivage partiel de la GFP aurait lieu, provoquant la diffusion de la GFP libre vers le noyau.

- La petite taille moléculaire de Pv44 (230 aa) n'empêcherait pas complètement la diffusion habituelle de la GFP vers le noyau.
- La (ou les) cible(s) moléculaires de Pv44 seraient cytoplasmiques et nucléaires.
- La cible de Pv44 serait uniquement cytoplasmique, mais dans les conditions expérimentales l'effecteur tagué est exprimé en quantité excédentaire par rapport au nombre de cibles et l'excès pourrait diffuser vers le noyau.

L'utilisation de constructions avec des promoteurs moins puissants que le 35S, accompagnée de Western-blots, aiderait à comprendre la nature de la faible localisation nucléaire de Pv44.

3. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons montré que parmi les effecteurs RXLR candidats de *P. viticola* étudiés, Pv44 induit des réponses immunitaires observables macroscopiquement de façon sporadique en forme de nécroses sur la face inférieure des feuilles, et la production de phytoalexines. Cet effecteur, localisé dans le cytoplasme et légèrement dans le noyau, est également capable de supprimer la HR induite par INF1, une suppression des défenses végétales qui n'est pas suffisante pour moduler l'infection de différents agents pathogènes.

Ces données obtenues sur *N. benthamiana* n'ont pour l'instant pas été reportées sur la vigne. Étant donné que la vigne ainsi que *P. viticola* sont difficiles à transformer génétiquement, il est nécessaire de continuer la caractérisation de Pv44 sur des plantes modèles.

Cependant, la caractérisation de Pv44 n'a pas été poursuivie, car au cours de la thèse de nombreux travaux sur les effecteurs RXLR de *P. viticola* ont été publiés par l'équipe du Pr. Jiang Lu **(Yin et al., 2015; Li et al., 2015b; Xiang et al., 2016; Yin et al., 2017; Xiang et al., 2017; Liu et al., 2018b).** Un risque non négligeable existait que cette équipe ait identifié Pv44 et ait commencé son étude. Je me suis donc concentrée sur l'étude de protéines sécrétées contenant un domaine WY de *P. viticola,* décrite dans la suite de ce manuscrit.

Chapitre 3 : Identification d'une famille d'effecteurs candidats chez *P. viticola* et analyse fonctionnelle de l'effecteur Pv33

1. Article : A secreted WY-domain-containing protein from the oomycete *Plasmopara viticola* induces cell death in different plant species.

L'article qui suit a été soumis au journal MPMI (Molecular Plant-Microbe Interactions) le 19 décembre 2018.

Deux collaborations sont intervenues dans la réalisation de cette étude :

La collaboration avec David Rengel et Ludovic Legrand du LIPM (Castanet-Tolosan) et Olivier Bouchez de Genotoul (Castanet-Tolosan) a permis la génération des données RNA-seq de tissu foliaire infecté par *P. viticola* et de spores germées.

La collaboration avec Edouard Evangelisti et Sebastian Schornack a permis de réaliser les expressions transitoires des Pv33 sur *N. benthamiana* silencé par TRV pour SGT1 et EDS1, ainsi que les tests de prise en charge du peptide de sécrétion de Pv33 par *N. benthmiana*.

Contribution des auteurs :

- Maud Combier : Réalisation des expérimentations de clonage, d'expression transitoire sur les modèles vigne et *N. benthamiana*, de microscopie et d'immuno-blot. Analyse des résultats et rédaction de l'article.
- Edouard Evangelisti : Réalisation des expériemantions de clonage, de transformation transitoire de *N. benthamiana*, de RT-qPCR, de microscopie et révision de l'article.
- Marie-Christine Piron : Réalisation des expérimentations d'expression transitoire sur le modèle vigne et de PCR semi-quantitative.
- David Rengel, Ludovic Legrand et Olivier Bouchez : Réalisation et analyse des données d'expression.
- Sebastian Schornack : Révision de l'article.
- Pere Mestre : Réalisation des analyses de séquences, supervision et rédaction de l'article.

A secreted WY-domain-containing protein from the oomycete *Plasmopara viticola* induces cell death in different plant species.

Maud Combier (1), Edouard Evangelisti (2), Marie-Christine Piron (1), David Rengel (3), Ludovic Legrand (3), Olivier Bouchez (4), Sebastian Schornack (2), Pere Mestre (1).

Affiliations:

(1) SVQV, Université de Strasbourg, INRA, 68000, Colmar, France

(2) University of Cambridge, Sainsbury Laboratory (SLCU), 47 Bateman Street, Cambridge, CB2 8DH, UK

(3) LIPM Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Université de Toulouse, INRA, CNRS, 31326 Castanet-Tolosan, France

(4) US 1426 GeT-PlaGe, Genotoul, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

Abstract

Oomycete effectors can be divided into apoplastic effectors, which are secreted in the plant intercellular spaces and cytoplasmic effectors, which are further internalized into the plant cell. RXLRs, which are characterized by the presence of a RXLR-dEER motif on the N-terminus of the protein, are the best studied oomycete cytoplasmic effector family and several studies indicate that this motif plays a role in the translocation of the effector protein into the plant cell. The RXLR repertoire from several plant pathogenic oomycete species has been reported, and numerous studies described their role in suppressing plant defences and enhancing pathogen virulence. Crystal structures obtained for several RXLR effectors identified a common fold in the C-terminus of the protein, named the WY-domain. *Plasmopara viticola* is a biotrophic oomycete causing grapevine downy mildew. While characterizing the *P. viticola* effector repertoire, we came across a group of secreted proteins that contain dEER and WY-domains but lack any RXLR or RXLR-like motif. We further characterized 4 of those proteins and showed that one of them induces plant cell death in grapevine and *Nicotiana* species and that the induction is dependent on the nuclear localization of the protein. Our results suggest that this group of proteins may function as effectors.

Introduction

Effectors are proteins produced by phytopathogens that manipulate host plants and optimize infection. They exert their function by modifying plant physiology and nutrient absorption, as well as by suppressing plant defences **(Fevre et al., 2015)**. Indeed, when a pathogen comes into contact with a plant it is detected by direct recognition of microbial molecular signatures, called MAMPs (Microbe-Associated-Molecular-Pattern) or PAMPs (Pathogen-Associated-Molecular-Pattern), triggering defence responses in the infection area. Detection can be also indirect, by the perception of the disturbances caused by penetration (DAMP Damage-Associated -Molecular-Pattern) **(Henry et al. , 2012)**. Pathogen effectors are able to interfere with those defence responses, leading to suppression of plant immunity and successful infection. Their presence may however be detected by the plant, re-activating defence responses in the form of a program of cell death called hypersensitive response (HR), which sacrifices the cells in the vicinity of the infection to stop the spread of the pathogen. These events are summarized in the zig-zag model for plant-pathogen interactions (Jones and Dangl, 2006).

Oomycete effectors can be divided in two categories depending on their localization: apoplastic effectors that are secreted in the plant intercellular spaces and cytoplasmic effectors, which are further internalized into the plant cell. Two main families of cytoplasmic effectors have been described: CRNs (Crinkling and Necrosis Inducing) and RXLRs. These effectors are characterised by the presence of a motif on the N-terminus of the protein, LXLFLAK-DWL for CRNs, and RXLR-dEER for RXLRs. Several studies indicate that these motifs play a role in the translocation of the effector protein into the plant cell **(Schornack et al., 2010; Whisson et al., 2007)**.

RXLRs are the best studied oomycete effector family. The RXLR repertoire from several plant pathogenic oomycete species has been reported, and numerous studies in different pathosystems described their role in suppressing plant defences and enhancing pathogen virulence **(Jiang and Tyler, 2012; Asai and Shirasu, 2015)**, their subcellular localisation following translocation into the plant cell **(Caillaud et al., 2012)** and the molecular targets of their effector function **(Asai and Shirasu, 2015; Bos et al., 2010; Huang et al., 2017)**. Crystal structures obtained for several RXLR effectors allowed to identify a common fold in the C-terminus of the protein, named the WY-domain. This motif may appear either as a single domain or in tandem repeats, and it has been found in the C-terminus of 44% of *Phytophthora infestans* and 26% of *H. arabidopsidis* RXLR effectors **(Boutemy et al., 2011)**.

The RXLR motif is well conserved and defined within Phytophthora species; most RXLR effectors from those species present the canonical motif at the N-terminus. However, this does not seem to be the case for downy mildews. Indeed, other motifs, more or less reminiscent of the RXLR, have been

reported, like the QXLR and KXLR motifs detected in *Pseudoperonospora cubensis* **(Tian et al., 2011)** and the GKLR found in effectors from *Bremia lactucae* **(Stassen et al., 2013)**. Furthermore, ATR5 from *Hyaloperonospora arabidopsidis* possesses an EER motif but appears to lack a particular motif at the place of the RXLR, and more recently **Derevnina et al., 2015** reported the existence of proteins with a WY-domain but no RXLR motifs in the secretome of *Peronospora tabacina.*

Plasmopara viticola is an obligate biotrophic oomycete causing grapevine downy mildew. It is present worldwide, attacks all plant organs and is mainly controlled with pesticides. In the last years there has been an important increase in the availability of genomic **(Brilli et al., 2018; Dussert et al., 2016; Yin et al., 2017)** and transcriptomic **(Yin et al., 2015; Mestre et al., 2016)** resources for *P. viticola*, leading to the identification of its RXLR effector repertoire (Mestre et al., 2012; Yin et al., 2017; Liu et al., 2018b). The putative role of these effectors as suppressors of defence responses and their subcellular localisation have been reported for an important number of them **(Xiang et al., 2016)**, and some notable results include the identification of an RXLR inducing plant immune responses **(Xiang et al., 2017)**, and a second effector supressing plant defences through the reduction of expression of defence genes and suppression of ROS accumulation **(Xiang et al., 2016)**.

A sound knowledge of the RXLR effector repertoire and function is required to acquire a better understanding of the underlying mechanisms that govern the host / pathogen interaction for *P. viticola* and *in fine* develop new approaches to control diseases, alternative to those based on chemical inputs. While characterizing the *P. viticola* effector repertoire, we came across a group of secreted proteins that contain EER and WY-domains but lack any RXLR or RXLR-like motif. Here we report that one of those proteins induces immune responses in grapevine and *Nicotiana* species and that the induction is dependent on the nuclear localisation of the protein. Our results suggest that this group of proteins may function as effectors.

Materials and Methods

Plant and pathogen materials

Vitis vinifera cv Syrah was grown on potting soil from green cuttings in a greenhouse at 22-19°C (day-night) and a photoperiod of 16/8h (light/ dark). Plants were propagated as cuttings every 3 months.

Nicotiana benthamiana was grown in greenhouse on soil at min 18°C- max. 28°C and a photoperiod 14h of light (10 klx min).

Plasmopara viticola isolate Pv221 was collected in Blanquefort (France) and maintained on detached leaves from *V. vinifera* cv Muscat Ottonel. Germinated spores and infected tissues were obtained as described in **Mestre et al, 2012**.

Sequence analysis

The proteome of *P. viticola* isolate Pv221 **(Dussert et al., 2016,** https://doi.org/10.15454/NQEX46**)** was used to search for candidate RXLR effectors using the Galaxy workflow described in **(Cock et al., 2013)**. Genes identified as putative RXLRs by the method described in (Win et al., 2007b) and any of the two methods described in **(Whisson et al., 2007)** were selected. At the same time, the proteome was used as a query in a BLAST search at low stringency (Evalue<10e-5) against a database of oomycete RXLR effectors. The BLAST output was analyzed with SignalP4 and TMHMM 2.0, and proteins lacking a signal peptide or possessing a transmembrane domain outside the first 70 amino acids were discarded. Finally, candidate effector genes were subjected to structural homology searches using Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) with normal modeling mode **(Kelley et al., 2015).** Candidate genes displaying high confidence (100%) structural homology to proteins of known function and lacking RXLR and/or DEER motifs at the predicted positions were considered as false positives and discarded.

The predicted *P. viticola* secretome was obtained by submitting the proteome to SignalP and TMHMM. Proteins predicted as secreted by signal and/or containing a transmembrane domain inside the first 70 aa were considered as secreted. Proteins presenting a transmembrane domain outside the first 70 aa were discarded. WY-domain search in the proteome was performed with the hmmsearch function of HMMER 3.1b2 using the HMM WY_motif.hmm and a cutoff of ≥ 0.

Alignment in Figure 1B was performed with MUSCLE, manually edited and displayed with BOXshade, with a cutoff of 50% of sequences identical for shading. The alignment shows 66 out of the 68 sequences, since removing 2 of them produced an alignment with less gaps and reduced amount of manual editing required.

The logo shown in Figure 1C was obtained using GLAM2 **(Frith et al., 2008)** from the MEME suite (http://meme-suite.org/tools/glam2) with default settings, using as input the sequences of the 68 WY-domain proteins without the N-terminal part from start to the dEER motif, and then re-running it with double the maximum number of iterations without improvement.

Phylogenetic analyses were performed at www.phylogeny.fr **(Dereeper et al., 2008)**. Alignments were performed with Muscle with standard mode and default parameters. Following visual inspection of the alignment, 4 out of the 68 sequences were removed to improve the alignment and thus tree

robustness. Curation with GBlocks could not be applied to the sequence set. Tree was constructed using PhyML with default settings and branch support was calculated using 100 bootstrap repetitions.

Expression data

Expression data in germinated spores was obtained with Roche 454 GS-FLX Titanium and is described in Mestre et al, 2016. Germinated spore's transcriptome data was obtained with strains PvSC and PvSL. To identify expressed genes from Pv221, candidate RXLR genes identified as described above were used as a query in a BLASTN against the transcriptome. Genes showing hits with both identity and subject cover higher than 90% were considered as expressed in germinated spores. The number of reads was counted for each gene and normalized by the gene mRNA size.

Expression data in infected tissues was obtained by RNA-Seq with three biological replicates per time point. RNA extraction and sequencing are described in **(Dussert et al., 2018)**. RNA-Seq read pairs were mapped on the *P. viticola* 221 genome using the glint software with parameters set as follows: matches ≥50 nucleotides, ≤4 mismatches, no gap allowed, only best-scoring hits considered. Ambiguous matches (same best score) were removed. RNA-Seq stats and RSA accession numbers are provided in Supplementary Table 1.

Mapped reads were further analyzed under R environment (**R Core Team, 2018**) using the edgeR library (**Robinson et al, 2010**) in order to calculate TMM-normalized Counts per Million mapped reads or cpm. These values were then normalized by the predicted mRNA size.

Plasmid constructs

P. viticola genomic DNA was extracted from infected leaves at the sporulation stage using the Qiagen DNeasy plant Mini kit with the following modifications: PVP30 was added to the AP1 buffer (25mg/mL) and elution was performed with buffer preheated at 65°C. The sequence of the *P. viticola* effectors was amplified from *P. viticola* genomic DNA using primers carrying overhangs with restriction enzymes. Amplifications were performed with Phusion polymerase (NEB). Amplified products were digested with the corresponding restriction enzymes (NEB) and cloned directionally into binary plasmid pBIN61 digested with the same enzymes.

To obtain GFP fusions, effectors were amplified as described above and cloned directionally into the pGFPS65T vector, which corresponds to pGFP **(Chong et al., 2014)** carrying the GFP S65T mutation.

Nuclear Exclusion Signal (NES) and mutated nuclear exclusion signal (nes), as defined in **(Shen et al., 2007)**, were added by amplifying the GFPS65T sequence with primers including the signal sequences

and appropriate restriction enzymes, and then replacing the GFP sequence in the pGFPS65T-33Δsp construct with the ones containing respectively the NES and nes sequences.

Identity of all clones was confirmed by sequencing. A list of constructs and primer sequences is presented in Supplementary Table 2.

Transient expression of genes by agroinfiltration

Agroinfiltration of *N. benthamiana* was performed as described in Mestre et al, 2017.

To agroinfiltrate *V. vinifera* leaves, bacterial suspensions were prepared as described in Santos-Rosa et al (2008) and Silwet-L77 was added to the bacterial suspension at 0.3% final concentration. Infiltrations were performed on leaf discs derived from young leaves by immerging the discs for 10 minutes in the bacterial solution, as described in **(Lizamore and Winefield, 2015)**.

Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)

For VIGS experiments, *Nicotiana benthamiana* was grown on Levington F2 at 24°C with 16 h photoperiod for two weeks prior to agroinfiltration. Two-week-old *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated with a 1:1 mix of *A. tumefaciens* GV3101 cells carrying either TRV1 or a recombinant pYL279a for silencing of *uidA* (negative control), *NbEDS1* or *NbSGT1* and further grown in the same conditions for two more weeks. Then, newly formed leaves were infiltrated with *A. tumefaciens* GV3101 cells carrying either *uidA*, *Pv33*, *33Δsp* or a 1:1 mix of *AvrBs3* and *Bs4* used as a control. Symptoms were monitored five days after agroinfiltration.

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses

Total RNA was extracted 10 days after VIGS agronfiltration from newly formed leaves using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). One microgram was reverse transcribed to generate first-strand cDNA, using the Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Switzerland). Quality was assessed by electrophoresis on agarose gel. qRT-PCR experiments were performed with 2.5 µl of a 1:20 dilution of first-strand cDNA and LightCycler 480 SYBR Green I Master mix, according to the manufacturer's instructions (Roche, Switzerland). Gene-specific oligonucleotides were designed with BatchPrimer3 software (http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/) outside of the sequence used for VIGS silencing and their specificity was validated by analyzing dissociation curves after each run. Genes encoding L23 (Niben101Scf01444g02009) and FBOX (Niben101Scf04495g02005) were selected as constitutive internal controls for *N. benthamiana* genes **(Liu et al., 2012)**. Six biological replicates of the entire

experiment were performed. Gene expression was normalized with respect to constitutively expressed internal controls, quantified and plotted using R software.

Semi-quantitative RT-PCR

RNA extraction, cDNA synthesis and PCR were performed as described in Mestre et al (2017). Primer sequences are shown in Supplementary Table 2.

Immuno-Blot

Infiltrated *N. benthamiana* leaves were sampled at 48 hpa. 100 mg (fresh weight) of plant tissue were ground in 200 uL of Laemmli buffer, boiled and centrifuged 5min at 13 000 rpm. 75 µl of the supernatant were separated on a 12% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane by wet transfer. The membrane was blocked for 30 min with buffer (PBS 1X, Tween 1% and 5% skimmed milk), then incubated with 1/30 000 anti-GFP overnight. Next day, the membrane was washed 3 times 10 min with buffer (PBS 1X, Tween 0.5%) and incubated 4 hours with 1/25000 anti-GAR-PO antibodies (Goat Anti-rabbit Peroxidase). Proteins were detected with ECL using a G:Box (Syngene) imaging system. Finally, the membrane was stained with Ponceau red.

Imaging

White light images from *V. vinifera* and *N. benthamiana* leaves were taken at 6 dpa using a Nikon D5000.

Blue light images from *N. benthamiana* leaves were taken with a G:Box (Syngene) imaging system with blue LED at 465 nm; except for Figure 8A which was taken with white and blue LED at 465 nm .

Epifluorescence microscopy of *V. vinifera* leaves was performed with a Zeiss Axio Imager M2 microscope. Images were taken under Green fluorescent protein (GFP) excitations at 470 nm.

Confocal microscopy images were obtained with a LSM700 confocal laser microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), using a 20X water-immersion objective lens. GFP fluorescence was observed after excitation at 488 nm, with a 527 short-pass emission filter

Results

Search for P. viticola RXLR effectors.

We searched the *P. viticola* proteome for RXLR effectors using two strategies: motif search using string- and HMM-based methods, and low-stringency BLAST against a database of known oomycete RXLR effectors. After filtering, we identified a total of 257 candidate RXLR effector proteins. Next, we subjected the candidate effector proteins to structural homology searches using Phyre2 and we identified 77 effector proteins showing structural similarity to RXLR effectors. Results of the searches are presented in Figure 1A.

Sixty-eight candidate effector genes identified only by BLAST showed structural homology to RXLR effectors. Visual inspection of the protein sequences showed that they possessed a dEER motif inside the first 70 aminoacids, but were missing an RXLR-like motif between the signal peptide and the dEER motif. An alignment of the N-terminal part of these proteins is presented in Figure 1B.

We reasoned that the structural similarity could be due to the RXLR-specific WY-domain fold. The WY domain has been reported as being enriched in the RXLR proteome of other oomycetes. We investigated if such enrichment for WY-domains was also a feature of the *P. viticola* secretome. The predicted *P. viticola* secretome accounted for 11% (3533/32026) of the total proteome. HMM searches identified a total of 386 (1,2%) WY-domain-containing proteins. From these, 239 were predicted as secreted, accounting for 6,8% of the secretome, whilst only 0,5% of non-secreted proteins carried WY-domains. These results show an enrichment of WY-domain-containing proteins in the *P. viticola* secretome. Furthermore, 66 out of our 68 candidate effector proteins were predicted as containing at least one WY-domain.

To further confirm that the structural similarity was due to the WY-domain fold, we searched for motifs in the protein sequences C-terminal to the dEER motif. GLAM2 analysis with the 68 effector proteins produced the motif shown in Figure 1C, which was found in 59/68 proteins and fits the WY-domain described in Boutemy et al. (2011). We will refer hereafter to these proteins as WY-domain proteins.

Characterization of *P. viticola* WY-domain proteins

We built a phylogenetic tree using the sequences of the WY-domain proteins. The resulting tree revealed three clades with branch support values higher than 0.6. Each clade contained clusters of sequences belonging to at least two scaffolds, and no sequences from the same scaffold were found in different clades (Figure 2).

We studied the expression of the WY-domain genes upon infection and in germinated spores. Most genes were expressed in any of the two conditions (Figure 2). Most genes from Clade I were expressed to some extent in germinated spores, whilst the majority of genes from Clades II and III were not expressed or weakly expressed at this point. Expression in infected tissues could be detected for 60 out of the 68 genes. Detailed expression data is shown in Supplementary Dataset 2.

A WY-domain effector candidate induces cell death on different *Nicotiana* spp.

We used *Agrobacterium*-mediated transient expression of proteins to study the possible role of WY-domain proteins as suppressors of plant defences. We cloned four WY-domain proteins, Pv18 (S0028g11635), Pv31 (S0259g32900), Pv33 (S0046g15019), Pv82 (s0028g11682) without their secretion peptide, which we named 18Δsp, 31Δsp, 33Δsp and 82Δsp, and studied their ability to suppress the INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. None of the proteins was able to suppress the INF1-mediated cell death (Supplementary Figure 1), but we observed that 33Δsp alone was able to induce cell death. Each of the four proteins alone was then expressed in three Nicotiana species: *N. benthamiana*, *N. tabacum* and *N. occidentalis*. As seen in Figure 3A, 33Δsp induced plant cell death and autofluorescence in all three species.

To determine if the presence of the signal peptide could influence the induction of cell death, we cloned the full-length version of the effector containing the signal peptide, which we named 33FL. We expressed both versions of the protein in the same three *Nicotiana* species and observed that the cell death disappeared when 33FL is expressed on *N. benthamiana* and *N. occidentalis*, while some necrotic points are visible on *N. tabacum*. (Figure 3B). These results show that presence of the signal peptide, and possibly secretion of the protein, hinder the induction of plant cell-death.

We next investigated the function of the signal peptide of Pv33 by fusing it to GFP and expressing it in leaves of *N. benthamiana*. Native GFP and GFP fused to the signal peptide of PR1 were used as negative and positive controls respectively. The fluorescence observed after transient expression of Pv33SP:GFP showed a pattern similar to that observed with PR1SP:GFP, but with weaker intensity and residual nuclear fluorescence (Figure 4B). Following BFA treatment, which blocks vesicular traffic, typical BFA bodies could be observed with both PR1SP:GFP and Pv33SP:GFP, with nuclear fluorescence still visible

for Pv33SP:GFP (Figure 4C). The nuclear fluorescence observed with Pv33SP:GFP shows that part of the protein is not incorporated in the secretory pathway, suggesting that the signal peptide of Pv33 is partially functional in plant cells.

33Δsp triggers cell-death in grapevine leaves

Next, we verified if 33Δsp would also induce cell death in the *P. viticola* host plant. To do so, we transiently expressed the above-described effectors in leaf discs of *V. vinifera* cv. Syrah. Macroscopic cell death was visible in 2 out of 4 leaf discs infiltrated with *Agrobacterium* containing 33ΔSP, probably because of the low efficiency of transformation (Figure 5A). We could observe induction of the expression of the hypersensitive response marker *VvHSR1* in discs transiently expressing 33Δsp (Figure 5B). These results show that the WY-domain protein Pv33 induces cell death in grapevine leaves.

To understand where in the *P. viticola* infection cycle would Pv33 be playing a role, we used semi-quantitative RT-PCR to validate the expression of Pv33 in different stages of *P. viticola* development, mainly sporangia, germinated spores, and infected tissues at different time-points after inoculation. Pv33 expression could be observed in sporangia (Sp) germinated spores (Sg) and infected tissues at 72 hours post-infection (hpi) (Figure 6). Expression levels were higher in germinated spores.

We next investigated if Pv33 was broadly distributed in *P. viticola* populations. To do so, we performed PCRs with primers spanning from ATG to STOP on a set of isolates from different geographic origins. We obtained PCR products from all 7 European isolates tested, but not from isolates from North America (Supplementary Table 3). These results show that Pv33 is not specific to isolate Pv221 but it appears to be present at least in European populations.

33Δsp-mediated HR is SGT1-dependent and EDS1-independent

In order to shed light in the nature of the 33Δsp-induced cell death, we used Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) to study the role of *SGT1* and *EDS1* in this response. *EDS1* is required for the HR mediated by the TIR-NBS-LRR immune receptors, whilst *SGT1* is required for the cell death mediated by different plant-pathogen interactions. The phenotype of silenced plants fitted with was expected (Figure 7A). Transient expression of 33Δsp on *N. benthamiana* silenced for *EDS1* and *SGT1* resulted in the induction of cell death in EDS1-silenced plants and strong reduction of cell death in *SGT1*-silenced plants (Figure 7B). The silencing efficiency was monitored by quantitative RT-PCR (Figure 7C). These results indicate that the 33Δsp-triggered cell death requires SGT1 but it does not involve reconnaissance by a TIR-NBS-LRR type receptor.

33Δsp localizes to the nucleus and the localization is required for HR induction

To study cellular localization, we obtained GFP translational fusions of 33Δsp and 33FL. Transient expression of 33Δsp-GFP in *N. benthamiana* resulted in the fluorescence signal localized to the nucleus, and the signal appeared enhanced in the nucleolus (Figure 8A). Leaves transiently expressing 33FL-GFP presented an overall lower level of fluorescence (Fig 8B); nuclear fluorescence was reduced and fluorescent spots appeared in the contours of the plant cells (Figure 8A). Similar results were obtained with 33ΔSP-GFP in *V. vinifera* (Figure 8C), where the general lower expression level hindered us to observe any fluorescence in leave discs transiently expressing 33FL-GFP.

We next investigated if Pv33 contained a nuclear localisation signal (NLS). Search for NLS features using NLStradamus (**Nguyen et al, 2009**), NLS Mapper (**Kosugi et al, 2009**), NucPred (**Brameier et al, 2007**), Psort (**Nakai and Horton, 1999**), Predict NLS (**Yachdav et al, 2014**) and SeqNLS (**Lin and Hu, 2013**) didn't predict any canonical NLS.

To further study the role of nuclear localization in the induction of cell death by 33Δsp, we obtained translational fusions of 33Δsp-GFP containing a Nuclear Export Signal (NES) and a mutated, inactive nuclear export signal (nes). *33Δsp-GFP-NES* lost its ability to induce cell death when transiently expressed in *N. benthamiana* leaves, while *33Δsp-GFP-nes* retained the cell death-inducing ability (Figure 9A). Concerning their localization, 33Δsp-GFP-nes was localized to the nucleus, whilst no nuclear localization could be observed for 33Δsp-GFP-NES (Figure 9B). These results indicate that 33Δsp-triggered death cell is dependent on its nuclear localization.

Discussion

In this study we described a family of *Plasmopara viticola* secreted proteins possessing the WY-domain characteristic of oomycete RXLR effectors but lacking the eponymous motif. We showed that one of the members of this family, named Pv33, induces an SGT1-dependent cell death in grapevine and *Nicotiana* species, and that the nuclear localization of Pv33 is required for cell death induction. The fact that Pv33 induced cell death, together with the difficulty of genetic transformation in *P. viticola,* precluded us from validating its involvement in the virulence of the pathogen or its role in suppressing plant defences.

In some experiments the transient expression of Pv33 containing a signal peptide (33FL) resulted in necrotic spots and mild induction of *VvHSR*. Interestingly, 33FL-GFP shows residual nuclear localisation, which could explain the eventual mild induction of cell death by 33FL. In this context, the amount of protein localising to the nucleus after transient expression of 33FL would be below the threshold necessary to activate cell death, threshold that could be eventually attained in some particular experiments. Concerning the residual nuclear fluorescence, it could be the result of the signal peptide of Pv33 being inefficiently recognised by the plant secretion system. Alternatively, it could be a consequence of Pv33 being expressed under the control of a strong constitutive promoter (CaMV 35S), leading to an overload of Pv33 in the plant secretory system causing it to escape the secretion pathway and localize to the nucleus. A similar phenomenon has been described in the study of other oomycete effector proteins **(Bos et al., 2006)**; in fact, it is the reason why cell translocation assays using transient expression of effector genes with a signal peptide should be interpreted cautiously **(Petre and Kamoun, 2014)**. However, the overall low level of expression observed with 33FL-GFP suggest a low efficiency of its signal peptide *in planta*.

RNA-Seq data and RT-PCR experiments showed that Pv33 is expressed in sporangia, germinated spores and infected tissues at late infection, with the strongest expression being observed in germinated spores (Figure 6). Germinated spores present a germinative tube and may be considered as representative of the early stages of infection, with expression of effector genes taking place (**Mestre et al, 2012**). The expression pattern that we observe could thus fit with Pv33 being expressed at low level all through the *P. viticola* life cycle; the failure to detect it at early time points would be due to the small amount of pathogen present in the samples (Figure 6). It may be argued that Pv33 is expressed only in spores and that the expression observed at 72 hpi is the consequence of early sporulation taking place at this time point, which is not uncommon. Although we cannot rule out this possibility, the fact that we didn't observe any sporulation at 72 hpi, together with the RNA-Seq data

showing expression at 48 hpi (too early for the start of sporulation) makes us support the hypothesis of Pv33 being expressed upon infection.

Supporting a role of Pv33 in the life cycle of *P. viticola*, we found the gene in all European isolates tested. *P. viticola* was introduced into Europe from North America in the late XIXth century. It is thus surprising that Pv33 is not present in any of the North American isolates (Supplementary Table 3). This could be explained if there was variability in the presence of Pv33 in the original North American populations. For example, Pv33 could be dispensable in North American populations due to functional redundancy with other effectors; the bottleneck effect of the introduction could thus make Pv33 important for the pathogen's biology if the introduced isolate was missing other effectors with similar functions, or if it made it better adapted to the new host landscape.

The requirement for nuclear localisation for the Pv33-induced cell death, together with the fact that the response requires SGT1, rules out the possibility that the response is just caused by a cytotoxic effect of the protein. There are not many examples of cell death induction by RXLR effectors. *P. infestans* RXLR effector PexRD2 has been reported as inducing STG1-dependent cell death in *N. benthamiana* **(Oh et al., 2009)** and 10 *Solanum* species **(Vleeshouwers et al., 2008)**; *P. sojae* Avh241 induces cell death in several plant species **(Yu et al., 2012)**; PvRxLR16 from *P. viticola* induces cell death in *N. benthamiana* that is dependent on its nuclear localisation **(Xiang et al., 2017)**. Conversely, oomycete CRN effectors were first identified as inducing necrosis when transiently expressed in plants **(Torto et al., 2003)**. They are localised to the plant nucleus and nuclear localisation is required for the induction of HR **(Schornack et al., 2010)**. Interestingly, as it happens with Pv33, several CRNs have been shown to localise to the nucleus even when they lack a canonical NLS signal (**Schornack et al., 2010; Stam et al, 2013).** CRNs are considered as an ancestral class of oomycete effectors, since they are present in all lineages of oomycetes **(Schornack et al., 2010)** and they can be found in species with different life styles, from necrotrophic **(Lévesque et al., 2010)** to biotrophic **(Baxter et al., 2010; Mestre et al., 2016)**. It has been hypothesized that the necrosis-inducing effect of CRNs will not reflect their real function in the infection process but it would rather be a "phenotypic manifestation reporting on effector activity" **(Stam et al., 2013)**. The cell death induced by Pv33 could thus be a consequence of its overexpression and do not reflect its role in the infection process.

Otherwise, Pv33 function in the nucleus during infection may actually trigger plant cell death. Pv33 induces cell death both in members of the *Solanaceae* and the *Vitaceae*, which are phylogenetically distant. It seems thus unlikely that the response is mediated by an R-gene conserved between both families, although we cannot rule out the possibility that the cell death is caused by the indirect recognition of Pv33 by an R-gene guarding a well conserved target. Alternatively, the Pv33 induced cell

death could be a direct consequence of its effect on the plant nucleus, where it would target general nuclear mechanisms and/or a conserved nuclear protein. Independently of the underlying mechanism, the Pv33 induced cell death that we observe upon ectopic expression of the protein could be suppressed by another *P. viticola* effector in the context of infection, avoiding a negative effect in pathogen development.

The RXLR-dEER motif has been shown to be required for translocation of RXLR effectors inside the plant cell **(Whisson et al., 2007)**. Pv33 carries the WY-domain, a structural signature from RXLR effectors, and a dEER motif at the expected position, but it does not possess an obvious RXLR motif. This could set doubts about its eventual internalisation in plant cells, but the requirement for nuclear localization for the induction of cell death suggests that Pv33 would be translocated into plant cells. Anyway, the requirement for the RXLR motif for effector translocation does not seem to be as strict as initially thought. Research in other oomycetes, particularly the downy mildews, resulted in the identification of several effectors that are translocated inside the plant cell and lack canonical RXLR motifs. In *Pseudoperonospora cubensis*, effectors carrying a QXLR motif were shown to localize to the plant nucleus and induce an HR in *N. benthamiana* **(Tian et al., 2011)**; effector proteins from *Bremia lactucae* carrying a GKLR motif are recognised inside lettuce plant cells in an R-gene specific manner **(Stassen et al., 2013)**; ATR5 from *Hyaloperonospora arabidopsidis* is recognised inside Arabidopsis cells by the NLR RPP5 even when it lacks an RXLR motif **(Bailey et al., 2011)**, although it possesses a GRVR sequence at the equivalent position, which remains of the above-described GKLR. All these examples have in common possessing the EER motif, suggesting that its presence may release the pressure on the conservation of the RXLR motif for successful translocation. Examination of the Pv33 sequence, or an alignment of WY-domain proteins from the same clade, did not identify any conserved motif upstream of the EER similar to the above described. However, the DRD, ATSR or a second EER motif, present in Pv33 and conserved in several sequences, could be playing the same role as the other motifs already described in the oomycetes (Supplementary Figure 2).

In summary, here we described a secreted WY-domain-containing protein from the oomycete *P. viticola*, named Pv33, that is nuclear localized and induces immune responses in plant cells. **Xiang et al., (2017)** reported similar results with PvRxLR16, a canonical RXLR effector. However, contrary to PvRxLR16, Pv33 lacks RXLR or other motifs described in oomycetes, between the signal peptide and EER motifs. Besides, PvRxLR16-mediated cell death is N-glycosylation dependent, whilst our protein lacks any putative N-glycosylation sites. Our results suggest that secreted WY-domain containing proteins may be considered as effectors and should be taken into account when establishing the effector repertoire of plant pathogenic oomycetes.

Data availability

RNA-Seq data have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under study accession number SRP079325 (SRR7500369 to SRR7500377).

Acknowledgements

We are indebted to Sylvaine Boissinot for assistance and reagents for Immuno blotting, Liron Shenhav for help with qPCR, Jérôme Mutterer at IBMP Strasbourg for assistance with confocal microscopy, Mélanie Rouxel and François Delmotte at UMR SAVE Bordeaux for their contribution to the amplification of Pv33 in different isolates, and Yann Dussert for assistance with secretome and WY-domain analysis. We thank Sophien Kamoun for INF1 and Avr3A clones. We thank the SEAV at INRA-Colmar for technical support in the production of plants. Research funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant EFFECTOORES (ANR-13-ADAP-0003). MC was funded by a joint fellowship from INRA BAP Department and Region Alsace. EE and SS are funded by the Gatsby Charitable Foundation.

Figure Legends

Figure 1. Identification of WY-domain proteins from *P. viticola*.

(**A**) Venn-diagram showing the distribution of candidate RXLR effectors based on the method leading to their identification and their structural homology to known RXLR effectors. (**B**) Alignment of the N-terminal protein sequences of candidate effector genes showing structural homology to RXLR effectors but lacking the eponymous motif. Signal peptide (SP) and dEER motifs are highlighted. (**C**) Logo of the WY-domain obtained with GLAM2 using the 68 candidate effectors showing structural homology to RXLR effectors but lacking the motif. Boxed residues correspond to the conserved positions described in Boutemy et al, 2011.

Figure 2. Characterization of *P. viticola* WY-domain proteins.

(A) Phylogenetic tree obtained with the WY-domain proteins from *P. viticola*. Branch support values show 100 bootstraps. The three clades referred to in the text are highlighted in pink (I), blue (II) and green (III). Genes selected for further analysis are indicated (**B**) Expression level of WY-domain proteins in germinated spores (Sp) and infected tissues (hpi) at 48- and 72-hours post-infection. White colour shows absence of expression. Detailed expression data is shown in Supplementary Dataset 2.

Figure 3. Effector candidate Pv33 induces cell death in *Nicotiana spp*.

Agrobacterium-mediated transient expression of effector candidates Pv18, Pv31, Pv33, Pv82 without their signal peptide (Δsp) **(A)** and full-length Pv33, including its signal peptide (FL) **(B)** in *N. benthamiana*, *N. tabacum* and *N. occidentalis* leaves. All pictures were taken 5 days after agroinfiltration.

For each species, 6 leaves were infiltrated with all the effectors. The experiment was repeated 2 times with the same result.

Figure 4. The signal peptide of Pv33 is partially recognized by the plant secretory pathway.

(A) Constructs used in this experiment. PR1SP: signal peptide of PR1. Pv33SP: signal peptide of Pv33. **(B and C)** Confocal images following infiltration of N. benthamiana leaves with the constructs described in A, without **(B)** and with **(C)** BFA treatment. Red arrows show nucleus. Bars show 10 µm. Experiments were repeated twice with the same results.

Figure 5. Pv33 induces cell death in *V. vinifera* cv Syrah.

Agrobacterium-mediated transient expression of effector candidates Pv18, Pv31, Pv33, Pv82 without their signal peptide (Δsp) and full-length Pv33, including its signal peptide (FL) in *V. vinifera* Syrah leaf disks. **(A)** Macroscopic results. Pictures were taken 6 days after agroinfiltration and are representative of the phenotype of each effector. **(B)** Semi-quantitative RT-PCR showing *VvHSR* and transgene expression. *Actin* expression is used as reference.

Each effector-expressing Agrobacterium strain was infiltrated into 4 leaf discs and the experiment was repeated twice. The macroscopic effect of 33Δsp was not visible in all infiltrated discs but could be observed in both repetitions. RNA extractions for RT-PCRs were done by pooling the 4 disks for each effector.

Figure 6. Expression of Pv33 in *P. viticola* developmental stages.

Semi-quantitative RT-PCR of Pv33 expression in sporangia (Sp), germinated spores (Sg) and infected tissues at 0, 24, 48 and 72 hours after inoculation (hpi). Expression of *V. vinifera* Actin (*VvActin*) is shown as loading of samples corresponding to infected tissues. Expression of *P. viticola* Actin (*PvActin*) reflects pathogen biomass and shows progression of infection.

Figure 7. Pv33-triggered cell death requires SGT1.

(A) Habitus of *N. benthamiana* TRV-silenced plants used in this study. Pictures were taken 3 weeks after agroinfiltration with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for silencing of *uidA*, *EDS1* or *SGT1*. **(B)** Representative pictures of cell death assays on TRV-silenced leaves. Pictures were taken 5 days after agroinfiltreation with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for constitutive expression of uidA (GUS), 33 full length (33FL) or without signal peptide (33Δsp), or a 1:1 combination of *Xanthomonas* effector AvrBs3 and the resistance gene Bs4, used as positive control. The experiment was performed in quadruplicate (N = 32). **(C)** Validation of virus-induced gene silencing by quantitative RT-PCR. Accumulation of transcripts from *N. benthamiana* genes *EDS1* and *SGT1* in 6 individual plants, 3 weeks after agroinfiltration with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for TRV-induced gene silencing of *uidA*, *EDS1* and *SGT1*. Data are shown relative to *L23* and *F-BOX* reference genes. Circles represent ratios, lines represent means. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA and Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

Figure 8. Pv33 localizes to the nucleus.

(A) Confocal microscopy images following infiltration of *N. benthamiana* leaves with Agrobacterium carrying GFP translational fusions of Pv33 either lacking (33Δsp-GFP) or including (33FL-GFP) the signal peptide. GFP alone was used as control. **(B)** Low magnification epifluorescence microscopy images of 33ΔSP-GFP and 33FL-GFP infiltrations. **(C)** Epifluorescence microscopy images following infiltration of *V. vinifera* cv Syrah leaf discs with Agrobacterium carrying 33ΔSP-GFP and 33FL-GFP**.**

Pictures were taken 2 days after agroinfiltration. Experiments were repeated 5 times for *N. benthamiana* and twice for *V. vinifera*, with the same results. Bar shows 25 µm.

Figure 9. Pv33-triggered cell death depends on its nuclear localisation.

(A) Agrobacterium-mediated transient expression of *N. benthamiana* leaves with 33Δsp-GFP fused to either an active (33Δsp-GFP-NES) or inactive (33Δsp-GFP-nes) nuclear exclusion sequence. Pictures were taken 5 days after agroinfiltration under white and blue light. **(B)** Subcellular localisation of 33Δsp-GFP-NES and 33Δsp-GFP-nes as observed by confocal microscopy 2 days after agroinfiltration. **(C)** Western blot with anti-GFP of the different GFP-tagged Pv33 versions. GFP is used as positive control. Ponceau red staining of the nitrocellulose membrane is shown as loading marker.

Results shown in A and B are representative of 3 independent experiments, each consisting of at least 6 *N. benthamiana* leaves infiltrated as shown in A.

Supplementary Material

Supplementary Figure 1. *Selected P. viticola* WY-domain secreted proteins do not suppress the INF1-mediated cell death in *N. benthamiana*.

Supplementary Figure 2. Pv33 protein sequence and alignment of the N-terminus of WY-domain proteins from the same clade as Pv33.

Supplementary Table 1. RNA-Seq statistics and RSA accession numbers.

Supplementary Table 2. Constructs and primers used in this study.

Supplementary Table 3. Results of amplification of the Pv33 sequence in *P. viticola* isolates.

Supplementary Dataset 1. Protein sequences of the 68 WY-domain proteins containing dEER motifs.

Supplementary Dataset 2. RNA-Seq data.

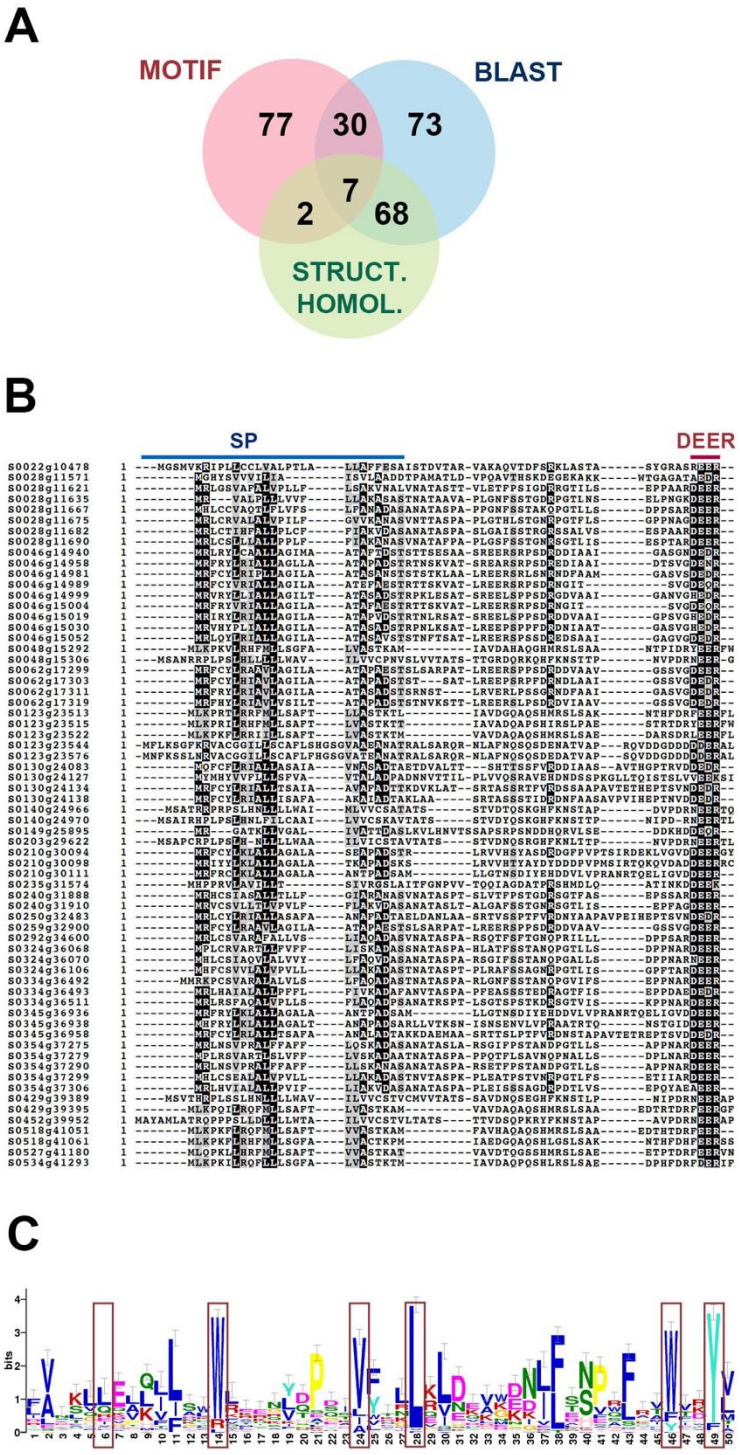


Figure 1. Identification of WY-domain proteins from *P. viticola*.

(**A**) Venn-diagram showing the distribution of candidate RXLR effectors based on the method leading to their identification and their structural homology to known RXLR effectors. (**B**) Alignment of the N-terminal protein sequences of candidate effector genes showing structural homology to RXLR effectors but lacking the eponymous motif. Signal peptide (SP) and dEER motifs are highlighted. (**C**) Logo of the WY-domain obtained with GLAM2 using the 68 candidate effectors showing structural homology to RXLR effectors but lacking the motif. Boxed residues correspond to the conserved positions described in Boutemy et al, 2011.

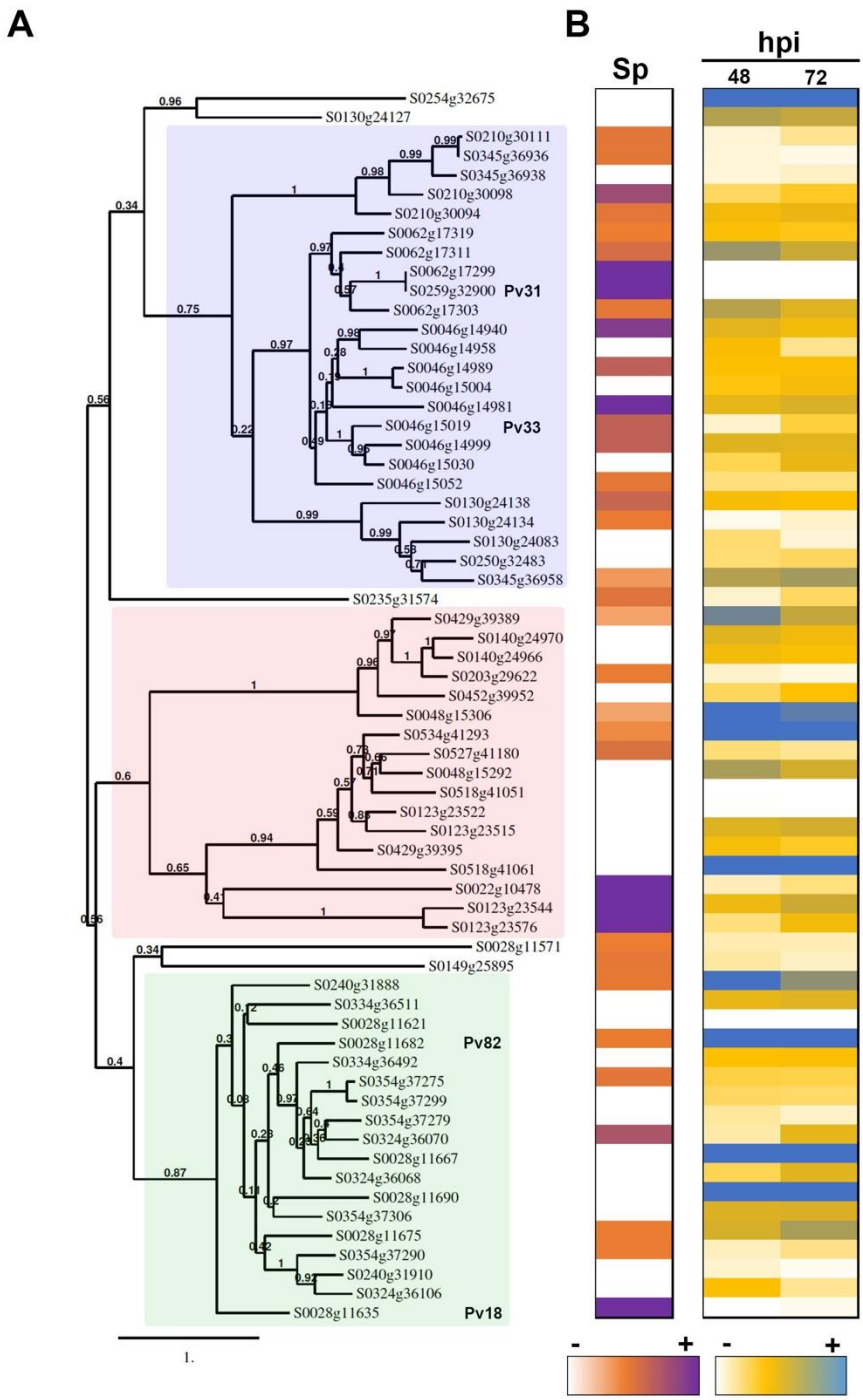


Figure 2. Characterization of *P. viticola* WY-domain proteins.

(A) Phylogenetic tree obtained with the WY-domain proteins from *P. viticola*. Branch support values show 100 bootstraps. The three clades referred to in the text are highlighted in pink (I), blue (II) and green (III). Genes selected for further analysis are indicated. (**B**) Expression level of WY-domain proteins in germinated spores (Sp) and infected tissues (hpi) at 48- and 72-hours post-infection. White colour shows absence of expression. Detailed expression data is shown in Supplementary Dataset 2.

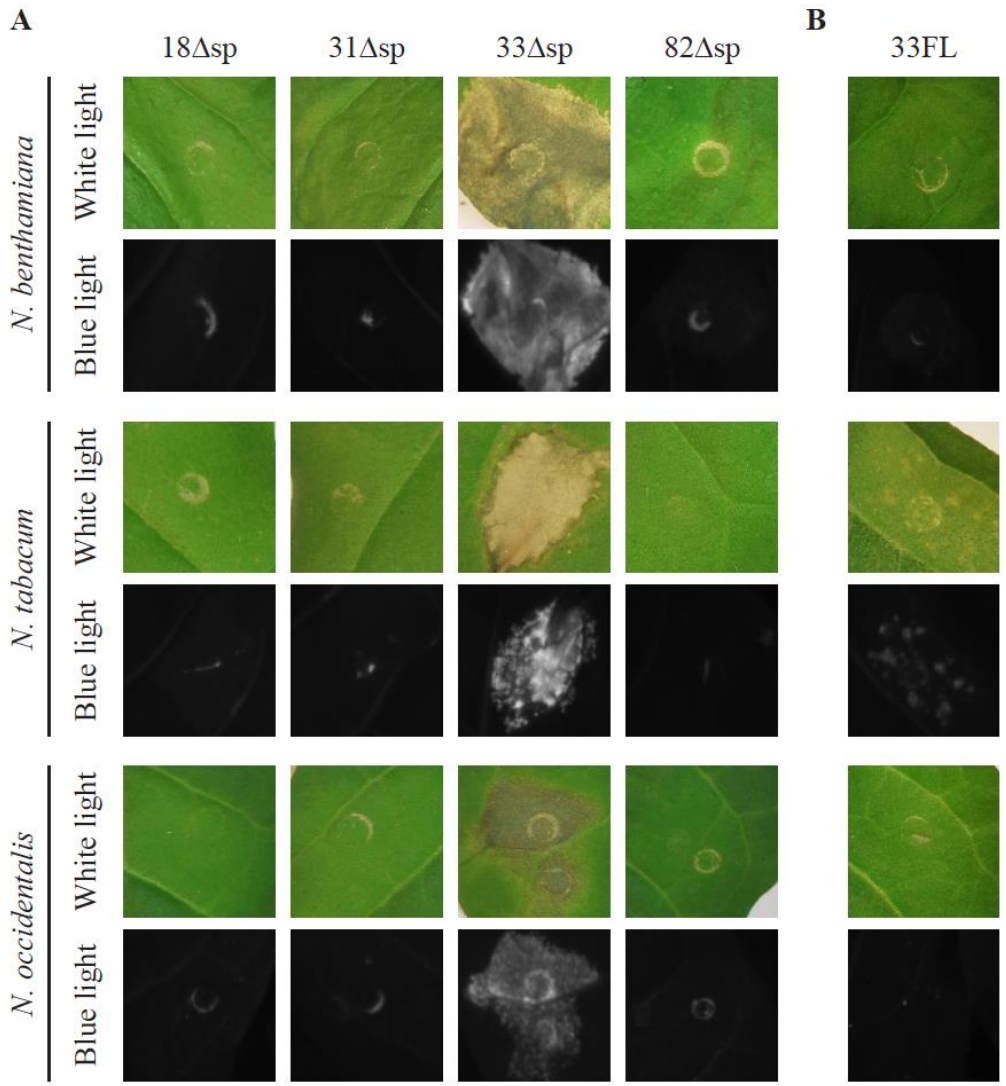


Figure 3. Effector candidate Pv33 induces cell death in *Nicotiana spp*.
Agrobacterium-mediated transient expression of effector candidates Pv18, Pv31, Pv33, Pv82 without their signal peptide (Δsp) **(A)** and full-length Pv33, including its signal peptide (FL) **(B)** in *N. benthamiana*, *N. tabacum* and *N. occidentalis* leaves. All pictures were taken 5 days after agroinfiltration.
For each species, 6 leaves were infiltrated with all the effectors. The experiment was repeated 2 times with the same result.

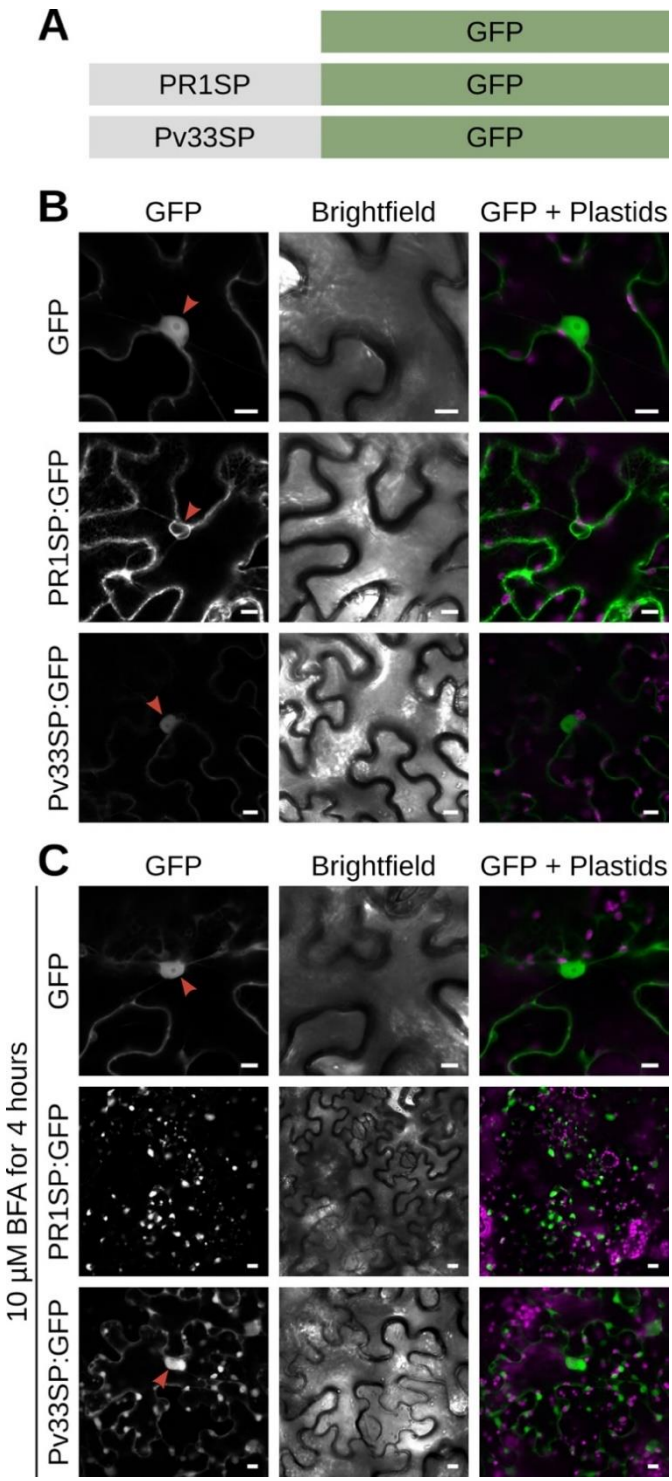


Figure 4. The signal peptide of Pv33 is partially recognized by the plant secretory pathway.

(A) Constructs used in this experiment. PR1SP: signal peptide of PR1. Pv33SP: signal peptide of Pv33. **(B and C)** Confocal images following infiltration of N. benthamiana leaves with the constructs described in A, without **(B)** and with **(C)** BFA treatment. Red arrows show nucleus. Bars show XX µm.

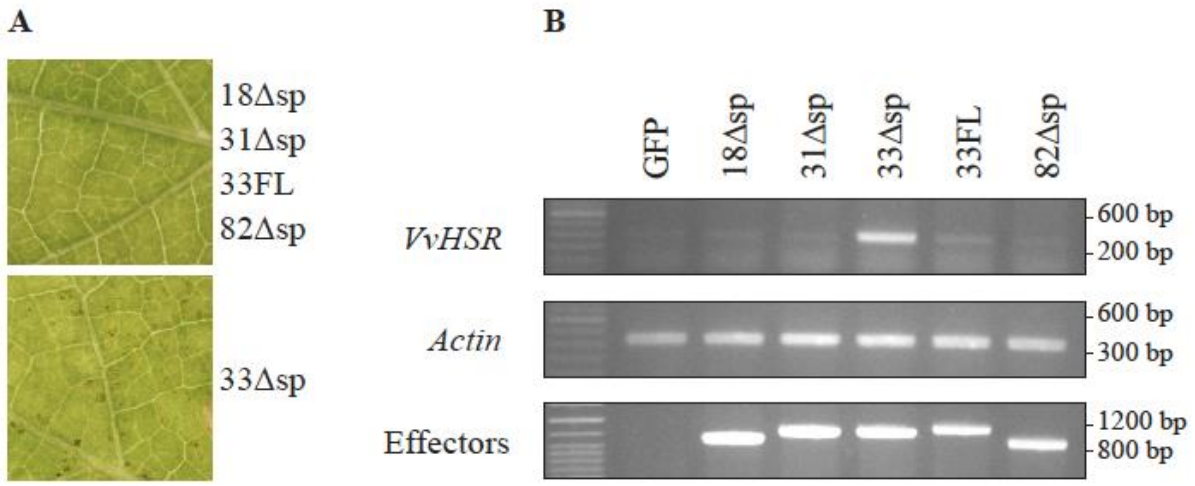


Figure 5. Pv33 induces cell death in *V. vinifera* cv Syrah.
Agrobacterium-mediated transient expression of effector candidates Pv18, Pv31, Pv33, Pv82 without their signal peptide (Δsp) and full-length Pv33, including its signal peptide (FL) in *V. vinifera* Syrah leaf disks. **(A)** Macroscopic results. Pictures were taken 6 days after agroinfiltration and are representative of the phenotype of each effector. **(B)** Semi-quantitative RT-PCR showing *VvHSR* and transgene expression. *Actin* expression is used as reference.
Each effector-expressing Agrobacterium strain was infiltrated into 4 leaf discs and the experiment was repeated twice. The macroscopic effect of 33Δsp was not visible in all infiltrated discs but could be observed in both repetitions. RNA extractions for RT-PCRs were done by pooling the 4 disks for each effector.

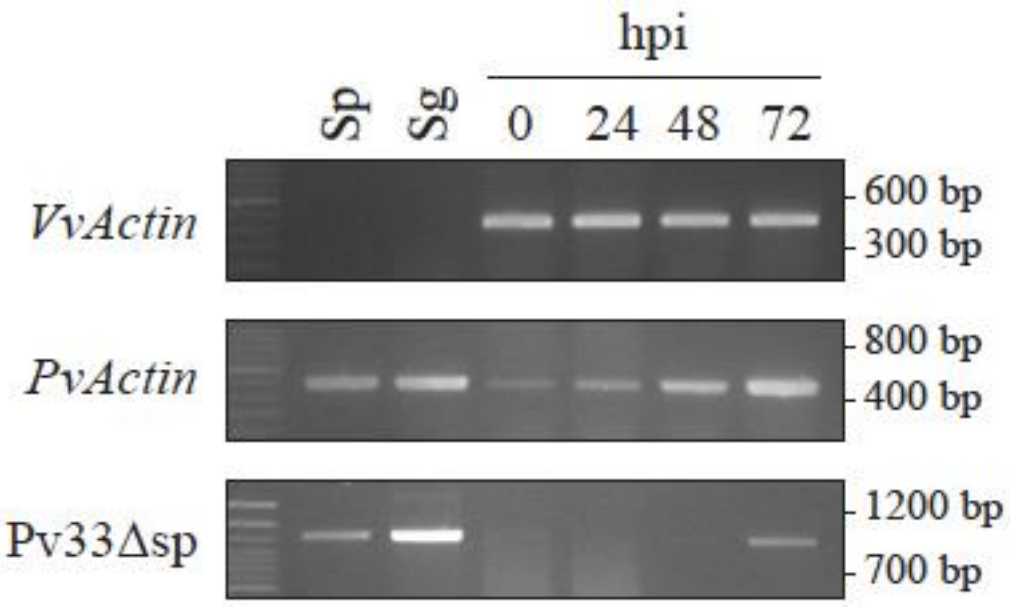


Figure 6. Expression of Pv33 in *P. viticola* developmental stages.
Semi-quantitative RT-PCR of Pv33 expression in sporangia (Sp), germinated spores (Sg) and infected tissues at 0, 24, 48 and 72 hours after inoculation (hpi). Expression of *V. vinifera* Actin (*VvActin*) is shown as loading of samples corresponding to infected tissues. Expression of *P. viticola* Actin (*PvActin*) reflects pathogen biomass and shows progression of infection.

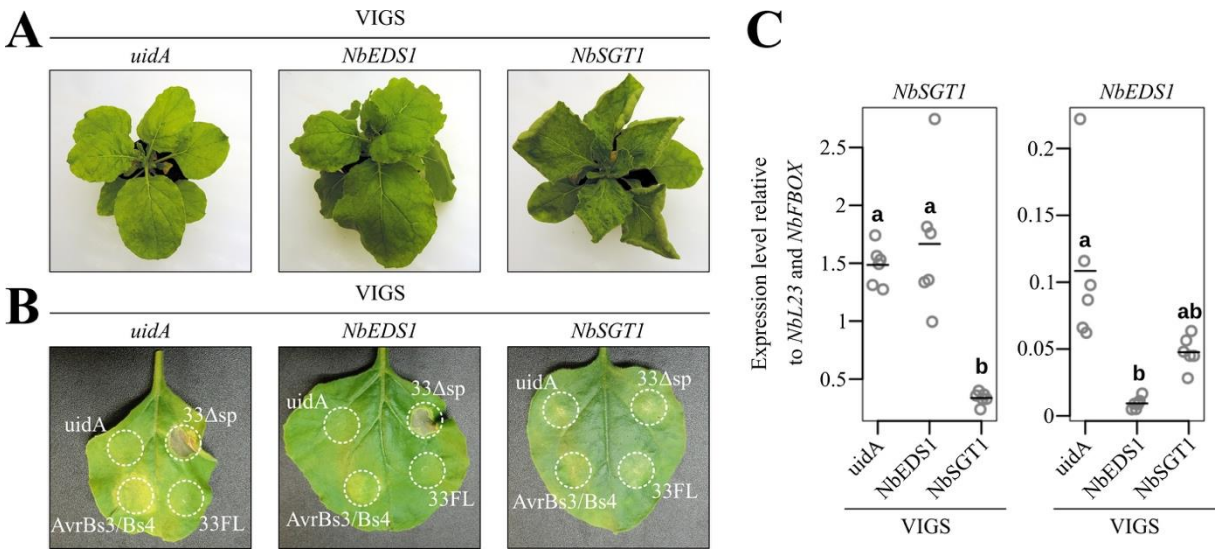


Figure 7. Pv33-triggered cell death requires SGT1.
(A) Habitus of *N. benthamiana* TRV-silenced plants used in this study. Pictures were taken 3 weeks after agroinfiltration with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for silencing of *uidA*, *EDS1* or *SGT1*. **(B)** Representative pictures of cell death assays on TRV-silenced leaves. Pictures were taken 5 days after agroinfiltreation with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for constitutive expression of uidA (GUS), 33 full length (33FL) or without signal peptide (33Δsp), or a 1:1 combination of *Xanthomonas* effector AvrBs3 and the resistance gene *Bs4*, used as positive control. The experiment was performed in quadruplicate (N = 32). **(C)** Validation of virus-induced gene silencing by quantitative RT-PCR. Accumulation of transcripts from *N. benthamiana* genes *EDS1* and *SGT1* in 6 individual plants, 3 weeks after agroinfiltration with *A. tumefaciens* cells carrying a construct for TRV-induced gene silencing of *uidA*, *EDS1* and *SGT1*. Data are shown relative to *L23* and *F-BOX* reference genes. Circles represent ratios, lines represent means. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA and Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

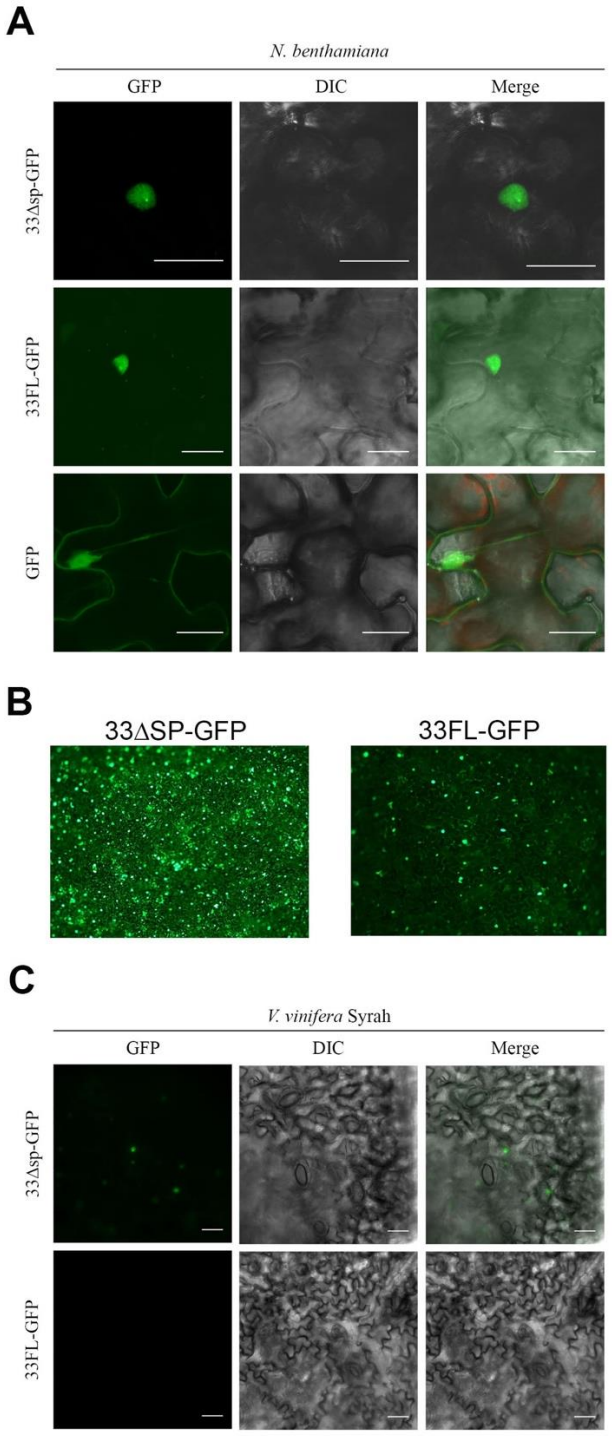


Figure 8. Pv33 localizes to the nucleus.
(A) Confocal microscopy images following infiltration of *N. benthamiana* leaves with Agrobacterium carrying GFP translational fusions of Pv33 either lacking (33Δsp-GFP) or including (33FL-GFP) the signal peptide. GFP alone was used as control. **(B)** Low magnification epifluorescence microscopy images of 33ΔSP-GFP and 33FL-GFP infiltrations. **(C)** Epifluorescence microscopy images following infiltration of *V. vinifera* cv Syrah leaf discs with Agrobacterium carrying 33ΔSP-GFP and 33FL-GFP**.**

Pictures were taken 2 days after agroinfiltration. Experiments were repeated 5 times for *N. benthamiana* and twice for *V. vinifera*, with the same results. Bar shows 25 µm.

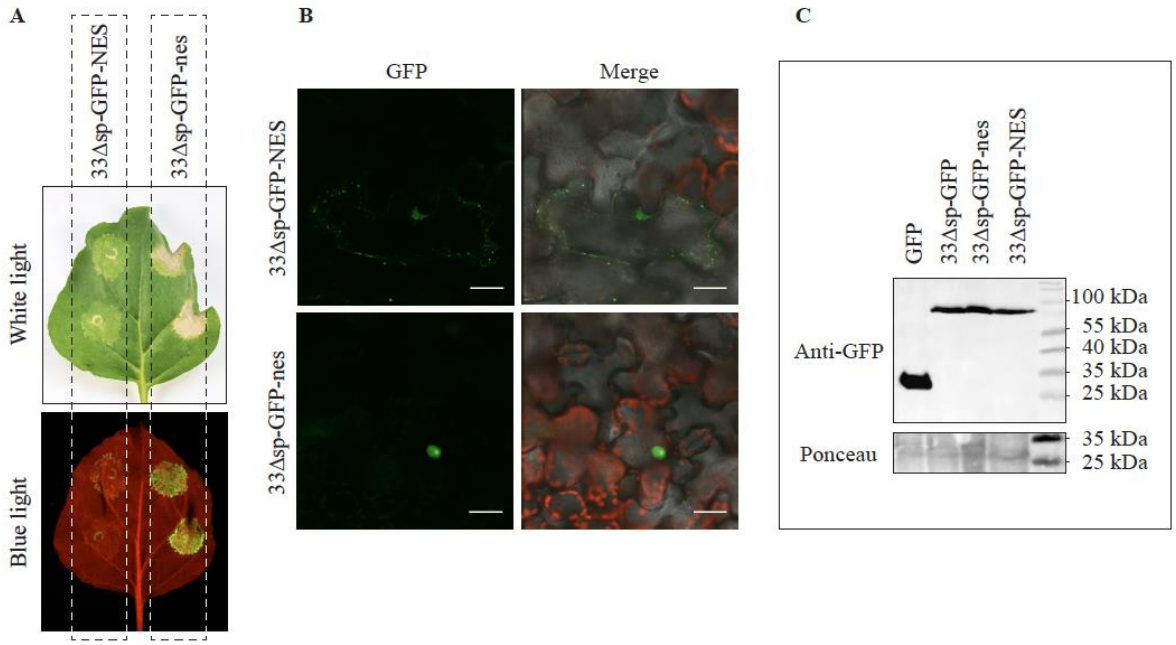
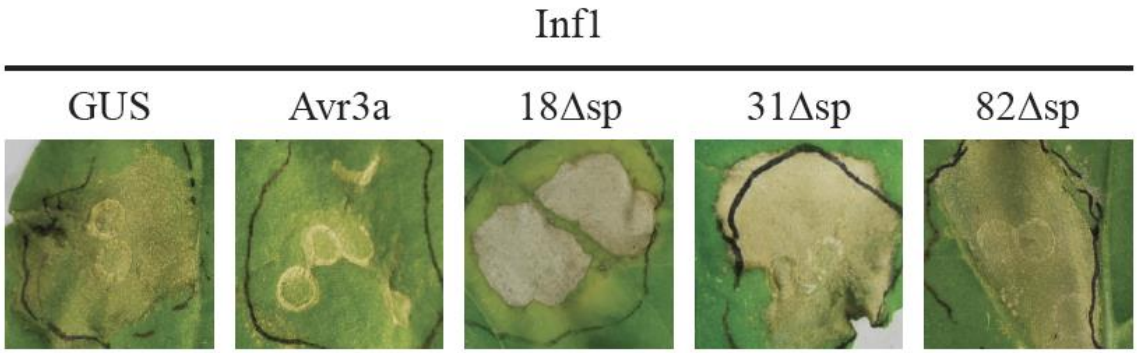


Figure 9. Pv33-triggered cell death depends on its nuclear localisation.
(A) Agrobacterium-mediated transient expression of *N. benthamiana* leaves with 33Δsp-GFP fused to either an active (33Δsp-GFP-NES) or inactive (33Δsp-GFP-nes) nuclear exclusion sequence. Pictures were taken 5 days after agroinfiltration under white and blue light. **(B)** Subcellular localisation of 33Δsp-GFP-NES and 33Δsp-GFP-nes as observed by confocal microscopy 2 days after agroinfiltration. **(C)** Western blot with anti-GFP of the different GFP-tagged Pv33 versions. GFP is used as positive control. Ponceau red staining of the nitrocellulose membrane is shown as loading marker.

Results shown in A and B are representative of 3 independent experiments, each consisting of at least 6 *N. benthamiana* leaves infiltrated as shown in A.



Supplementary Figure 1. *Selected P. viticola* WY-domain secreted proteins do not suppress the INF1-mediated cell death in *N. benthamiana*.

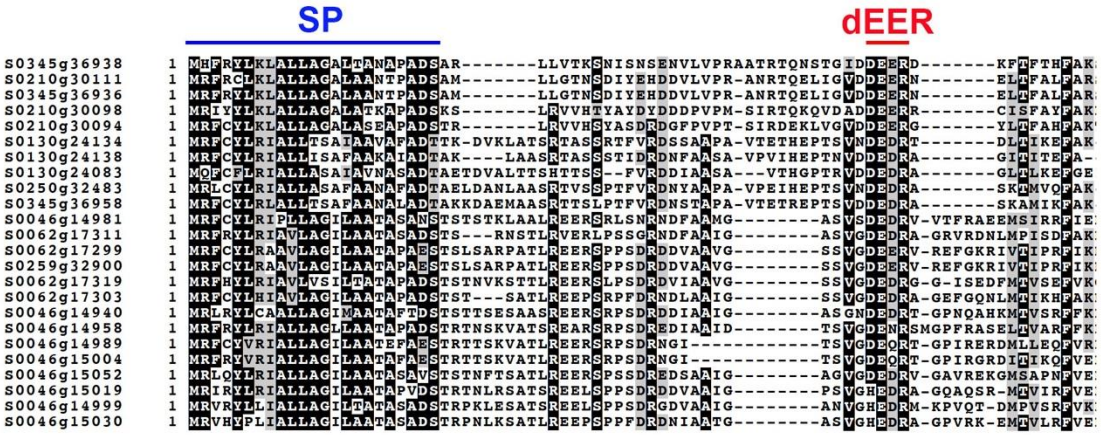
Agrobacterium strains containing the different clones were infiltrated in *N. benthamiana* leaves. One day later, INF1 was transiently expressed in the infiltrated patches. Pictures are taken 5 days after INF1 agrobacterium-mediated infiltration. GUS as Avr3A are used as respectively as negative and positive control for INF1-mediated cell death suppression.

A

Pv33 / Pv221r_s0046g15019

MRIRYLRIALLAGILAATAPVDSTRTNLRSATSREELSPPSDRDDVAAIGPSVGHEDRAGQAQSRMTVIRFVEEVLLSDY
KTRRKAVEGFSKKYAAMVKKQIVPQQLYQSMVAESTRKPLLTTESWRKWAFLASKYCAKKGKDPHEYIAEVMLHHYG
AFRFSEILAAAADRRSTKRLVVKLQEVQIPLWLQHQYQPHQVFNLLRVEDVWKKNVLASPQFIIWTRYLKRLREAEYVN
DPIGTEVRSLCKFLAYDRLLKMLMLPENTVNIRGAPYLQALIPIMVNDVVFPSDVLSMLLEGVKRGNDQFTLLLIYGPASS
FWMTYFETFNEQYSLHNAYLFKTLTSVFEVPELLTMLHAALIAPDDYKSGMALLYLEKQFSEWKTAKVTKATDIEPPLINL
PRESRPTFKAIWLAYAKFWKYNIRPSRANFQM

B



Supplementary Figure 2. Pv33 protein sequence and alignment of the N-terminus WY-domain proteins from the same clade as Pv33.

(A) Pv33 protein sequence. Signal peptide, dEER and WY motifs are respectively highlighted in blue, red and green. **(B)** Alignment of the N-terminus of the WY-domain proteins from clade X in Figure 2. Signal peptide (SP) and dEER motifs are highlighted. Alignment performed with ClustalW and displayed with BOXshade, with a cutoff of 70% of sequences identical for shading

Supplementary Table 1. RNA-Seq statistics and RSA accession numbers.

Provider	Sample	Biological replicate	Host	Tissue	# of pairs	size (nt)	# of unambiguous mapped pairs on Pv221 genome	SRA accession
INRA / GET-Plage	Pv221 24hpi	1	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	46 047 551	100	16 670	SRR7500372
INRA / GET-Plage	Pv221 24hpi	2	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	31 978 558	100	29 439	SRR7500373
INRA / GET-Plage	Pv221 24hpi	3	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	26 751 573	100	19 740	SRR7500375
INRA / GET-Plage	Pv221 48hpi	1	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	48 442 856	100	1 294 356	SRR7500376
INRA / GET-Plage	Pv221 48hpi	2	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	53 270 151	100	307 908	SRR7500369
INRA / GET-Plage	Pv221 48hpi	3	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	30 664 708	100	227 777	SRR7500370
INRA / GET-Plage	Pv221 72hpi	1	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	31 057 365	150	369 013	SRR7500374
INRA / GET-Plage	Pv221 72hpi	2	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	37 993 907	150	1 314 505	SRR7500371
INRA / GET-Plage	Pv221 72hpi	3	Vitis vinifera cv. Muscat Ottonel	leaves	36 069 269	150	304 513	SRR7500377

Supplementary Table 2. Constructs and primers used in this study.

Gene identities

Pv18	Plvit221r1_S0028g11635
Pv31	Plvit221r1_S0259g32900
Pv33	Plvit221r1_S0046g15019
Pv82	Plvit221r1_S0028g11682

Constructs

18Δsp	35S:Pv18$_{\Delta 1\text{-}19}$
31Δsp	35S:Pv31$_{\Delta 1\text{-}23}$
33Δsp	35S:Pv33$_{\Delta 1\text{-}23}$
82Δsp	35S:Pv82$_{\Delta 1\text{-}22}$
33FL	35S:Pv33
33Δsp-GFP	35S:Pv33$_{\Delta 1\text{-}23}$-GFP
33FL-GFP	35S:Pv33-GFP
33Δsp-GFP-NES	35S:Pv33$_{\Delta 1\text{-}23}$-GFP-NES
33Δsp-GFP-nes	35S Pv33$_{\Delta 1\text{-}23}$-GFP-nes

Primers for cloning in binary plasmids (restriction sites underlined)

PvRXL18sp	5' GCCAAATCTAGAATGTCTACGAATGCGACTGC
PvRXL18R	5' TAGAAGCCCGGGCTATGCTGGTGCGGTGGT
PvRXL31sp	5' GCACCCTCTAGAATGACAAGTCTGAGTGCC
PvRXL31R	5' ACAACACCCGGGTCACATTACAAAATCCTC
PvRXL33F	5' TCATTCTCTAGAATGCGCATTCGCTACTTG
PvRXL33sp	5' GCACCCTCTAGAATGACAAGGACGAATCTTCG
PvRXL33R	5' CTCTTGCCCGGGTCACATTTGAAAATTCGC
PvRXL33gfF	5' TCATTCGTCGACATGCGCATTCGCTACTTG
PvRXL33gfsp	5' GCACCCGTCGACATGACAAGGACGAATCTTCG

PvRXL33gfR 5' CTCTTGTCTAGACATTTGAAAATTCGCTC

PvRXL82sp 5' GCAAAATCTAGAATGTCTGCGAATGCGACAGCA

PvRXL82R 5' ACTAGTCCCGGGCTACAACTCCTCTGCCAG

GFP-F 5' GACTAGTCTAGAATGAGTAAAGG

GFPNES

5' GCAAACcccgggCTACTTGTTAATATCAAGTCCAGCCAACTTAAGAGCAAGCTCGTTtttgtatagttcatccatg

GFPnes

5' GCAAACcccgggCTACTTGTTAGCATCTGCTCCAGCTGCCTTAAGAGCAAGCTCGTTtttgtatagttcatccatg

Primers for V. vinifera HSR and Actin for RT-PCR

VvACT-F 5' GTGCCAATTTATGAAGGTTATGC

VvACT-R 5' CCCTCTCAGTTAGAATCTTCATCAG

VvHSR-F 5' GGACTACCGACATGCACCTG

VvHSR-R 5' CCTGGACAATTCTGCCATCT

Supplementary Table 3. Results of PCR amplification of Pv33 on genomic DNA from P. viticola isolates from different geographical origins and host sources. PCRs were performed using primers designed to amplify the whole gene sequence, from ATG to STOP. PCR with primers for the P. viticola tubulin gene confirmed the presence of pathogen DNA in all samples.

Isolate	Host	Collection site	Amplification
PvSC	*V. vinifera*	Colmar, France	✓
Pv393	*V. vinifera*	Cugnasco, Switzerland	✓
Pv340	*V. vinifera*	Tolcsva, Hungary	✓
Pv257	*V. vinifera*	Listrac, France	✓
Pv125	Regent	Pécs, Hungary	✓
Pv412	Regent	Cugnasco, Switzerland	✓
Pv13	Regent	Latresne, France	✓
MSU1106	*V. vinifera*	Clarksville, Michigan, USA	✗
NY220	*V. vinifera*	Long Island, New York, USA	✗
MSU1052	*V. labrusca*	Fenville, Michigan, USA	✗
MSU319	*V. labrusca*	Stones, Ohio, USA	✗
MSU330	*V. aestivalis*	Markko, Ohio, USA	✗
WV16	*V. aestivalis*	Convington, West Virginia, USA	✗
MSU162	*V. vinifera*	Jackson, Michigan, USA	✗
FLO23	*V. aestivalis*	Thallahassee, Florida, USA	✗
NY328	*V. riparia*	Ithaca, New York, USA	✗
MSU1172	*V. riparia*	Fennville, Michigan, USA	✗

2. Suite de l'analyse fonctionnelle de la protéine Pv33, appartenant à la famille WY-*domain* de *P. viticola*

Pv33 est donc une protéine de *P. viticola* qui présente de grande similarité avec certains effecteurs RXLR identifiés chez d'autres oomycète décrits dans la littérature. Elle ne possède pas ce motif RXLR caractéristique, mais les motifs EER et WY associés sont présents. Par des approches d'expression transitoire il a été montré que, par sa localisation nucléaire, Pv33 induit des nécroses chez des Nicotianeae et chez *V. vinifera* cv. Syrah. Celles-ci sont dépendantes de SGT1 mais non de EDS1. En dehors de ces résultats soumis à publication, l'étude de Pv33 a été prolongée au cours de la thèse.

La plupart des approches qui vont être décrites à la suite de ce manuscrit n'ont pas encore amené leurs conclusions et soulèvent beaucoup de questions. Globalement, la localisation cellulaire de Pv33 a été étudiée plus finement et la recherche des interactants de Pv33 a été initiée. La recherche des cibles est une étape incontournable pour mieux comprendre le rôle d'un effecteur dans le pouvoir pathogène. Grâce à l'étude des interactants candidats, il est escompté d'identifier les bases moléculaires de la mort cellulaire induite par Pv33 et par extension son rôle dans la virulence de *P. viticola*.

2.1 Résultats

2.1.1 Recherche des interactants de Pv33

Pour identifier les possibles cibles de Pv33, les interactants de Pv33 ont été recherchés par immunoprécipitation (IP). Pour cela, une construction de la protéine marquée par la protéine fluorescente dans le jaune mCitrine et le tag FLAG, mCitrine-FLAG-33Δsp, a été réalisée par le Dr. E. Evangelisti au Sainsbury Laboratory Cambridge. Après expression chez *N. benthaliana* par agroinfiltration foliaire, les protéines sont extraites et la citrine est précipitée à l'aide de billes liées à des anticorps, retenant Pv33 et ses interactants avec elle. Un Western Blot anti-FLAG permet de vérifier la correcte précipitation de la protéine taguée. Les protéines sont ensuite digérées à la Trypsine et les peptides sont ionisées, puis séparés et détectés par un spectromètre de masse **(Figure 51)**. Les peptides sont identifiés par le logiciel Scaffold à partir de la base de données UniProt.

Les expériences d'IP avec mCitrine-FLAG-33Δsp, réalisées par le Dr. Evangelisti, on conduit à l'identification de 201 protéines candidates. Des nombreux projets de recherche de l'équipe du Sainsbury Laboratory se sont orientés dans la recherche des interactants d'effecteurs de pathogènes

de plantes par immunoprécipitation. Grâce à leur savoir-faire, ils ont pu constituer un catalogue de protéines qui apparaissent de façon récurrente dans les différentes expériences d'immunoprécipitation. À l'aide de ce catalogue, j'ai procédé à l'identification et l'élimination des faux positifs de ma liste de candidats, c'est-à-dire l'élimination des protéines qui sont retenues aux billes, à l'anticorps anti-Citrine ou à l'effecteur de façon aspécifique. Ce premier filtre a permis d'éliminer 99 protéines qui par le passé sont apparues dans les immunoprécipitations d'au moins deux effecteurs. Ce sont potentiellement de faux positifs ou des interactants aspécifiques. Ensuite il a été nécessaire d'établir des priorités pour les 102 protéines candidates restantes. Pour cela, trois critères ont été suivis pour classer les protéines comme non-prioritaires :

Les protéines qui ont une localisation chloroplastique ou mitochondriale : 16 protéines sont concernées.

Les protéines qui sont retrouvées dans l'IP d'au moins un autre effecteur : 32 protéines sont concernées.

Les protéines qui appartiennent à une famille protéique dont une autre protéine a été identifiée dans l'IP d'un autre effecteur : 33 protéines sont concernées.

Après cette priorisation, 21 protéines candidates ont été retenues et qualifiées de potentiellement spécifiques **(Figure 52)**. Parmi elles, trois sont des protéines nucléaires et présentent donc la même localisation cellulaire que Pv33 : l'histone-lysine N-methyltransferase SUVH1, le facteur de transcription trihelix GTL1-like et RPN9, qui intervient dans la dégradation protéique.

RPN9 appartient au complexe protéique appelé protéasome 26S qui peut être localisé dans le cytosol et le noyau. Ce complexe est en charge de la dégradation des protéines mal repliées **(Jin et al., 2006; Smalle and Vierstra, 2004)**. Seize composantes du protéosome ont été détectées dans les 201 protéines identifiées par l'IP de Pv33. Cependant, beaucoup de sous-unités du protéasome 26S sont détectées dans les IP de 4 autres effecteurs, ce qui nous conduit à penser que RPN9 doit être un faux positif qui est passé entre les mailles du filet du tri.

GTL1 est un facteur de transcription qui a été montré comme étant impliqué dans la régulation de la tolérance au stress hydrique, la croissance cellulaire et l'immunité végétale **(Breuer et al., 2009; Yoo et al., 2010; Völz et al., 2018).** Une récente publication montre que GTL1 fait partie de la cascade de signalisation MPK4, il a un impact important sur le métabolisme et le transport de l'acide salicylique et participe à la résistance contre la bacterie *P. syringae* **(Völz et al., 2018)**.

SUVH1 est une histone méthyle-transférase qui appartient à la sous famille de SU(VAR)3-9. La méthylation des histones implique des modifications importantes de la structure de l'ADN et de son

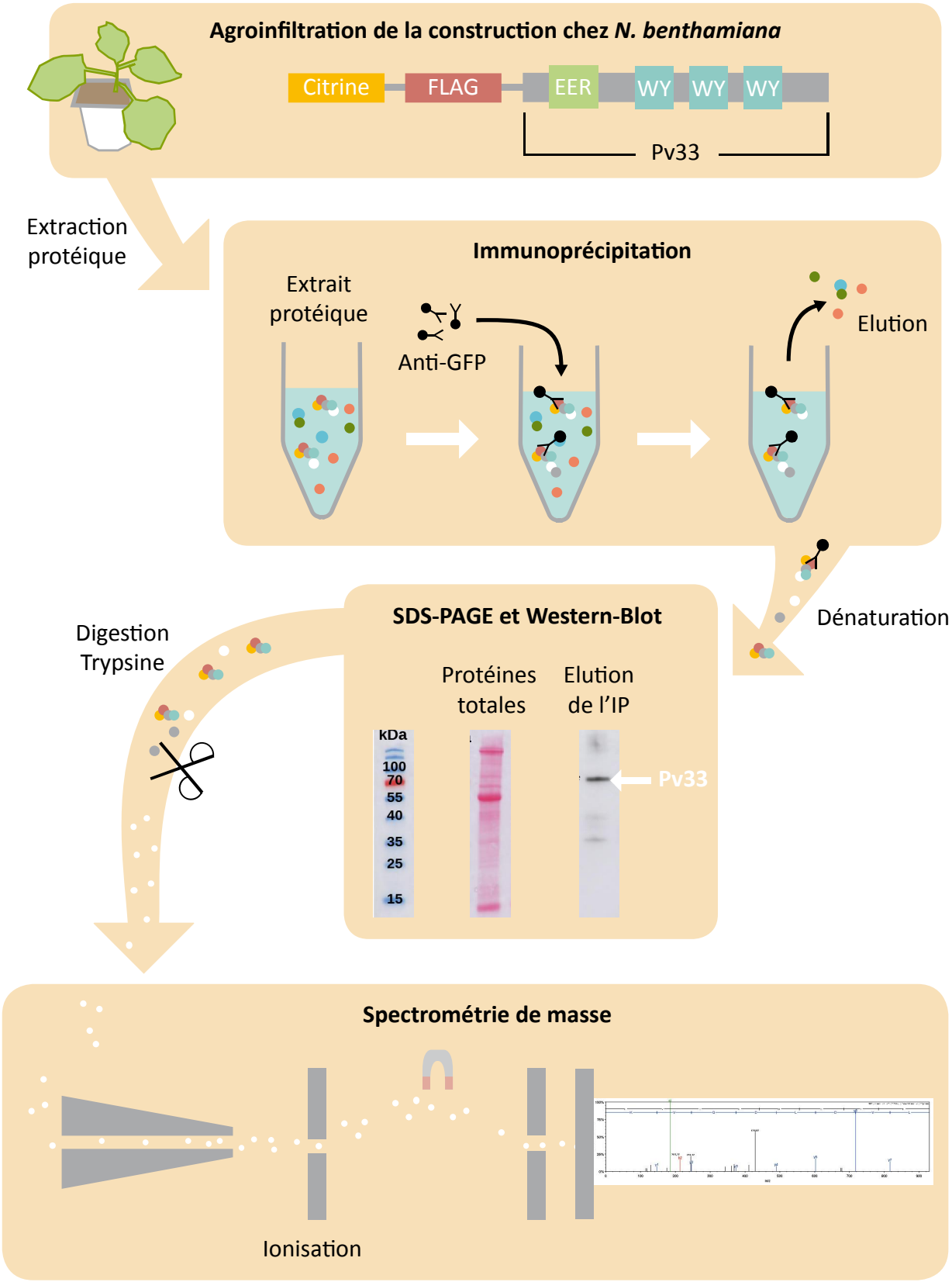
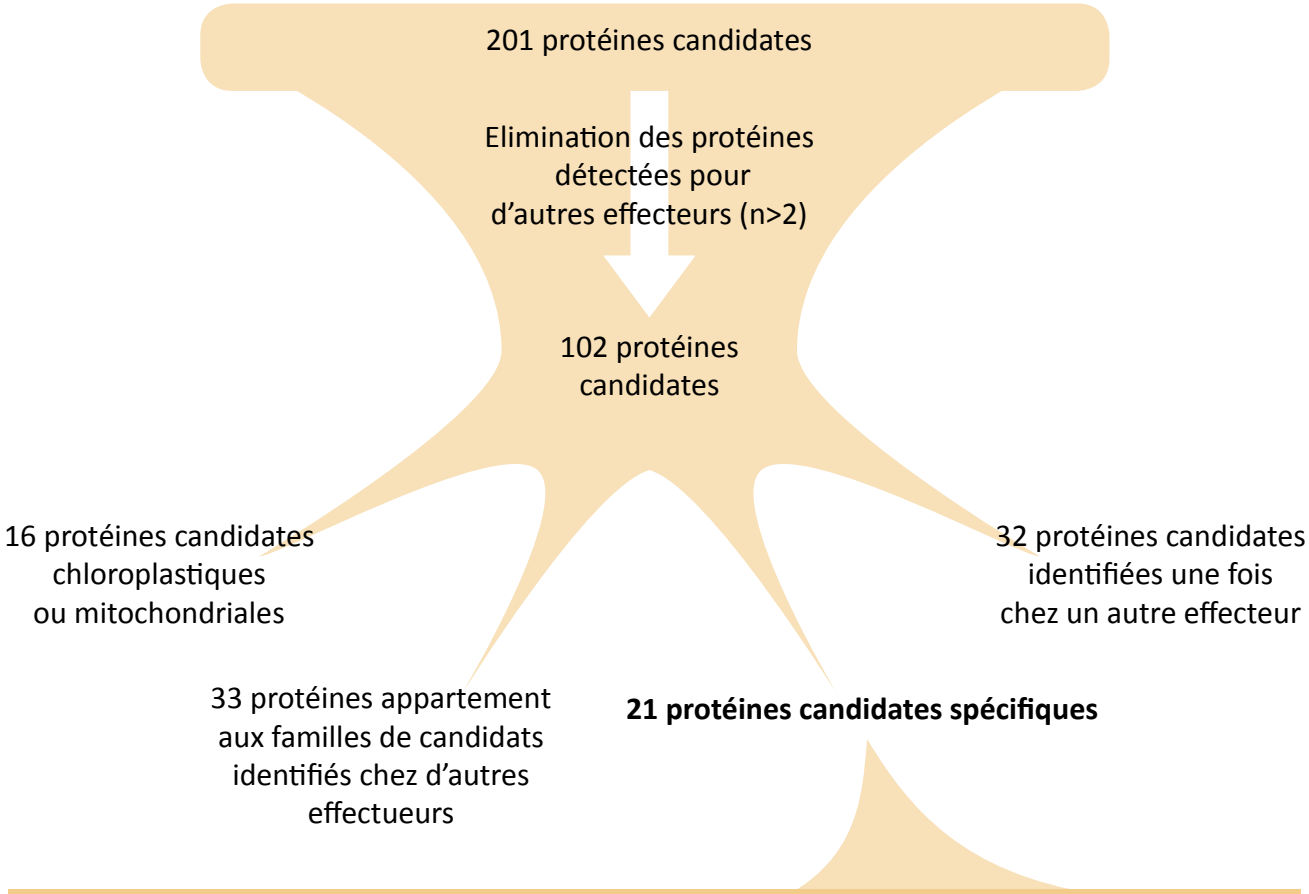


Figure 51 : Procédure pour identifier les interactants de Pv33.
La construction mCitrine:FLAG-33Δsp est exprimée dans *N. benthamiana* à l'aide d'*A. tumefaciens*. Les protéines sont extraites et immunoprécipitées : Pv33 et ses interactants sont retenus à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Les protéines éluées sont ensuite dénaturées, séparées par SDS-PAGE et digérées à la Trypsine. La présence de l'effecteur est confirmée par Western Blot à l'aide d'anticorps anti-FLAG. Les peptides sont ensuite ionisés et séparés au spectromètre de masse en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le détecteur convertit les impacts en courant éléctrique représenté par un spectre de masse. Ces peptides sont ensuite identifiés à l'aide du logiciel Scaffold à partir de la base de données Uniprot.



Protéines candidates	Processus Biologique	Localisation
6 protéines non-caractérisées	NA	NA
Asparagine synthetase 2	Biosynthèse	Cytosole
histone-lysine N-methyltransferase, SUVH1	Régulateur de la chromatine	Noyau
1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coa synthase	Biosynthèse	Peroxysome
RPN9	Dégradation protéique	Peroxysome/ Cytosole/ Noyau
S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Biosynthèse	NA
Adenosine kinase	Biosynthèse	NA
trihelix transcription factor GTL1-like	Régulation expression	Noyau
Aspartokinase	Biosynthèse	NA
ABC transporter F family member 1-like	Transport protéique	MP
Aspartyl protease family protein 2-like	Biosynthèse	Paroi
Beta-adaptin-like protein	Transport protéique	Golgi
Papain-like cysteine proteinase 6	Dégradation protéique	Vacuole/Lysosome
Formate--tetrahydrofolate ligase	Biosynthèse	Cytosole
Peroxisomal membrane protein pex14	Transport protéique	Peroxysome
Ap-1 complex subunit gamma-2	Trasnport protéique	Golgi

Figure 52 : Identification des interactants candidats de Pv33.
La recherche d'interactants est effectuée parmi les 201 protéines identifiées par spectrométrie de masse. Une sélection basée sur les faux positifs obtenus chez d'autres effecteurs a permis de restreindre la liste à 102 protéines. Un second tri a permis d'identifier 23 protéines candidates qui sont présentées sous forme de tableau. La localisation et la fonction biologique ont été recensées à l'aide d'Uniprot. MP : membrane plasmique.

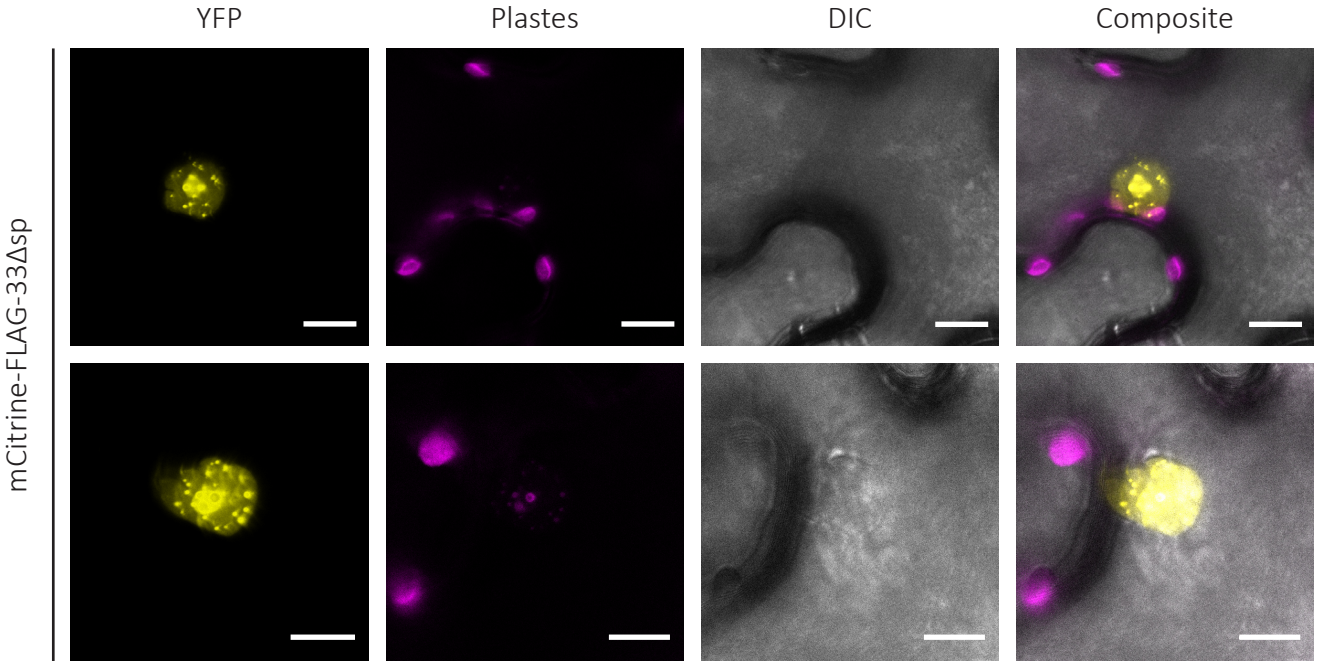


Figure 53 : Pv33 localise au nucléole et aux foyers nucléaires. Observation par microscopie confocale de feuilles agroinfiltrées avec une construction permettant l'expression transitoire de mCitrine:FLAG:47Δsp à 2 jpa. Pour chaque ligne, une image en fluorescence jaune (mCitrine :FLAG :47Δsp) ou rose (plastes), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. Barre d'échelle : 15 µm. Images obtenues par E. Evangelisti.

activité transcriptionnelle. Les histones se regroupent en nucléosomes, structures autour desquelles s'enroule l'ADN. La méthylation de leurs histidines ou de leurs lysines par l'ajout d'un à trois groupements méthyle modifie leur interaction avec l'ADN. En fonction des acides aminés modifiés, il peut y avoir déroulement ou ré-enroulement des brins d'ADN. SUVH1 ajoute des groupements méthyle spécifiquement sur l'histone 3 au niveau de la lysine 9 (H3K9), cette modification est associée à une conformation en hétérochromatine et à la répression génique **(Rea et al., 2000)**. Une étude récente montre que les SUVH1 peuvent également être impliquées dans la méthylation H3K4 favorisant cette fois ci l'expression génique **(Li et al., 2016)**.

Les candidats GTL1 et SUVH1 deviennent particulièrement intéressants à la lumière des observations plus fines de la localisation de Pv33 tagué avec le marqueur Citrine, dont le signal est 75% plus puissant que la GFP **(Day and Davidson, 2009).** La construction mCitrine-FLAG-33Δsp a permis de confirmer que le signal nucléaire est plus fort au niveau du nucléole et aussi d'observer un signal dans des foyers nucléaires **(Figure 53)**, des structures associées à des régions à haute activité transcriptionnelle. Cette localisation dans le noyau pourrait donc s'expliquer par l'interaction avec un facteur de transcription ou une enzyme régulatrice de la transcription.

Par ailleurs, lors des différentes observations microscopiques pour étudier la localisation cellulaire de Pv33 nous avons observé dans le cytoplasme des signaux punctiformes mobiles d'environ 1 µm qui suivent les déplacements du cytoplasme dans les espaces entre la vacuole et la membrane plasmique. Leur répartition est homogène dans le cytoplasme et leur déplacement est visible en temps réel. Une version statique de ces signaux peut être observée dans la **Figure 54.**

Étude du rôle de SUVH1 dans la mort cellulaire induite par Pv33 chez *N. benthamiana*

Pour valider l'implication de SUVH1 dans la mort cellulaire induite par Pv33 nous avons abordé la confirmation de l'interaction entre les deux protéines par Co-Immunoprecipitation (Co-IP) et l'étude de l'effet de l'absence de SUVH1 sur l'induction de la mort cellulaire. Ce projet est mené en collaboration avec l'équipe du Sainsbury Laboratory de Cambridge ; les expériences de Co-IP ont été prises en charge par l'équipe de Cambridge et nous avons réalisé les expériences de suppression de l'expression de SUVH1.

L'expression de SUVH1 a été éteinte grâce à la technique du VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). Le VIGS se base sur l'utilisation d'un vecteur viral dérivé du Tobacco Rattle Virus (TRV). Un segment court (100-300 nt) du gène ciblé est cloné dans le TRV et le clone résultant utilisé pour infecter la plante. Les ARNs double brin produits pendant l'infection virale déclencheront les systèmes de silencing qui cibleront le fragment cloné et par extension l'ARNm endogène du gène ciblé chez la plante **(Liu et al., 2002; Velásquez et al., 2009; Zhang and Liu, 2014)**.

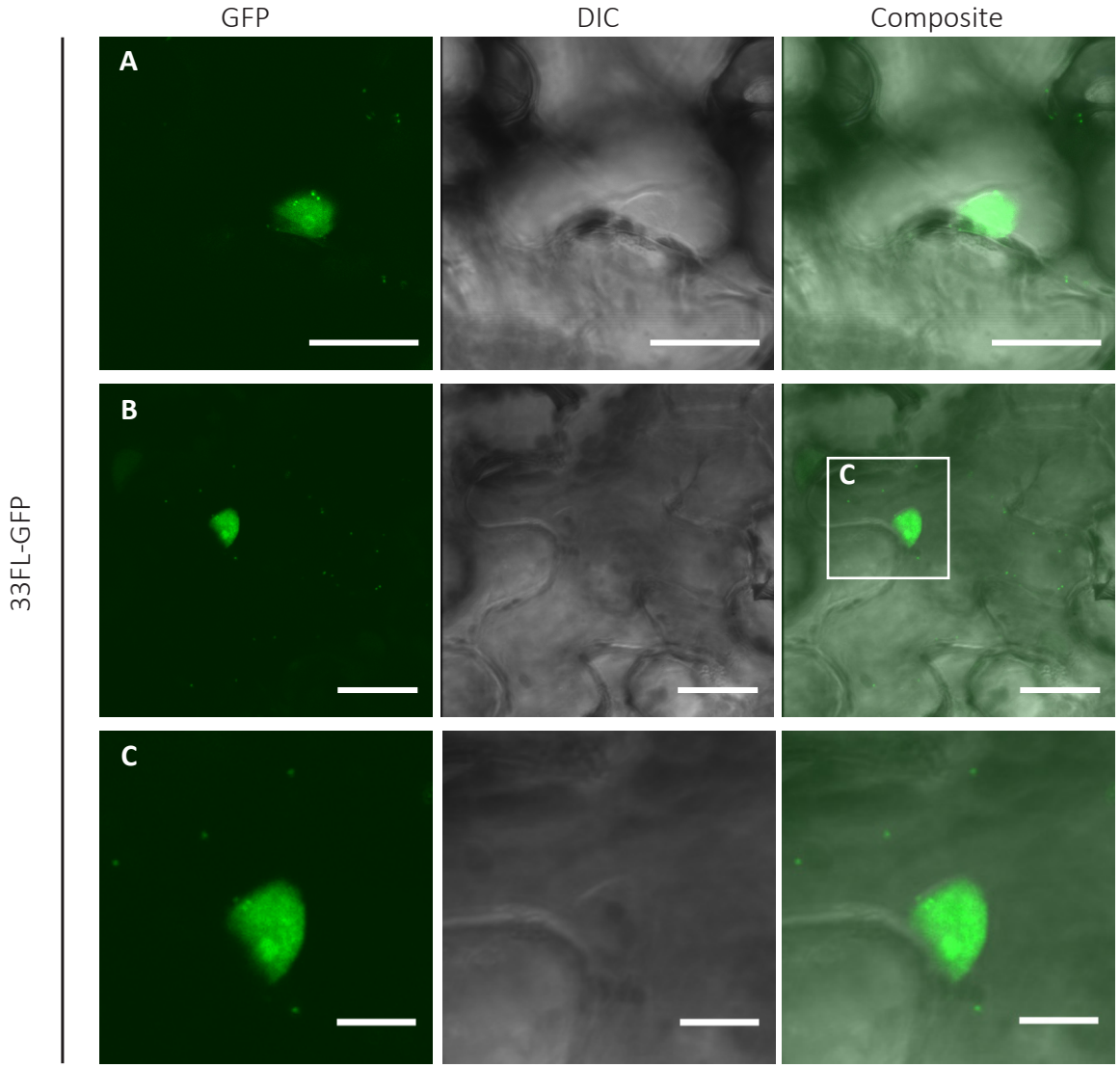


Figure 54 : Localisation de Pv33 avec son peptide de sécrétion dans *N. benthamiana.* (A à C) Observation par microscopie confocale de feuilles agroinfiltrées avec la constrcution 33FL-GFP à 2 jpa. **(C)** est un zoom des clichés de **(B)**. Pour chaque ligne, une image en fluorescence verte (33FL-GFP) ou rouge (plaste), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. Barres d'échelle : 10 µm (pour les clichés de **C**) et 24 µm (pour les clichés de **A et B**).

Le génome de *N. benthamiana* présente deux copies de SUVH1. Deux constructions ont été donc réalisées, siSUVH1_1 et siSUVH1_2, une spécifique pour un des gènes et l'autre ciblant les deux versions du gène. Des plantules de *N. benthamiana* ont été infectées avec les vecteurs viraux et trois semaines plus tard 33Δsp a été exprimé dans les tissus siSUVH1. Les résultats de ces expériences ont montré que la mort cellulaire était toujours présente **(Figure 55)**. L'absence de SUVH1 ne semble pas avoir un impact dans la mort cellulaire induite par Pv33. Cependant, pour pouvoir valider ces résultats il faudrait vérifier la suppression de l'expression de SUVH1 par qRT-PCR.

2.1.2 Impact d'un encombrement N-terminal de Pv33 sur la mort cellulaire

Différentes constructions de Pv33 ont été réalisées au cours de la thèse : avec ou sans son peptide de sécrétion, fusionnée à un peptide de sécrétion de plante, fusionnée aux marqueurs fluorescents GFP ou Citrine. L'apparition de mort cellulaire associée et la localisation cellulaire correspondant à ces constructions sont résumées dans la **Figure 56**. La présence de la GFP à l'extrémité C-terminal ne semble pas interférer avec l'apparition des symptômes. En revanche, il apparait que la mort cellulaire associée à Pv33 n'a pas lieu lorsque le gène est entier ou associé à la Citrine, et cela malgré la localisation au noyau de la version taguée avec la Citrine. L'encombrement au niveau N-terminal par un marqueur ou le signal de sécrétion semble donc avoir un effet sur l'induction de la mort cellulaire.

2.2 Discussion

Les résultats de la première section de ce chapitre ont été discutés dans le cadre de l'article soumis à publication. Ici, je discute les résultats présentés dans la deuxième section mais je reprends aussi la discussion d'une partie des résultats de l'article, le format limité de ce dernier n'a pas permis certains développements.

Pour rappel, la publication soumise présentait l'identification d'une famille de protéines sécrétées de *P. viticola* portant le domaine WY C-terminal caractéristique des effecteurs RXLR mais auxquelles manquait ce dernier motif en N-terminal. Parmi ces séquences, Pv33 a été étudié plus en détail. L'expression de Pv33 sur Nicotianeae ou vigne induit des nécroses. Ces nécroses associées sont dépendantes de SGT1 mais pas de EDS1. Une localisation nucléaire de Pv33 est requise pour l'induction de la mort cellulaire. Au vu de l'éloignement phylogénétique des plantes qui répondent à Pv33, il est vraisemblable que ces nécroses ne dépendent pas d'une reconnaissance directe de Pv33 dans la cellule végétale.

Un effecteur RXLR au profil similaire a récemment été décrit chez *P. parasitica* ; son expression induit des nécroses dépendantes de SGT1 chez un large éventail de plantes hôtes comme

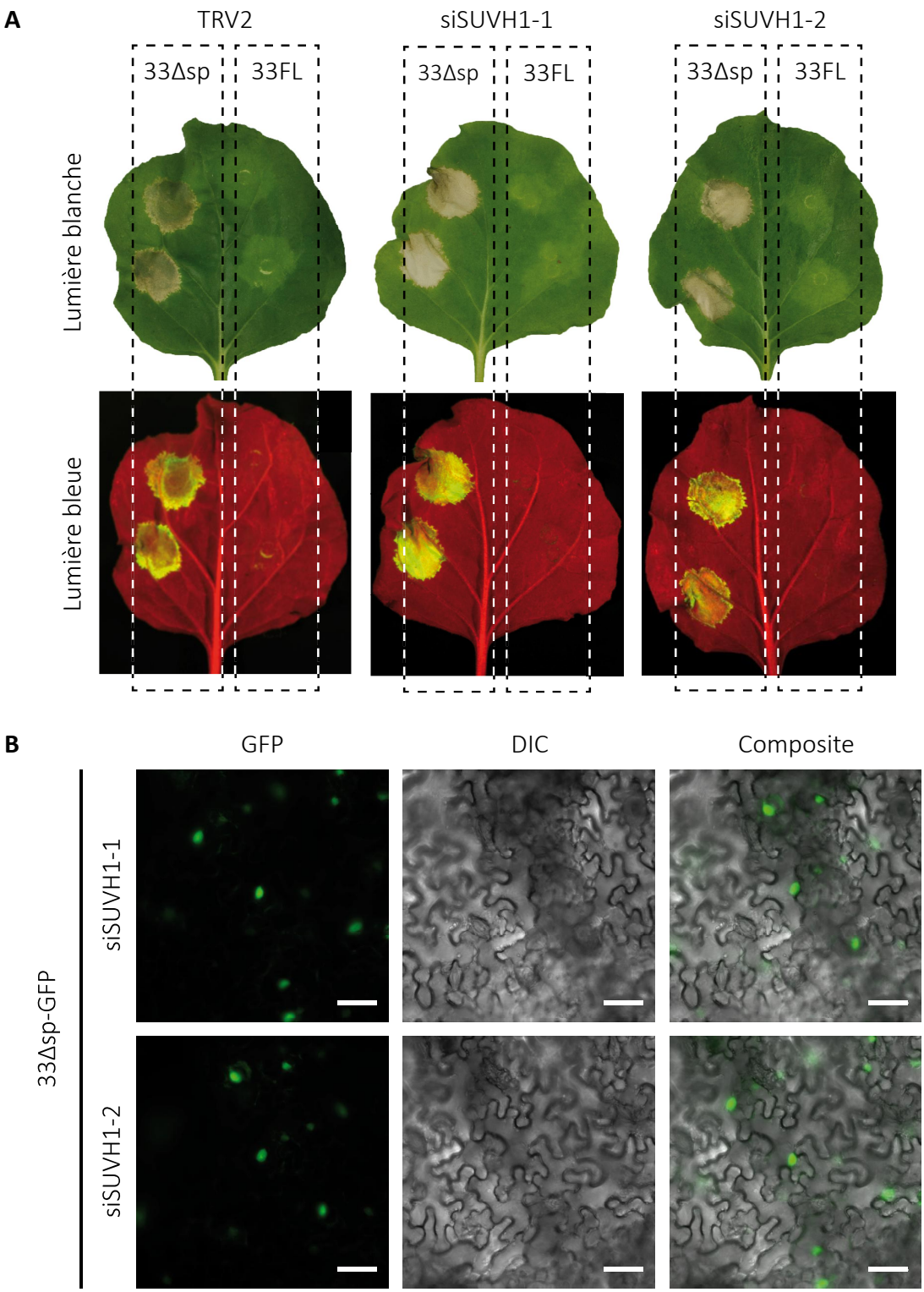


Figure 55 : L'inhibition de l'expression de *SUVH1* n'empêche pas la mort cellulaire liée à Pv33 ni sa localisation nucléaire. (A) Image représentative de la mort cellulaire observée sur des feuilles de *N. benthamiana* silencées par TRV. siSUVH1-1 et siSUVH1-2 sont deux constructions différentes qui ciblent SUVH1. TRV2 est le contrôle avec un vecteur vide. Les photographies sont réalisées 5 jours après infiltration d'*A. tumefaciens* porteuses de la construction pour l'expression constitutive de *Pv33* sans son peptide signal (33Δsp) et avec (33FL). Les photographies sont prises face supérieure à la lumière blanche et face inferieure en lumiere bleue. L'expériementation a été réalisée sur trois lots différents (N=12) **(B)** Observation par microscopie à épifluorescence de feuilles silencées pour SUVH1 agroinfiltrées avec la construction 33Δsp-GFP à 2 jpa. Pour chaque ligne, une image en fluorescence verte (33Δsp-GFP), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. Barre d'échelle : 50 µm.

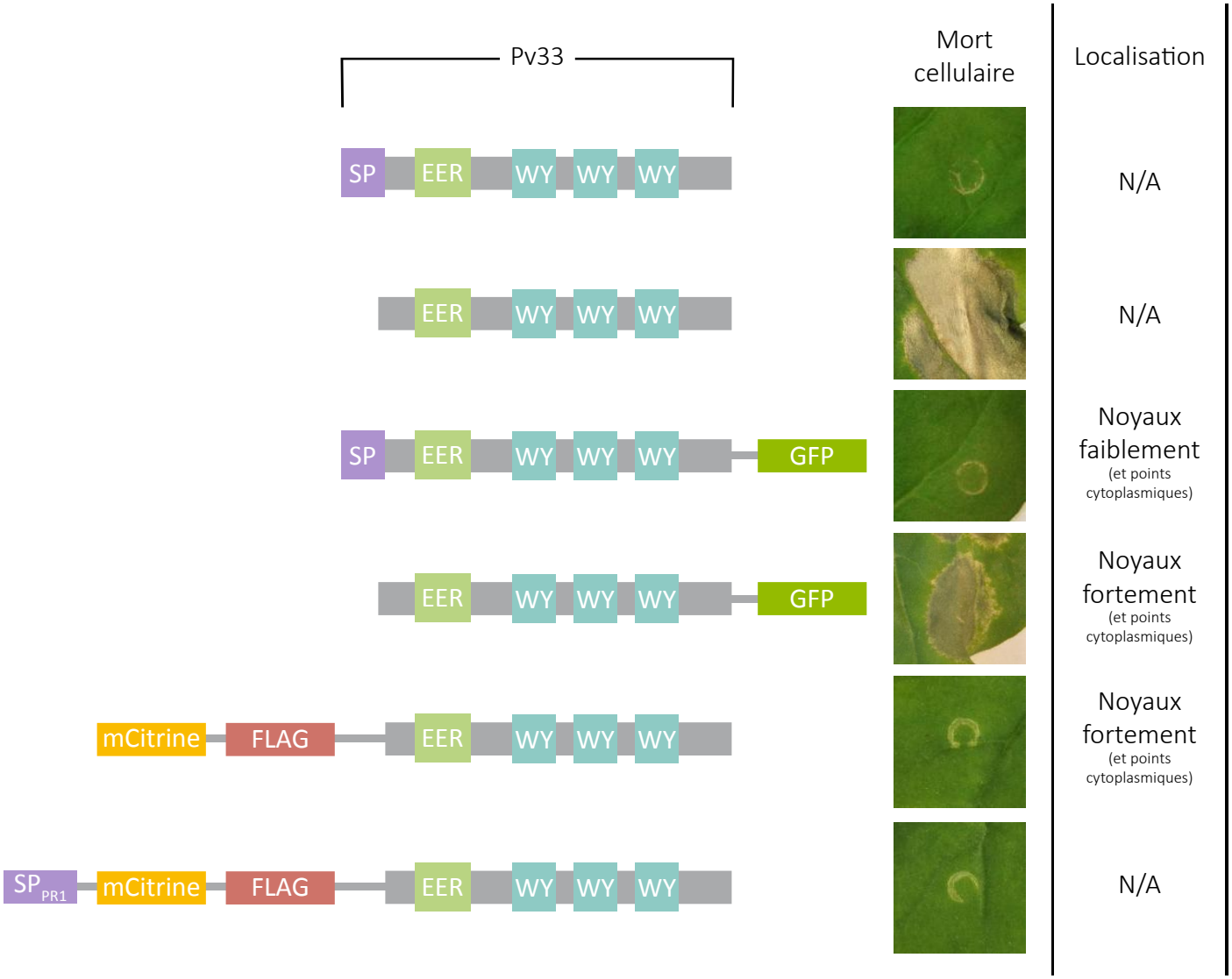


Figure 56 : Localisation cellulaire et symptômes des différentes constructions de Pv33 sur *N. benthamiana*. Image représentative de la mort cellulaire observée sur des feuilles de *N. benthamiana* qui expriment les différentes constructions de Pv33. Les photographies sont réalisées 5 jours après infiltration d'*A. tumefaciens* porteuse des constructions de Pv33 : 33FL, 33Δsp, 33FL-GFP, 33Δsp-GFP, mCitrine-FLAG-33Δsp, SP_{PR1}-mCitrine-FLAG-33Δsp (dans l'ordre).

des Solanaceae et *A. thaliana* **(Huang et al., 2018)**. Ce sont des cas encore rarement décrits, mais ces données montrent que des effecteurs de pathogènes peuvent cibler des processus essentiels et universels au règne végétal.

Pv33 localisé au noyau, au nucléole et sur des foyers nucléaires

Pv33 fusionné à des protéines fluorescentes est observé dans le noyau, avec des marques visibles sur le nucléole et des foyers nucléaires. Ce n'est pas la première fois qu'un effecteur est détecté dans les noyaux de la cellule hôte. Cette situation a été décrite dans un large nombre d'agents pathogènes : bactéries **(Choi et al., 2017)**, oomycètes **(Caillaud et al., 2012; Boevink et al., 2016; Wang et al., 2018b)**, nématodes **(Jaouannet et al., 2012; Hewezi et al., 2015)** et champignons **(Robin et al., 2018)**. Chez les oomycètes, une famille entière d'effecteurs est concernée par cette localisation ; ce sont les CRN **(Schornack et al., 2010)** et leur présence est quasi-systématiquement liée au déclenchement de la mort cellulaire.

De nombreux processus nucléaires sont liés à l'immunité végétale et composent alors des cibles pour les effecteurs de phytopathogènes. Parmi ces mécanismes se trouvent le transport nucléaire, les différents types de contrôle de la transcription, la méthylation et l'acétylation des histones, le contrôle des étapes post-transcriptionnelles **(Motion et al., 2015)**. Par exemple, les effecteurs d'*A. tumefaciens* VirD2 et VirE2 interagissent avec le transport nucléaire pour permettre l'import de l'ADN-t bactérien. D'autres effecteurs bactériens sont suspectés d'être capables d'induire directement des cassures dans l'ADN de la plante hôte **(Song and Bent, 2014)**. Des effecteurs de différents types de pathogènes sont capables de se lier à l'ADN et de participer à la reprogrammation de l'expression génique **(Song et al., 2015; Ahmed et al., 2018)**. Parmi les plus connus figurent les effecteurs bactériens activateurs de la transcription (TAL) qui agissent comme des facteurs de transcription **(Mukaihara et al., 2010)**, dont un exemple est l'effecteur bactérien de *X. campestris* AvrBs3 **(Kay et al., 2007)**. L'effecteur de *P. infestans* Pi03192 cible deux facteurs de transcription, NTP1 et NTP2, et empêche leur déplacement vers le noyau **(McLellan et al., 2013)**. Ce ne sont que quelques exemples, mais ils démontrent l'importance et les multiples formes des perturbations de l'activité nucléaire dans la virulence des agents pathogènes.

Pv33 est rassemblé en foyers dans le noyau, ce qui laisse présager une liaison de l'effecteur à une protéine ou un complexe protéique plutôt qu'une fixation directement sur l'ADN, une idée appuyée par l'absence de domaine de liaison à l'ADN sur la séquence de Pv33. Parmi ces foyers, le plus reconnaissable est le nucléole. C'est un sous-compartiment du noyau où la chromatine est condensée en hétérochromatine mais où l'activité transcriptomique est active. Le nucléole est reconnu comme étant le lieu de synthèse des ARN ribosomiques et la biogénèse de ribosomes, mais il a également été décrit comme intervenant entre autres dans la régulation du développement végétal, de la réponse

aux stress biotiques et abiotiques, et de l'activité des télomèrases **(Kalinina et al., 2018)**. Le nucléole constitue une cible dans les stratégies d'infection de différents pathogènes. Le cas le mieux caractérisé est celui des virus qui sont capables de recruter des protéines du nucléole pour accomplir leur réplication **(Hiscox, 2007)**. Des effecteurs fongiques, bactériens, d'oomycètes et de nématodes à kyste ont été montrés comme localisant dans le nucléole et perturbant la mise en place des défenses **(Jones et al., 2009; Dean et al., 2010; Caillaud et al., 2013; Boevink et al., 2016; Ahmed et al., 2018; Bierne and Cossart, 2012)**, mais les mécanismes sont en général mal compris et méritent d'être étudiés plus en profondeur. L'effecteur RXLR HaRxL44 de *H. arabidopsidis* a une localisation au nucléole et dans des foyers nucléaires qui rappelle beaucoup celle de Pv33. Il interagit avec une sous-unité de *Mediator*, un complexe protéique qui permet la liaison entre les régulateurs de la transcription et l'ARN polymérase II. HaRxL44 conduit à la dégradation de la sous-unité MED19a, ce qui amène une perturbation de l'équilibre des hormones impliquées dans la défense et diminue la résistance de *A. thaliana* à l'oomycète **(Caillaud et al., 2013)**. Le fait que HaRxL44 et Pv33 présentent un même profil dans leurs localisations nucléaires laisse penser que Pv33 cible des sites précis de l'expression génique.

Le mode de transport de Pv33 au noyau reste inconnu

Le transport au noyau se fait *via* les pores nucléaires, c'est un transport passif pour les ions, les acides aminés et les protéines de petit poids moléculaire. Pour les molécules de poids moléculaire supérieur à 44 kDa, l'importation au noyau nécessite chez les eucaryotes la reconnaissance d'un motif NLS (Nuclear Localization Signal) au sein de la séquence protéique **(Kuersten et al., 2001; Pierre et al., 2014)**. Ce signal est reconnu par liaison à l'importine-α qui s'associe ensuite à l'importine-β et permet l'import dans le noyau. Cependant elle ne semble pas être l'unique mode d'accès au noyau. Il a été montré que chez la levure 40% des protéines qui sont transportées au noyau ne possèdent pas de NLS **(Lange et al., 2007)**. Pv33 sans son peptide signal a un poids moléculaire de 47 KDa, qui monte à 74 KDa dans la version taguée avec la GFP, mais aucune NLS connue n'a été détectée dans la séquence de Pv33. Il est donc possible que son import au noyau soit indépendant de l'importine-α. Il est également imaginable que Pv33 se lie à une protéine qui possède une NLS. Pour vérifier l'implication du système d'importation traditionnelle, il serait possible d'utiliser l'approche mise en place pour étudier l'importation nucléaire de Nuk6, Nuk7 et Nuk12. Ce sont trois effecteurs de *P. infestans* qui ont été exprimés transitoirement sur des feuilles de *N. benthamiana* dont la production de deux importines a été stoppée préalablement par VIGS. Deux des trois effecteurs ont vu leur importation diminuée démontrant l'utilisation du système d'import nucléaire végétal par des effecteurs d'oomycète **(Kanneganti et al., 2007).** De surcroit, l'import d'un de ces effecteurs est donc indépendant des importines. Par ailleurs, un deuxième type de signal de localisation nucléaire récemment décrite chez

l'oomycète *P. sojae* **(Fang et al., 2017)** pourrait être responsable du transport de Pv33 au noyau, mais le motif ne semble pas être présent dans sa séquence.

Une deuxième localisation possible pour Pv33 ?

La localisation principale de Pv33 est le noyau. Cependant, des points mobiles de petite taille sont visibles lorsque Pv33 est exprimé marquée par la GFP. La taille des signaux de fluorescence de Pv33 et leur nombre pourrait s'identifier avec plusieurs organites : les peroxysomes, les lysosomes, les mitochondries, des petites vésicules, l'appareil de Golgi. L'importante mobilité des points et leur vitesse de déplacement laissent supposer leur suspension dans le cytoplasme plutôt qu'un rattachement à un structure stable comme c'est le cas pour les vésicules du système sécrétoire, qui elles s'accrochent sur le cytosquelette d'actine. S'agit-il d'un signal artefactuel ? Ou une seconde localisation révélatrice de la fonction de Pv33 ? Ce n'est pas la première fois qu'un effecteur possède une double localisation dont une nucléaire et l'autre dans un petit compartiment du cytosol. Ceci a été décrit pour l'effecteur PST02549 du champignon de la rouille du blé. Son marquage révèle une accumulation dans le noyau et les corps-P (P-bodies) **(Petre et al., 2016)**, des complexes protéiques cytoplasmiques qui sont impliqués dans la dégradation des ARNm. Un effecteur de *P.infestans* rappelle également Pv33 par sa double localisation simultanée. Pi16663, appelé aussi Avr1, est retrouvé dans le noyau et dans de petits points mobiles identifiés comme des péroxysomes **(Wang et al., 2018b).**

Le profil du peroxysome concorde avec ces signaux punctiformes : petits, ronds, avec des tailles qui varient entre <0.5 à 2 µm **(Muench and Mullen, 2003; Nelson et al., 2007)**. Les observations de peroxysome marqué décrites dans différentes études rappellent énormément les signaux obtenus avec Pv33. Il faut savoir également que parmi les interactants candidats spécifiques de Pv33 identifiés par immunoprécipitation figure PEX14, une protéine présente sur la membrane du peroxysome qui participe à sa machinerie d'import.

Les peroxysomes hébergent de nombreux processus métaboliques qui contribuent à l'immunité des plantes, comme la biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) ou la production de ROS **(Kaur et al., 2009)**. Chez *A. thaliana,* il a été montré que c'est le lieu de l'activation des enzymes de biosynthèse des indole-glucosinolates, qui limitent la croissance de nombreux champignons pathogènes **(Hiruma et al., 2010)**. Il semble donc logique de retrouver des effecteurs qui ciblent ce compartiment. Par exemple, trois effecteurs du champignon *Colletotrichum higginsianum* exprimés dans la phase biotrophe ciblent les peroxysomes lorsqu'ils sont exprimés marqués avec une protéine fluoescente chez *N. benthamiana* **(Robin et al., 2018)**. Cependant pour pénétrer dans le peroxysome il est nécessaire d'être pourvu d'un signal d'adressage, dont les mieux caractérisées sont PTS1 et PTS2 (de l'anglais Peroxysomal Targeting Signal) **(Glover et al., 1994; Neuberger et al., 2003a, 2003b)**. Pv33 ne présente pas ce type de signal. Cependant, cette information ne semble pas être rédhibitoire, car

un des deux effecteurs de *C. higginsinianum* cités ci-dessus n'en possède pas non plus. Comme pour la localisation au noyau, il existe la possibilité que des effecteurs puissent pénétrer dans le peroxysome en s'associant à des protéines végétales qui possèdent les signaux.

Pour confirmer ou infirmer une identité peroxysomale des points observés avec Pv33 marqué à la GFP, il serait nécessaire de co-exprimer 33Δsp-GFP avec une protéine fluorescente auquel le signal d'adressage Ser-Lys-Leu aurait été ajouté en C-terminal de façon à marquer le peroxysome **(Reumann, 2004; Wang et al., 2018b; Nelson et al., 2007)**. Le cas échéant, la vérification par une approche similaire devra être élargie à d'autres compartiments subcellulaires de taille proche.

Des protéines nucléaires comme interactants candidats de Pv33

Pour mieux comprendre la fonction de Pv33, ses cibles ont été recherchées par immunoprécipitation. Une fois des interactants spécifiques identifiés, il est nécessaire de confirmer les interactions par Co-IP. Deux interactants candidats ont été choisis en priorité pour cette validation, le facteur de transcription GTL1 et l'histone méthyle-transferase SUVH1. Même si les interactions restent à valider, le rôle éventuel de ces protéines dans les interactions plante-agent pathogène est discuté ci-dessous.

GTL1 est un facteur de transcription de type Trihelix. Une publication récente montre que GTL1 participe au mécanisme de résistance contre *P.* syringae chez Arabidopsis *,* en particulier à la régulation du SA au niveau de son métabolisme et de son transport **(Völz et al., 2018)**. Le SA est une hormone décrite comme impliqué dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes et il est fréquemment utilisé comme marqueur de l'activation des défenses **(Gauthier et al., 2014)**. Chez la vigne, quelques heures après inoculation de *P. viticola* le niveau de SA ainsi que l'expression de gènes de défense associée augmente **(Guerreiro et al., 2016)**. Considérant ces informations, le métabolisme du SA semble une bonne cible pour un effecteur de *P. viticola*. Ces données laissent penser que GTL1 est impliqué dans certaines voies de défense.

L'histone méthyle-transférase SUVH1 a été le premier interactant candidat nucléaire de Pv33 investigué pendant la thèse en raison de l'originalité de l'éventuelle interaction. Des effecteurs bactériens **(Ma et al., 2011)**, d'oomycètes **(Kong et al., 2017; Li et al., 2018a)** ou de nématodes **(Vijayapalani et al., 2018)** ont déjà été montrés capables de perturber l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN **(Motion et al., 2015)**. Ces deux modifications, comme la méthylation des histones, perturbent la condensation de l'ADN et par ce fait l'expression génique. Cependant aucun effecteur n'a, à l'heure actuelle, été décrit comme capable de perturber la méthylation des histones. Il est pourtant raisonnable de penser que ce processus universel puisse être ciblé par les effecteurs. L'unique cas décrit est chez l'agent pathogène bactérien des mammifères *Chlamydia trachomatis,* dont

un effecteur mime les histone-méthyltranfèrases en méthylant les histones H2B, H3 et H4 **(Pennini et al., 2010).**

Le remodelage de la chromatine modifie l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs. Ce phénomène fait aussi partie des mécanismes de régulation de l'épigénétique qui permettent la transmission de caractères à la descendance sans modification de la séquence nucléotidique. **(Zilberman, 2008)**. La méthylation d'une histone active ou inhibe l'expression génique en fonction de la position du groupement méthyle : sur les lysines 9 et 27, la méthylation est répressive, sur les lysines 4 et 36 elle est activatrice. L'effet varie également si un, deux ou trois groupements méthyles sont ajoutés. Le remodelage de la chromatine est un des moyens de réguler la transcription des gènes qui a été montré comme impliqué dans les défenses végétales. Nombreux sont les articles qui décrivent l'importance de la méthylation des histones dans la résistance des plantes et l'expression de gènes comme des récepteurs de type NBS-LRR, les facteurs de transcription WRKY ou la signalisation hormonale **(Alvarez-Venegas et al., 2006; Bourque et al., 2011; Ding and Wang, 2015; Ding et al., 2012; Motion et al., 2015; Ramirez-Prado et al., 2018).** Par exemple, il a été montré que des histone-méthyletransférases d'*A. thaliana* régulent l'immunité impliquée dans la PTI, ETI et la SAR **(Lee et al., 2016)**.

Concernant SUVH1, cette enzyme est connue pour méthyler H3K9. Il s'agit une méthylation répressive associée principalement à l'hétérochromatine constitutive, située au niveau des télomères, du centromère et aussi associée à des transposons **(Jackson et al., 2004)**. La fusion traductionnelle au gène marqueur GFP permet de localiser SUVH1 en foyers d'hétérochromatine dans les noyaux d'*A.thaliana* **(Naumann et al., 2005)**, une disposition qui n'est pas sans rappeler les observations de Pv33 marqué. Quelques liens ont été montrés entre SUVH1 et l'immunité végétale **(Soppe et al., 2002; Du et al., 2015a).** En accord avec cette hypothèse, la déméthylase JMJ27, capable d'enlever les groupements méthyles sur H3K9 ajoutés par SUVH1, a été décrite comme un intervenant positif dans l'immunité végétale : son absence augmente la sensibilité d'*A. thaliana* à *P. syringae* DC3000 et compromet l'expression de gènes PR **(Dutta et al., 2017)**.

Les résultats des expériences de gene-silencing de SUVH1 chez *N. benthamiana* montrent que la mort cellulaire induite par Pv33 n'est pas dépendante de la présence de SUVH1, suggérant que ce n'est pas cette interaction qui est à l'origine de la nécrose. Si les résultats de Co-IP confirment l'interaction, cela supposera que Pv33 modifie potentiellement d'autres voies nucléaires qui maintiennent le déclenchement de la mort cellulaire. Alternativement, la redondance fonctionnelle entre méthyl-transférases pourrait faire que Pv33 trouve une autre cible en absence de SUVH1. Finalement, il faut tenir compte que la suppression de l'expression de SUVH1 dans ces expériences reste à valider.

Il serait intéressant de vérifier l'implication de SUVH1 dans l'interaction entre la vigne et *P. viticola*. Il est aujourd'hui possible de bloquer l'expression de SUVH1 chez la vigne à partir de la technologie CRISPR/Cas9 **(Nakajima et al., 2017)**, mais cette approche est difficile à mettre en place et, en autre, éteindre SUVH1 chez la vigne peut être lourd de conséquences pour le développement végétal. Il serait cependant possible de transposer ce test sur des modèles végétaux plus faciles à transformer comme *N. benthamiana* ou *A. thaliana*, et de faire en sorte que cette suppression soit inductible.

La sécrétion de Pv33 par les cellules végétales

Pv33 induit la mort cellulaire seulement quand il est exprimé sans son peptide signal, suggérant que la sécrétion de la protéine hors de la cellule empêche l'induction de la mort cellulaire. La prise en charge du peptide de sécrétion de Pv33 par les tissus végétaux a été vérifiée grâce à l'utilisation de la Bréfeldin A (BFA). La BFA est une molécule produite par le champignon *Penicillium brefeldianum* capable de bloquer la formation de vésicules à l'appareil de Golgi. Les voies de recyclage de matériel dépendant des vésicules de type COPI entre les RE et les saccules cis/médianes du Golgi sont ainsi inhibées. Par ce blocage, les faces trans du Golgi s'accumulent et deviennent visibles par microscopie sous la forme de *BFA Body* **(Lippincott-Schwartz et al., 1989)**. Ces BFA body caractéristiques sont observés après expression et traitement de tissus foliaires de *N. benthamiana* qui expriment transitoirement la GFP fusionnée avec le peptide de sécrétion de Pv33 **(Figure 4, article soumis)**. Si la prise en charge du peptide de sécrétion de Pv33 a été vérifiée, ceci n'est pas le cas pour la sécrétion de Pv33 entier. Une approche pour confirmer la sécrétion de Pv33 consiste à rechercher la présence des constructions protéiques dans l'apoplasme de *N.benthamiana*. Les fluides apoplastiques sont extraits à l'aide d'une solution saline et de la pression exercée par centrifugation et les protéines détectées par Western-blot **(O'Leary et al., 2014)**.

Il n'est pas nouveau de voir des protéines d'agent phytopathogènes emprunter les voies de sécrétion de cellules végétales suite une expression hétérologue. Ce phénomène a été observé pour certains effecteurs RXLR, comme par exemple le cas de Pi04314. Sa sécrétion dans l'apoplasme est observée grâce à un marquage mRFP après expression transitoire chez *N. benthamiana* **(Wang et al., 2017b, 2018b)**. Un autre exemple récent est BxSAPB1, un effecteur d'un nématode phytopathogène qui induit des nécroses lorsqu'il est présent dans l'apoplasme suite à son expression transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana* **(Hu et al., 2018)**. Ceci dit, il n'était pas certain que la prise en charge du peptide signal de Pv33 soit possible. En effet, certains exemples suggèrent que la sécrétion d'effecteurs cytoplasmiques serait différente de celle d'effecteurs apoplastiques et qu'elle ne suivrait pas une voie RE-Golgi conventionnelle **(Petre and Kamoun, 2014; Wang et al., 2017b).**

Comment un effecteur sans motif RXLR est-il internalisé dans les cellules hôte ?

Pv33 présente le domaine WY et le motif dEER caractéristique des effecteurs de type RXLR, mais il lui manque le motif RXLR en N-terminal. Ce motif a été montré comme étant déterminant pour la translocation des effecteurs de cette famille dans les cellules hôtes **(Whisson et al., 2007)**. Chez la seconde famille d'effecteurs intracellulaires, les CRNs, leur translocation nécessite le motif LXLFLAK dans le domaine N-terminal **(Schornack et al., 2010)**. L'absence de motif conservé dans le domaine N-terminal de Pv33 et les autres séquences obtenues chez *P. viticola* permet de s'interroger sur leur translocation dans les cellules hôtes. Il n'est pas à exclure que ces protéines puissent être sécrétées dans la matrice extra-haustoriale et y demeurer, comme c'est le cas pour les effecteurs apoplastiques, tels les inhibiteurs de protéases et de glucanases.

Pv33 induit une nécrose des cellules dépendante de la localisation nucléaire de l'effecteur. Cette observation laisse supposer que Pv33 est bien transloqué à l'intérieur des cellules végétales au cours de l'infection. Cependant, arriver à connaitre si cette internalisation a vraiment lieu et si elle est dépendante ou non de l'agent pathogène apparait une tâche difficile à aborder.

En effet, les mécanismes qui régissent d'internalisation des effecteurs RXLR est un sujet d'actualité chez les oomycètes. Au début, plusieurs études ont montré que la translocation des effecteurs RXLR dans la cellule végétale peut avoir lieu indépendamment de la présence de l'agent pathogène **(Catanzariti et al., 2006; Dou et al., 2008; Kale et al., 2010)**, mais les approches d'internalisation et re-internalisation utilisées ont fait l'objet de controverse au sein de la communauté **(Petre and Kamoun, 2014)**. Récemment, de nouvelles publications indiquent que la translocation serait plutôt dépendante de la présence de l'agent pathogène. Une première montre qu'il faut prendre en compte un clivage du motif RXLR et une modification du domaine N-terminal résultant, ayant lieu à l'intérieur de l'agent pathogène, pour permettre l'entrée de l'effecteur dans la cellule végétale **(Wawra et al., 2017)**. Une seconde publication montre que l'effecteur RXLR Pi04314 de *P. infestans,* après avoir été exprimé avec son peptide signal chez *N. benthamiana* et sécrété dans l'apoplasme, n'est pas capable de rentrer dans la cellule végétale même en présence de *P. infestans*. La translocation de Pi04314 dans les cellules végétales est seulement observée quand il est sécrété par l'oomycète lui-même *via* les haustoria **(Wang et al., 2017b)**. D'après ces résultats, il semblerait que des modifications post-traductionnelles avant internalisation soient nécessaires.

La production hétérologue de Pv33 marqué par la RFP et sa purification serait d'une grande aide pour répondre à la question de son internalisation dans les cellules de la plante. Le clonage du gène et la transformation de la levure *P. pastoris* sont en cours. Pv33 pourra ainsi être directement infiltré dans l'apoplasme des tissus foliaires à l'aide d'une seringue et sa localisation nucléaire ensuite recherchée par microscopie. La présence ou absence de signal nucléaire répondra à la question de

l'import dépendant ou non de l'agent pathogène. Pv33 est un effecteur intéressant pour réaliser ce test, car sa localisation concentrée dans l'espace nucléaire devrait être facilement détectable même en faible quantité. De plus, ces expérimentations peuvent se réaliser à la fois sur vigne et sur *N. benthamiana*. Finalement, il est envisageable d'inoculer un oomycète pathogène sur ces tissus infiltrés et ainsi évaluer l'éventuelle importance de la présence d'haustoria et de membrane différentiée EHM pour l'internalisation. Cette approche est cependant limitée physiquement car il faut une rencontre assez fréquente des protagonistes dans les tissus pour qu'une importation ait lieu.

Dans le cas d'une internalisation dépendante de l'agent pathogène, nous nous heurtons à l'impossibilité de transformer *P. viticola.* Il n'est donc pas envisageable de suivre la sécrétion et l'internalisation de Pv33 marqué comme ça a été le cas pour les effecteurs RXLR PSE2 et PpE4 de *P. parasitica* et Pi04314 de *P. infestans* **(Evangelisti, 2013; Huang et al., 2018; Wang et al., 2017b).** L'idée de faire exprimer Pv33 marqué par un oomycète proche phylogénétiquement peut être également une possibilité dans l'espoir où les processus de sécrétion soient conservés.

2.3 Conclusion

Dans ce chapitre j'ai décrit une famille de protéines sécrétées de *P. viticola* qui présentent les motifs dEER et domaines WY caractéristiques des effecteurs de type RXLR, mais qui n'ont pas le motif donnant son nom à la famille. Ces caractéristiques nous font considérer cette famille de protéines comme des effecteurs candidats. L'un d'entre eux, nommé Pv33, induit une mort cellulaire chez la plante qui est dépendante de sa localisation dans le noyau des cellules végétales. Ces résultats suggèrent que ce type d'effecteurs candidats doit être pris en compte lors de la caractérisation du complément d'effecteurs des oomycètes phytopathogènes.

Pv33 est principalement localisé dans le noyau, associé au nucléole et à des foyers nucléaires, et deux interactants candidats sont potentiellement impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Ces observations suggèrent que la fonction de Pv33 serait de modifier le transcriptome de la plante. Une fois validés les interactants nucléaires, il y a deux possibilités pour identifier les cibles génétiques potentielles de Pv33. La première est d'observer les variations au niveau du transcriptome entier de plante qui exprime l'effecteur, par exemple par puces à ADN ou RNA-Seq. La seconde serait d'essayer d'identifier les cibles génétiques. Cette approche est basée sur l'immuno-précipitation de la chromatine couplée au séquençage (Chip-seq). Les complexes d'interactants protéiques et nucléiques de Pv33 sont stabilisés (C*ross-link)*, immunoprécipités et l'ADN obtenu est séquencé.

Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la protéine Pv47, appartenant à la famille WY-*domain* de *P. viticola*

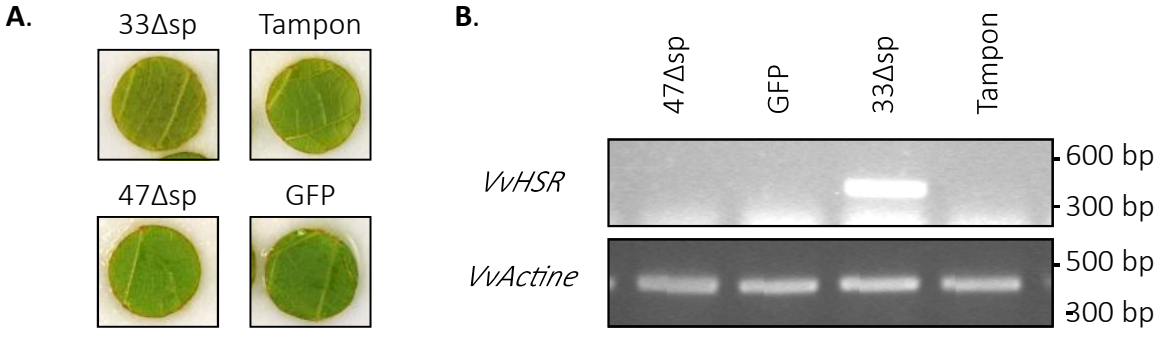


Figure 57 : Expression de l'effecteur candidat Pv47 sur *V. vinifera* cv. Syrah. Agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de l'effecteur candidat Pv47, sans son peptide signal (47Δsp), dans des disques de feuille de *V. vinifera* cv. Syrah. L'expression transitoire de 33Δsp sans son peptide signal (33Δsp) est utilisée comme contrôle positif, la GFP et l'infiltration du tampon comme contrôle négatif. **(A)** Résultat macroscopique. Les photographies ont été réalisées 6 jours après agroinfiltration. **(B)** RT-PCR semi-quantitative qui montre l'expression de *VvHSR* et de *VvActine*, utilisée comme référence. Chaque souche d'*Agrobacterium* porteuse de la construction testée est agroinfiltrée sur 4 disques qui sont regroupés pour l'extraction d'ARN. L'expérience a été répétée 3 fois sur des lots de plantes différents.

Au cours de l'analyse des effecteurs de *P. viticola*, j'ai identifié 68 gènes qui présentent une forte similitude avec des effecteurs RXLR malgré l'absence de ce motif conservé et se caractérisent par la présence de motifs WY. L'un d'entre eux, *Pv33*, induit des réponses immunitaires chez les plantes. C'est pourquoi nous présumons un rôle d'effecteur pour cette famille de protéines. Outre *Pv33,* un second gène, qui apparait dans la publication du Chapitre 3 **(Figure 2)** sous le code s0324g36070 et que nous avons nommé *Pv47*, a été caractérisé. *Pv47* se retrouve dans le même clade phylogénétique que *Pv82* et *Pv18*, deux gènes clonés dans un vecteur d'expression et dont l'expression chez *N. benthamiana* et la vigne à l'aide de *A. tumefaciens* n'entraîne aucun symptôme macroscopique. Le gène *Pv47* s'exprime fortement chez les spores germées de *P. viticola* et moyennement au cours de l'infection sur vigne, avec une expression plus forte à 72 hpi que à 48 hpi. Ce chapitre décrit les travaux d'analyse fonctionnelle de Pv47.

1. Résultats

1.1 Pv47 induit des réactions de défense chez les Nicotianeae.

Pour évaluer la capacité de Pv47 à induire des réponses immunitaires chez les plantes, j'ai suivi la même stratégie que pour l'étude des gènes *Pv33* et *Pv44*.

Expression transitoire de Pv47 chez la vigne

L'induction de défense en réponse à la présence de Pv47 chez la vigne a été vérifiée. Pour ce faire, l'effecteur Pv47 sans son peptide signal (47Δsp) a été cloné et exprimé chez la plante hôte *V. vinifera* cv. Syrah **(Figure 57)**. Ces tests ont été réalisés en parallèle avec des disques transformés transitoirement par 33Δs*p*, GFP et infiltrés avec le tampon de resuspension des bactéries. 33Δsp déclenche une mort cellulaire sur 20 à 60 % des disques et a donc été utilisé comme témoin positif. À l'inverse, aucune nécrose n'a été observée sur les huit disques exprimant 47Δsp **(Figure 57, A)**. L'accumulation de l'ARN de *VvHSR*, gène marqueur de la HR, a également été suivie par RT-PCR. Contrairement à 33Δsp, aucun signal n'est détecté suite à l'expression de 47Δsp **(Figure 57, B)**. Ces résultats montrent que 47Δsp n'induit pas de mort cellulaire chez la vigne dans un contexte où la transformation transitoire est de faible efficacité.

Expression transitoire de Pv47chez le tabac

L'induction de défense en présence de Pv47 a été vérifiée chez d'autres modèles que la vigne, plus faciles à transformer transitoirement. Des variantes de Pv47 avec (47FL) ou sans (47Δsp) le peptide de sécrétion ont été exprimées sur trois espèces de *Nicotiana* : *N. benthamiana*, *N occidentalis* et deux

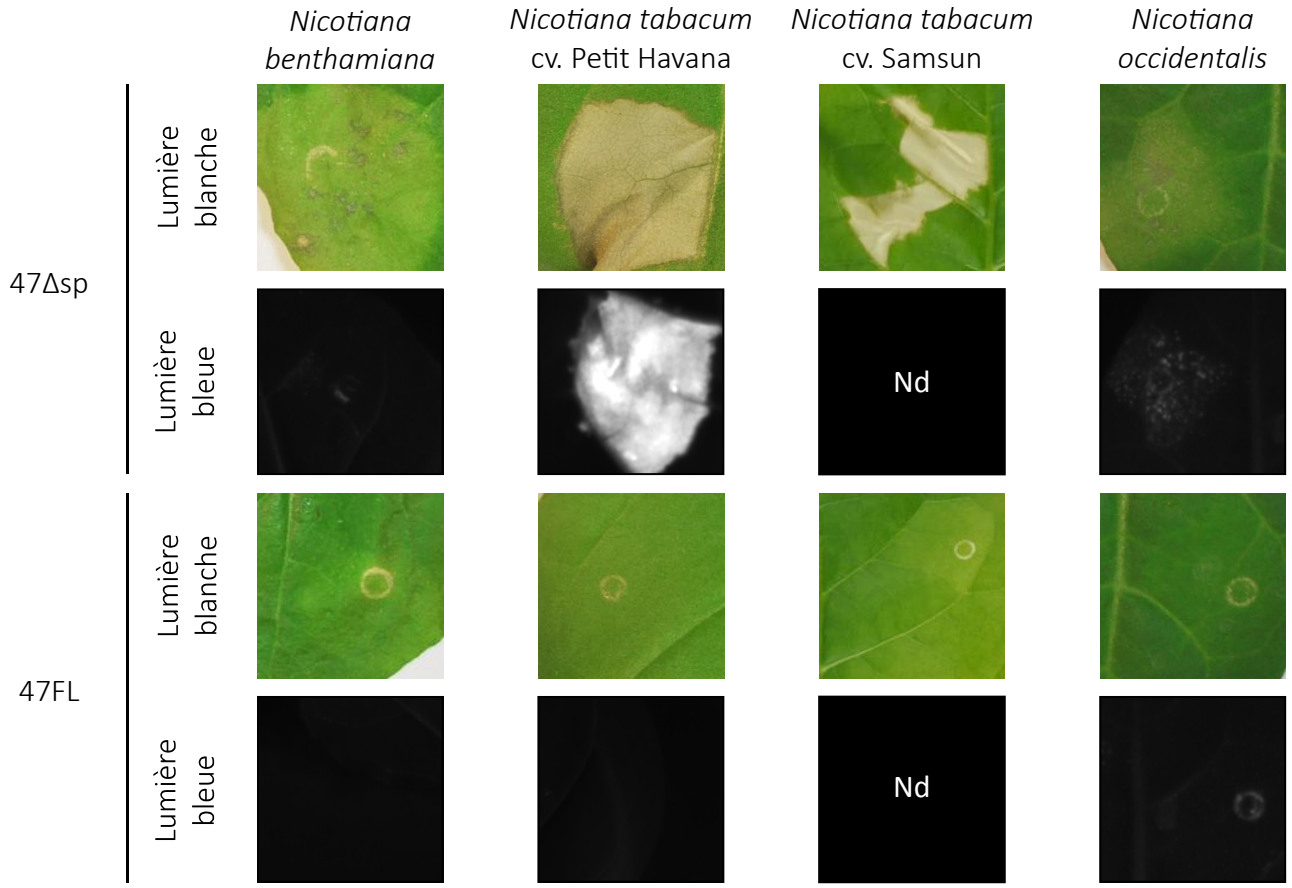


Figure 58 : Expression de Pv47 sur *Nicotiana spp*. Agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de Pv47, sans son peptide signal (47Δsp) et avec (47FL), dans des feuilles de *N. benthamiana*, *N. occidentalis, N. tabacum* cv. Havana et cv. Samsun. Les photographies ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration sous lumière blanche et sous lumière bleue. Les expériences ont été répétées 3 fois sur 6 plantes. Nd : Non déterminé.

cultivars de *N. tabacum*, cv. Samsun et cv. Petit Havana **(Figure 58)**. L'expression transitoire de 47FL n'a déclenché de mort cellulaire chez aucune de ces plantes. Concernant 47Δsp, au premier abord aucun symptôme n'apparait suite à son expression chez *N. benthamiana* et *N. occidentalis* à 5 jpi ; en revanche sur *N. tabacum* une mort cellulaire très forte et rapide apparait dès 2 jpi. Le même résultat a été obtenu pour les deux cultivars de *N. tabacum*.

Au fil de l'étude, il est apparu que des symptômes apparaissaient sur les feuilles de *N. benthamiana* exprimant 47Δsp. Des ilots nécrotiques, voire des nécroses, peuvent être observés aléatoirement sur un même lot de plantes. Il en est de même pour la production de phytoalexines associée, visible sous lumière bleue. Il a été remarqué que ces différences étaient particulièrement contrastées au cours de l'hiver. La **(Figure 59)** représente la variabilité visible macroscopiquement à 5 jpa à partir d'un même lot de plantes transformées avec la même culture d'*A. tumefaciens*. Il semblerait que le niveau de réponse *N. benthamiana* à la présence de Pv47 varie en fonction d'autres facteurs environnementaux et/ou développementaux.

Pv47 active la production d'H_2O_2 et de callose chez *N. benthamiana*

Compte tenu de la difficulté à observer la mort cellulaire déclenchée par Pv47 chez *N. benthamiana*, des observations plus fines et plus précoces ont été réalisées pour vérifier l'activation des défenses végétales. Elles peuvent permettre de confirmer l'uniformité de la réponse. Pour cela, l'accumulation de l'espèce active de l'oxygène H_2O_2 et les dépôts de callose ont été suivis sur des disques foliaires de *N. benthamiana* exprimant 47Δsp **(Figure 60)**. La production de l'H_2O_2 est révélée par un précipité brun après coloration au 3,3"-diaminobenzidine (DAB). Le dépôt de callose est détectable grâce à une coloration au bleu d'aniline. Les observations ont été faites à 2 jpa et 3 jpa. Une coloration légère par le DAB est visible sur les disques exprimant *47Δsp* à 2 jpa et disparait à 3 jpa **(Figure 60)**. La coloration au bleu d'aniline a permis de détecter des signaux sur des ilots de cellules de l'épiderme le long des parois cellulaires **(Figure 61)**. Des signaux sont nettement visibles au niveau des cellules du mésophylle et le long des nervures. Pv47 semble donc induire des réponses de défense chez *N. benthamiana*. Ces analyses préliminaires ont été réalisées sur un réplicat biologique et devront donc être répétées.

1.2 Test de suppression de mort cellulaire par Pv47 chez *N. benthamiana*

Le rôle généralement attribué aux effecteurs est de supprimer les réponses de défense de l'hôte telles que la HR. Pour vérifier cette caractéristique chez Pv47, la construction 47Δsp été exprimée transitoirement avec quatre inducteurs de mort cellulaire : le facteur d'apoptose de souris BAX, l'élicitine INF1, la toxine Nep2 de *Botrytis cinerea* et l'effecteur 33ΔSP. Nep2 est un inducteur de

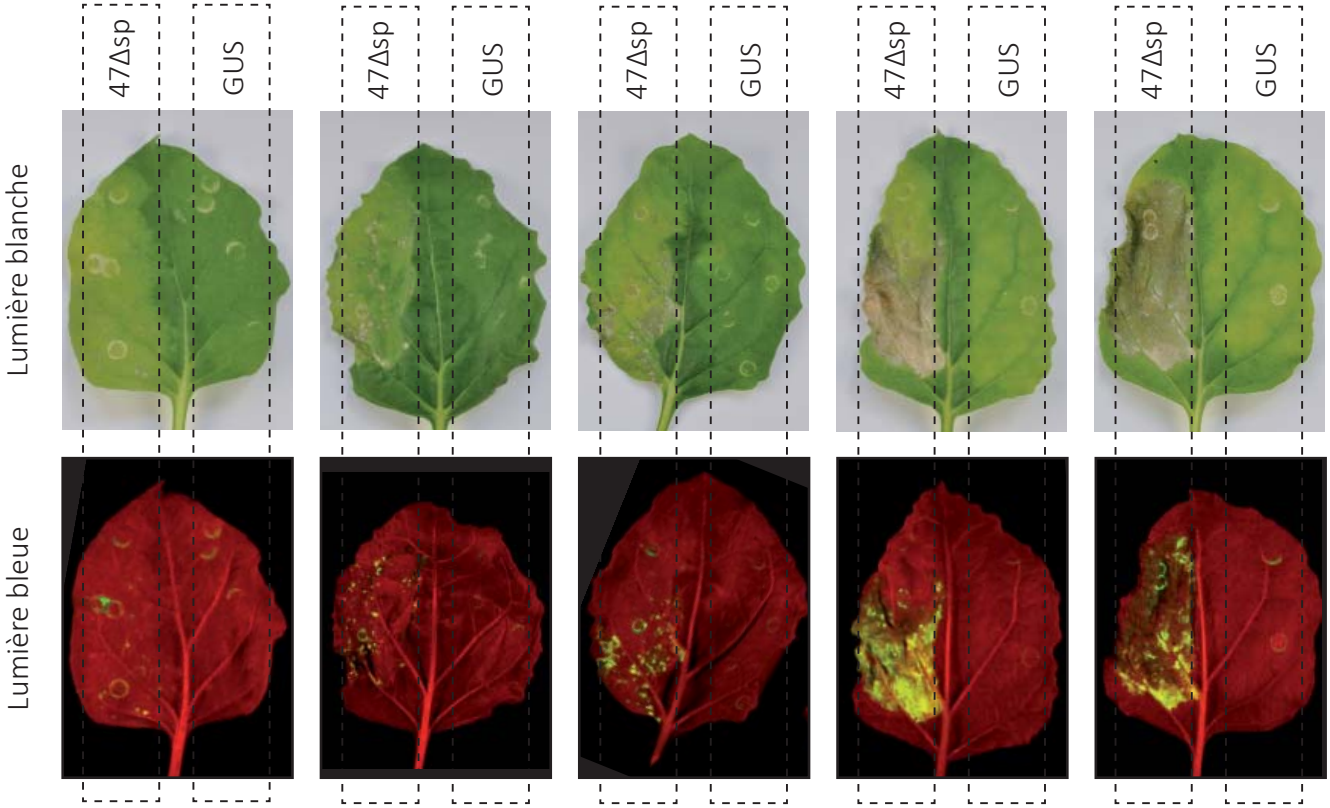


Figure 59: L'agroinfiltration de Pv47 amène des symptômes très variables sur *N. benthamiana*. Agroinfiltration d'une même culture de cellules de *A. tumefaciens* contenant un vecteur portant l'effecteur candidat Pv47 sans son peptide signal (47Δsp) dans des feuilles de *N. benthamiana* issues d'un même lot de production. GUS a été utilisé comme contrôle négatif. Les photographies ont été réalisées 5 jours après agroinfiltration sous lumière blanche et sous lumière bleue.

nécrose du champignon *B. cinerea* et Bax un inducteur d'apoptose de la souris. Les infiltrations de Pv47 et des inducteurs de mort cellulaire ont été effectuées de façon séquentielle comme décrit dans le Chapitre 2 **(Figure 62)**. 47Δsp seul ne bloque pas la mort cellulaire déclenchée par BAX. De même, 47Δsp ne bloque pas la mort cellulaire d'INF1. Au contraire, la co-expression avec *INF1* augmente la fréquence de la mort cellulaire de 25 %, ainsi que son intensité et la production de phytoalexines. En revanche, 47Δsp bloque efficacement la mort induite par Nep2 et par 33ΔSP.

En parallèle à ces expériences, et sur la base de l'efficacité de Pv47 pour supprimer la mort cellulaire de Pv33 et Nep2, j'ai étudié la capacité des effecteurs décrits dans le Chapitre 2 de supprimer la mort cellulaire induite par Nep2 et 33ΔSP. Les résultats de ces expériences ont montré que la totalité des gènes testés ont été capables d'inhiber la mort cellulaire induite par Pv33 et Nep2. Face à ce résultat inattendu, j'ai cherché à écarter un possible effet du plasmide. Des tests avec des plasmides alternatifs ont donc été réalisés et ont montré que dès que le suppresseur candidat et l'inducteur de mort cellulaire sont clonés dans des plasmides identiques, on n'observe pas de mort cellulaire. Dans mon cas, Nep2, 47ΔSP et 33ΔSP ont été clonés dans le même plasmide. Cette découverte non seulement a remis en cause les résultats de la suppression de mort cellulaire par 47ΔSP décrits ci-dessus, mais également porte à s'interroger sur certains résultats décrits dans la littérature issus d'expériences de double agroinfiltration séquentielle.

Les résultats de suppression permettent de conclure que 47Δsp renforce la mort induite par INF1 et ne supprime pas celle de BAX.

1.3 Analyse métabolomique de l'effet de Pv47 sur *N. benthamiana*

Pour vérifier de façon plus fine si la présence de Pv47 amenait des perturbations du métabolome végétal, des analyses métabolomiques ont été réalisées sur des feuilles de *N. benthamiana* qui expriment 47Δsp. Des feuilles exprimant GFP ont été utilisées comme référence. Les métabolites ont été extraits au méthanol, séparés par chromatographie liquide (LC) sur une colonne de type C18, ionisés positivement ou négativement par électrospray (ESI) et détectés par spectrométrie de masse (MS). La colonne C18 retient mieux les molécules peu polaires, c'est-à-dire notamment les molécules impliquées dans le métabolisme secondaire. Les sucres et acides aminés très polaires ne sont pas retenus et sont élués très rapidement. Les analyses par LC couplée à la MS (LC-MS) et l'analyse de données ont été effectuées par le Dr Baltenweck au centre INRA de Colmar. L'analyse a été réalisée sur deux lots de plantes : un premier au cours du printemps 2015 et un second lors de l'automne 2018. La première expérience n'a permis de détecter que très peu de différences dans la teneur en métabolites entre les conditions 47Δsp et GFP. Pour optimiser l'extraction, la taille des disques prélevés a été augmentée pour la seconde expérience. Deux types d'analyses ont été

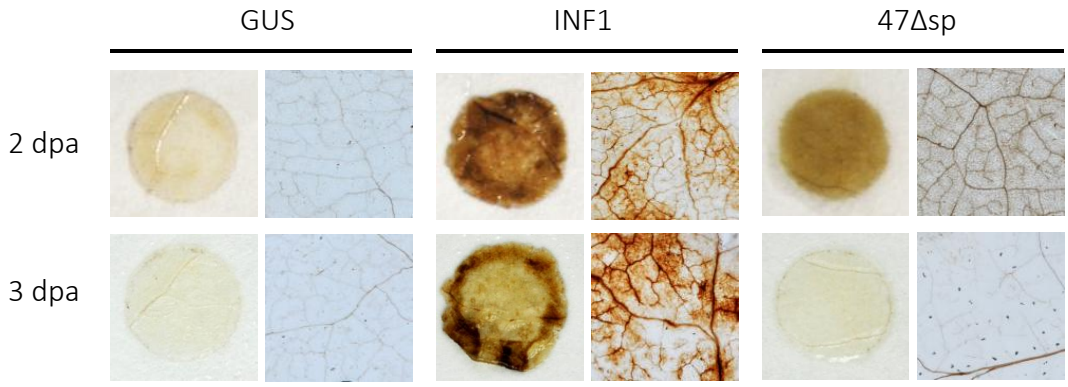
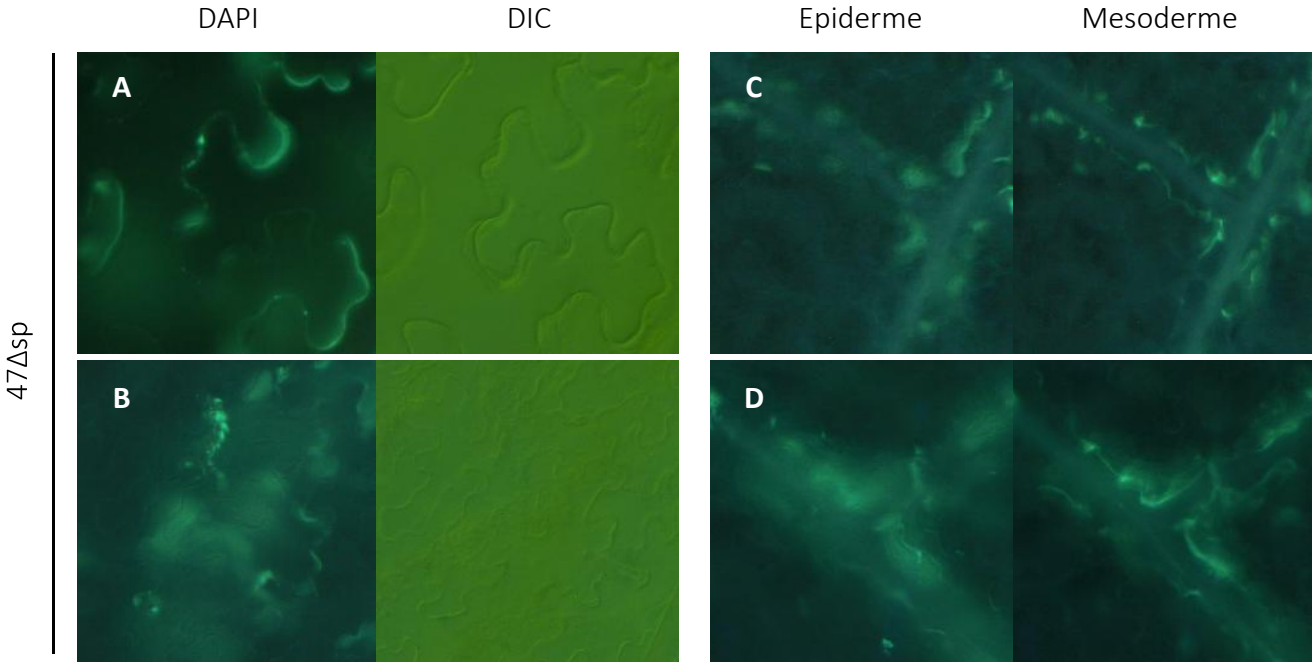


Figure 60 : La présence de Pv47 induit une production de ROS sur *N. benthamiana*. Agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de Pv47 sans son peptide signal (47Δsp) dans des feuilles de *N. benthamiana.* Des disques foliaires prélevés à 2 jpa et 3 jpa ont été colorés au DAB. GUS et INF1 ont été utilisés respectivement comme contrôles négatif et positif d'une induction de défense végétale. Images représentatives des symptômes les plus forts observés sur 5 plantes différentes.



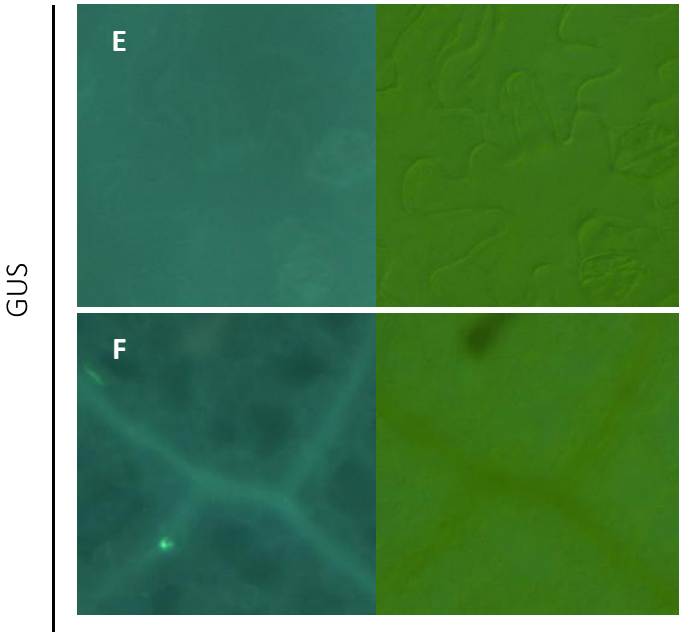
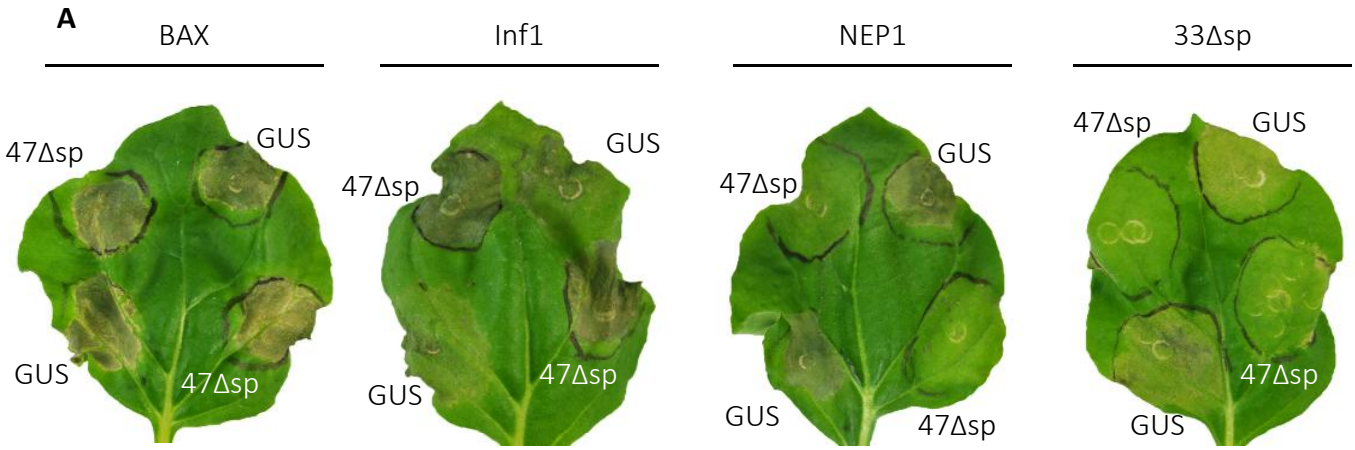
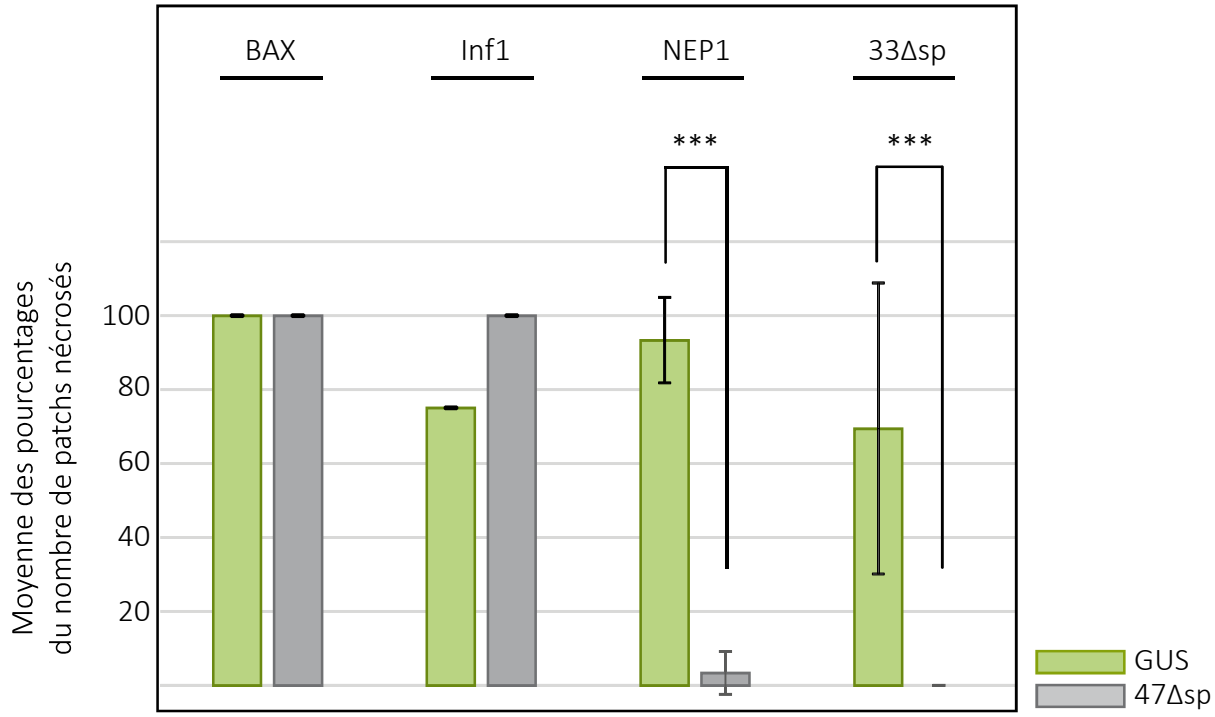


Figure 61 : La présence de Pv47 induit un dépôt de callose sur *N. benthamiana*. Agroinfiltration d'une construction permettant l'expression transitoire de Pv47 sans son peptide signal (47Δsp) dans des feuilles de *N. benthamiana*. Des disques foliaires prélevés à 2 jpa ont été colorés au bleu d'aniline. **(A à D)** Observation de tissus transformés par Pv47 au niveau **(A et B)** de l'épiderme, **(C et D)** des vaisseaux conducteurs sur le plan focal de l'épiderme (gauche) et du mésophylle (droite). **(E à F)** Observation des tissus, qui expriment GUS, au niveau **(E)** de l'epiderme, **(F)** du mésophylle et des vaisseaux conducteurs. Symptômes représentatifs d'échantillons obtenus sur 5 plantes différentes.





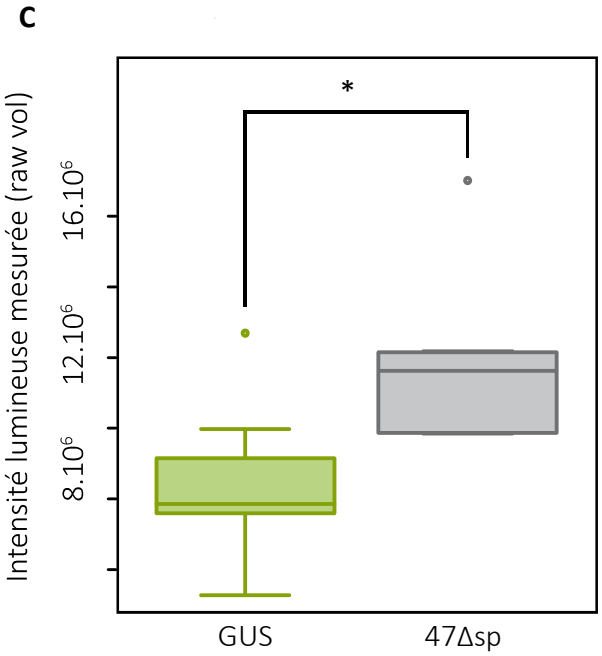


Figure 62 : Évaluation de l'effet de Pv47 sur la mort cellulaire. Expression transitoire de GUS ou 47Δsp par agroinfiltration foliaire de *N. benthamiana* suivie 24h plus tard de l'expression de quatre inducteurs de mort cellulaire : BAX, INF1, Nep1 et 33Δsp. **(A)** Les feuilles ont été photographiées à 4 dpi. Les différences significatives entre les populations basées sur un test Khi2 de Pearson sont représentées par un astérisque ($P \leq 0.05$) et trois astérisques ($P \leq 0.001$). **(B)** Les zones nécrosées ont été dénombrées à 5 jpa. **(C)** Mesure des phytoalexines détectables par UV produites lors de la nécrose provoquée par INF1. La différence significative entre GUS et 47Δsp basée sur un test de Wilcoxon apparié est représentée par un astérisque ($P \leq 0.05$).

réalisées sur les deux expériences : une analyse ciblée de métabolites marqueurs de défense végétale et une analyse non-ciblée.

Analyse ciblée

L'analyse se base sur la quantification d'une sélection de métabolites, connus pour participer dans les réactions de défense chez les plantes, disponibles sous forme de standards commerciaux et dont le temps de rétention, le spectre de masse et le rapport masse sur charge (m/z) sont connus. Les perturbations des teneurs en molécules intervenant dans les voies de biosynthèse des molécules cibles ont été aussi suivies. Les molécules étudiées comprennent :

- Des phytohormones : l'acide abscissique (ABA), l'auxine, l'acide gibbérellique (GA3 ; GA4 ; GA7), l'acide salicylique, l'acide jasmonique (acide oxo-phytodienoic 1, 2 et 3; Ja-Ile, JA conjugué à l'isoleucine; jasmonate de méthyle), une cytokinine (zéatine; isopentenyladenine).
- Des marqueurs de stress : des alkaloïdes dont la biosynthèse est activée par l'acide jasmonique (feruloyputrescine; caffeoylputrescine; coumaroylputrescine; Hydroxy-octanoylnornicotine; n-butanoylnornicotine ; octanoylnornicotine ; octanolanabasine), le tryptophane.
- Des molécules aux propriétés antimicrobiennes : des phytoalexines (scopolétine; scopoletin glucuronide; scoparone; capsidiol), l'acide 3-O-caffeoylquinique

Parmi toutes ces molécules, quelques-une n'ont pas pu être détectées. La quantité de tissus foliaires utilisés étaient probablement trop faibles, ces métabolites ne sont pas suffisamment présents dans les échantillons. Concernant les métabolites détectés par l'analyse, il s'est révélé que la majorité ne présentait pas de différence entre les tissus exprimant 47Δsp et ceux qui expriment le contrôle GFP. Cependant, des différences ont été observées pour le tryptophane (année 2017, fold 2.2, pvalue 0.006) **(Tableau 7)**.

Analyse non-ciblée

L'analyse non-ciblée permet de détecter les métabolites sans *a priori* et donc potentiellement de repérer les perturbations provoquées par l'effecteur lui-même sur d'autres voies que celles des défenses. Les données obtenues par LC-MS sont traitées par le logiciel RStudio avec le script XCMS. Les ions sur- ou sous-représentés par rapport à la condition GFP sont triés sur la base d'un rapport des quantités (fold-change) supérieur à 2. Par ailleurs, n'ont été retenus que les ions qui présentent une p-value inférieure à 0.05. Les ions détectés sont nommés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) M et de leur temps de rétention T. Par exemple M201T632 est un ion d'une masse de 201 uma et un temps de rétention de 632 secondes. On considère que les ions ne possèdent qu'une seule charge.

Hormones	Utilisation du mode positif ou négatif	Détection des molécules	Différence entre les conditions 47Δsp et GFP
Acide Abscissique	positif/négatif	non détécté	-
Acide gibbérellique 3	positif	non détécté	-
Acide gibbérellique 4	positif	non détécté	-
Acide gibbérellique7	positif	non détécté	-
Acide jasmonique-Ile	positif	non détécté	-
Acide jasmonique	négatif	détécté faiblement	non
Acide oxo-phytodienoic 1	positif	détécté	non
Acide oxo-phytodienoic 2	positif	détécté	non
Acide oxo-phytodienoic 3	positif	détécté	non
Acide salicilique	négatif	détécté faiblement	non
Auxine	positif	non détécté	-
Méthyle Jasmonate	positif	non détécté	-
Isopentenyladenine	positif	non détécté	-
Zéatine	positif	non détécté	-

Marqueurs de stress	Utilisation du mode positif ou négatif	Détection des molécules	Différence entre les conditions 47Δsp et GFP
N-Butanoylnornicotine	positif	détécté	non
Caffeoylputrescine	positif	détécté	non
Coumaroylputrescine	positif	non détécté	-
Feruloyputrescine	positif	détécté	non
Hydroxy-octanoylnornicotine	positif	détécté	non
Octanolanabasine	positif	détécté	non
Octanoylnornicotine	positif	détécté	non
Tryptophane	positif	détécté	oui

Molécules antimicrobiennes	Utilisation du mode positif ou négatif	Détection des molécules	Différence entre les conditions 47Δsp et GFP
Acide caffeoylquinic 1	positif	détécté	non
Acide caffeoylquinic 2	positif	détécté	non
Acide caffeoylquinic 3	négatif	détécté	non
Acide caffeoylquinic 4	négatif	détécté	non
Capsidiol	négatif	non detecté	-
Scoparone	positif	non detecté	-
Scopoletin	positif	non detecté	-
Scopoletin glucuronide	positif	detecté	non

Tableau 7 : Cibles recherchées par analyse métabolomique.

	Nom de l'ion	Fold	*t*-stat	pValue	m/z median	m/z minimum	m/z maximum	Temps de rétention median	Temps de rétention minimum	Temps de rétention maximum
A	M201T632	3.64218956	-4.37314014	9.86e-05	201.163633	201.163367	201.163915	632.275	628.222	638.208
	M117T632	3.54233822	-4.30708521	0.00011812	117.070001	117.069854	117.070062	631.618	630.624	633.858
	M159T632	3.39409898	-4.43717808	8.0148e-05	159.11671	159.116491	159.116943	632.144	630.212	638.208
B	M188T104	2.32751021	-2.96152657	0.00509696	188.070699	188.070633	188.070767	103.549	83.3444	104.089
	M205T104	2.24296987	-2.88607945	0.00620765	205.097192	205.097118	205.097255	103.525	83.3332	104.389
C	M483T417	2.71497286	-4.1553923	0.00019449	483.222214	483.222051	483.222332	416.709	416.189	417.5

Tableau 8 : Ions détectés par l'analyse non ciblée en mode positif : données obtenues pour les ions qui ont un fold supérieur à 2

L'analyse conduite *via* une ionisation négative des métabolites a permis de détecter 124 ions, dont 89 sont présents de façon significativement différente entre traitements, et seulement 2 avec un fold-change supérieur à 2. Ces deux ions ont un temps de rétention très petit **(Tableau 8)**. Ils pourraient correspondre à des peptides qui sont élués en même temps que le solvant, ce qui rend leur identification complexe.

L'analyse conduite *via* une ionisation positive des métabolites a permis de détecter 540 ions, dont 140 sont présents de façon significativement différente entre traitements, et seulement 7 avec un fold-change supérieur à 2. Six ions pourraient correspondre à trois métabolites, sur la base de leur fold-change et de leur temps de rétention, **(Tableau 8)**.

Les ions M201T632, M117T632 et M159T632 sont issus du même métabolite, qui, d'après la masse de ces ions, semble être plutôt apolaire **(Tableau 8, A)**. Il pourrait s'agir d'un sesquiterpène, de formule brute C15H21 ou C15H22O, potentiellement dérivé du capsidiol (C15H24O2). Ce composé est environ 3 fois plus présent dans les échantillons qui expriment 47Δsp (fold 3.5, pvalue : 0.0001).

Le second métabolite est composé des ions M188T104 et M205T104 **(Tableau 8, B)**. Il s'agit du tryptophane et il est de 2 à 3 fois plus présent dans la condition 47Δsp (fold : 2.3, pvalue 0.005) **(Figure 63)**.

Le troisième composé correspond à l'unique ion M483T417 **(Tableau 8, C)**. Sa formule brute putative pourrait être C24H35O10 ; il s'agit potentiellement d'un dérivé sesquiterpène avec un groupement sucre C9H12O8. Ainsi une partie C15H23O2 correspondrait à un sesquiterpène et une partie C9H12O8 à un malonyl-glucoside. Il est donc fort probable que le troisième composé soit un sesquiterpène glycosylé. Il est retrouvé en quantité 2 à 3 fois plus importante dans l'échantillon 47Δsp (fold : 2.7, pvalue 0.0002). La grande variété existante de sesquiterpènes ne permet pas d'identifier tout de suite de façon précise celui produit en forte quantité en présence de l'effecteur Pv47.

En résumé, les deux types d'analyses métabolomiques, ciblée et non-ciblée, ont montré une augmentation de la quantité de tryptophane en présence de Pv47. Par ailleurs, l'analyse non-ciblée a montré que la présence de Pv47 induisait la production de phytoalexines de type sesquiterpène.

1.4 Étude de la localisation cellulaire et recherche des cibles de Pv47

Pv47 localise au niveau du réticulum endoplasmique chez *N. benthamiana*

Pour mieux comprendre les fonctions de Pv47, les compartiments subcellulaires végétaux ciblés par l'effecteur ont été recherchés. La réalisation d'une protéine chimérique mCitrine :FLAG :47Δsp par le Dr E. Evangelisti du Sainsbury Laboratory à Cambridge, a permis de répondre à la question de la localisation de Pv47 dans les cellules végétales. La construction a été

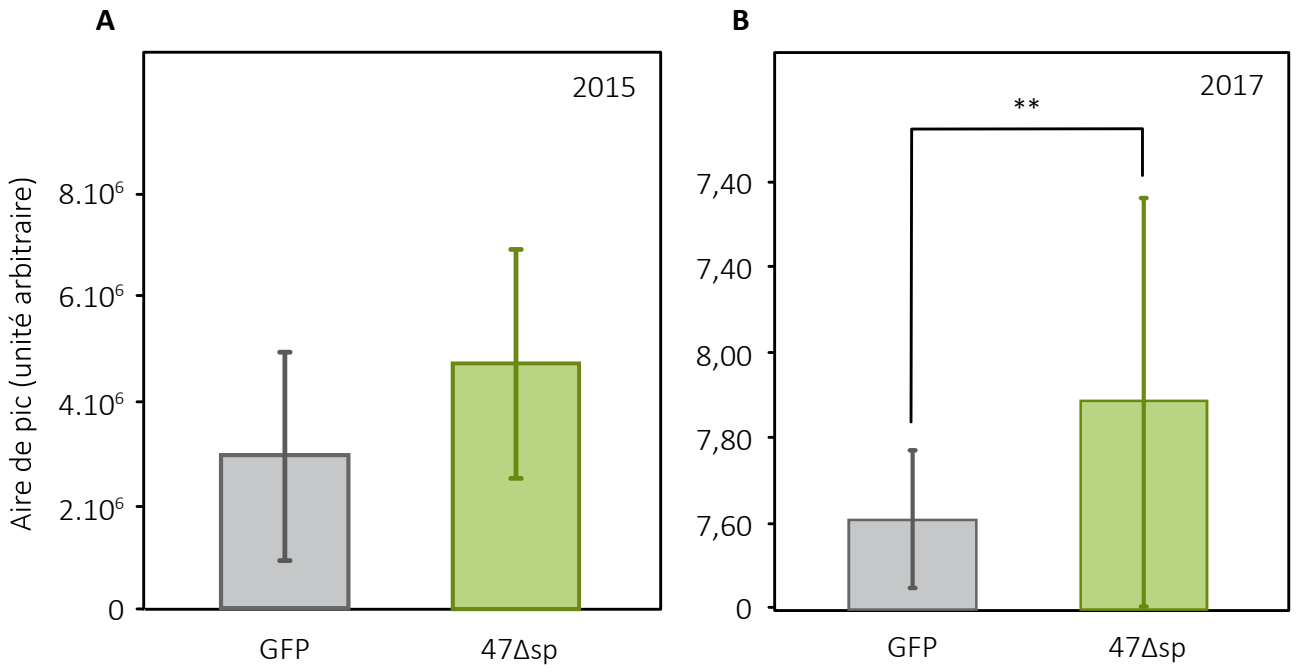


Figure 63 : Détection du tryptophane après expression transitoire de Pv47 chez *N. benthamiana.* Les feuilles de *N. benthamiana* sont agroinfiltrées avec les constructions permettant l'expression transitoire de GUS ou de 47Δsp. 48h après agroinfiltration les tissus sont récoltés, lyophilisés et broyés. Les métabolites sont extraits au méthanol. L'apigénine est ajoutée comme étalon interne. Les analyses métabolomiques sont réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). La séparation des métabolites est obtenue par chromatographie liquide sur une colonne à phase inverse (apolaire). Au niveau du spectromètre de masse, les molécules sont ionisées par une source à electronébulisation (ESI pour *ElectroSpray Inozation*) en mode positif. Toutes les données brutes sont analysées à l'aide du pack avec le script XCMS sous R. Les aires des pics correspondant au tryptophane présent dans les extraits sont mesurées avec le logiciel Xcalibur. Détection de pics correspondants au tryptophane **(A)** en 2015 pour 4 échantillons par condition et **(B)** en 2017 pour 32 échantillons par condition. Les intensités sont données en unités arbitraires.

agroinfiltrée sur les parties foliaires de *N. benthamiana* et observée par microscopie confocale 2 jpa **(Figure 64)**. Le signal de la mCitrine n'a pas été représenté dans sa couleur jaune habituelle mais en vert pour faciliter la visibilité des colocalisations qui suivent. Les premières observations ont révélé une localisation qui n'était pas sans rappeler le reticulum endoplasmique (RE) : les réseaux tubulaires typiques du réticulum endoplasmique lisse sont nettement visibles. Pour le confirmer, la fusion a été coexprimée avec le marqueur *ER-rk*. Il s'agit de la fusion traductionnelle du peptide signal de la protéine WAK2 d'*A. thaliana* avec la protéine fluorescente mCherry et le motif C-terminal HDEL **(Nelson et al., 2007)**. Le motif HDEL intervient comme un signal de rétention ou de récupération de la protéine par le RE **(Munro and Pelham, 1987; Dean and Pelham, 1990)**. La superposition des signaux colorés en rouge (ER-rk) avec ceux colorés en vert (mCitrine :FLAG :47Δsp) est visualisable en orange-jaune et confirme la colocalisation de Pv47 avec le RE **(Figure 65)**. Le signal de Pv47 est fréquemment plus diffus que celui du RE même si ce n'est pas visible sur les photos **(Figure 65, C)**, l'effecteur pourrait donc s'accumuler sur la surface externe du réticulum endoplasmique.

Une observation plus détaillée a permis de visualiser des gros agrégats marqués Pv47 et RE **(Figures 66)**. Ils sont également présents dans des cellules qui ne présentent que le marqueur RE mais celles-ci sont systématiquement localisées à proximité d'autres qui expriment mCitrine :FLAG :47Δsp **(Figures 66, C)**. Les agrégats les plus visibles semblent en réalité être un regroupement d'agrégats mesurant entre 0.7 et 2 µm **(Figures 66, D et E)**. Par ailleurs, des signaux de mCitrine :FLAG :47Δsp sont observés en périphérie du RE **(Figure 66, F)**.

Recherche des cibles de Pv47

Toujours dans le but d'identifier les fonctions protéiques de Pv47, ses interactants ont été recherchés parmi le protéome végétal. L'approche utilisée pour identifier les cibles de Pv47 a été la même que pour Pv33, l'immunoprécipitation (IP) couplée à la spectrométrie de masse. La construction mCitrine :FLAG-47Δsp a été exprimée transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*. Les protéines de feuilles transformées transitoirement ont été extraites et une immunoprécipitation a permis de retenir les interactants protéiques candidats de l'effecteur, qui ont été séparés par SDS-PAGE et digérés à la trypsine. Les peptides sont ensuite ionisés et passés en spectrométrie de masse **(Figure 67)**. 167 protéines ont été identifiées à partir des peptides. La sélection des cibles a été réalisée de la même manière que pour Pv33 ; les deux étapes de ce processus sont représentées dans la **Figure 67**:

- La première étape a été la suppression définitive des candidats qui ressortent dans les résultats d'IP pour au moins deux autres effecteurs du catalogue. Cette étape élimine une majorité de faux positifs. La liste des candidats s'est ainsi restreinte à 65 protéines.

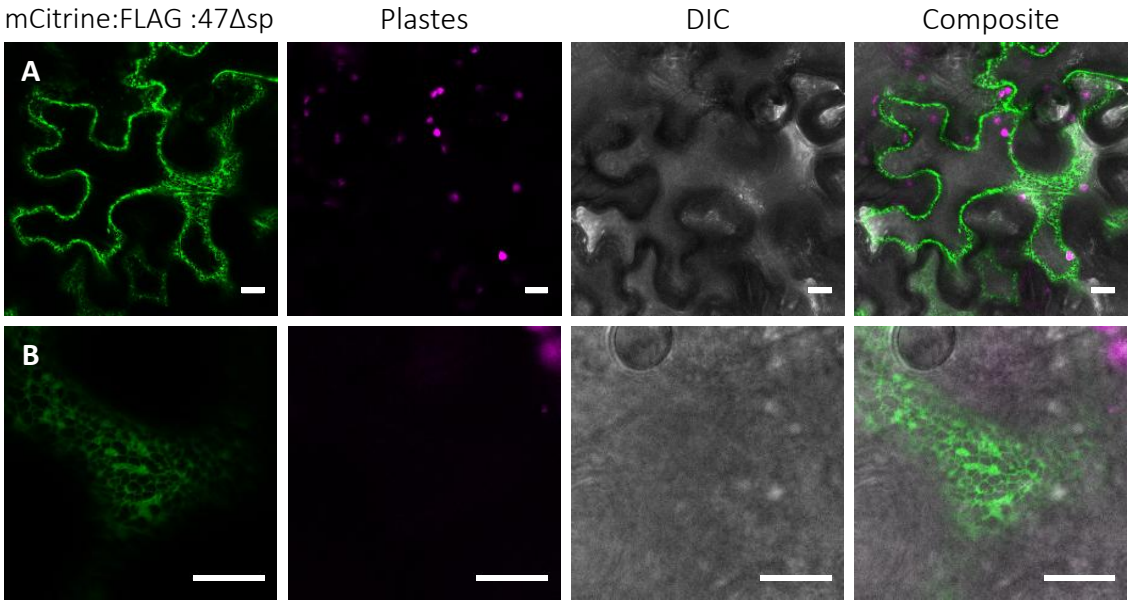


Figure 64 : Localisation de Pv47 dans les cellules de *N. benthamiana*. Observation par microscopie confocale de feuilles agroinfiltrées d'une construction permettant l'expression transitoire de mCitrine:FLAG:47Δsp à 2 jpa. **(A)** Photographie d'une cellule entière. **(B)** Agrandissement sur les réseaux de tubules. Pour chaque ligne, une image en fluorescence jaune (mCitrine :FLAG :47Δsp) ou rose (les plastes), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. Barre d'échelle : 15 µm.

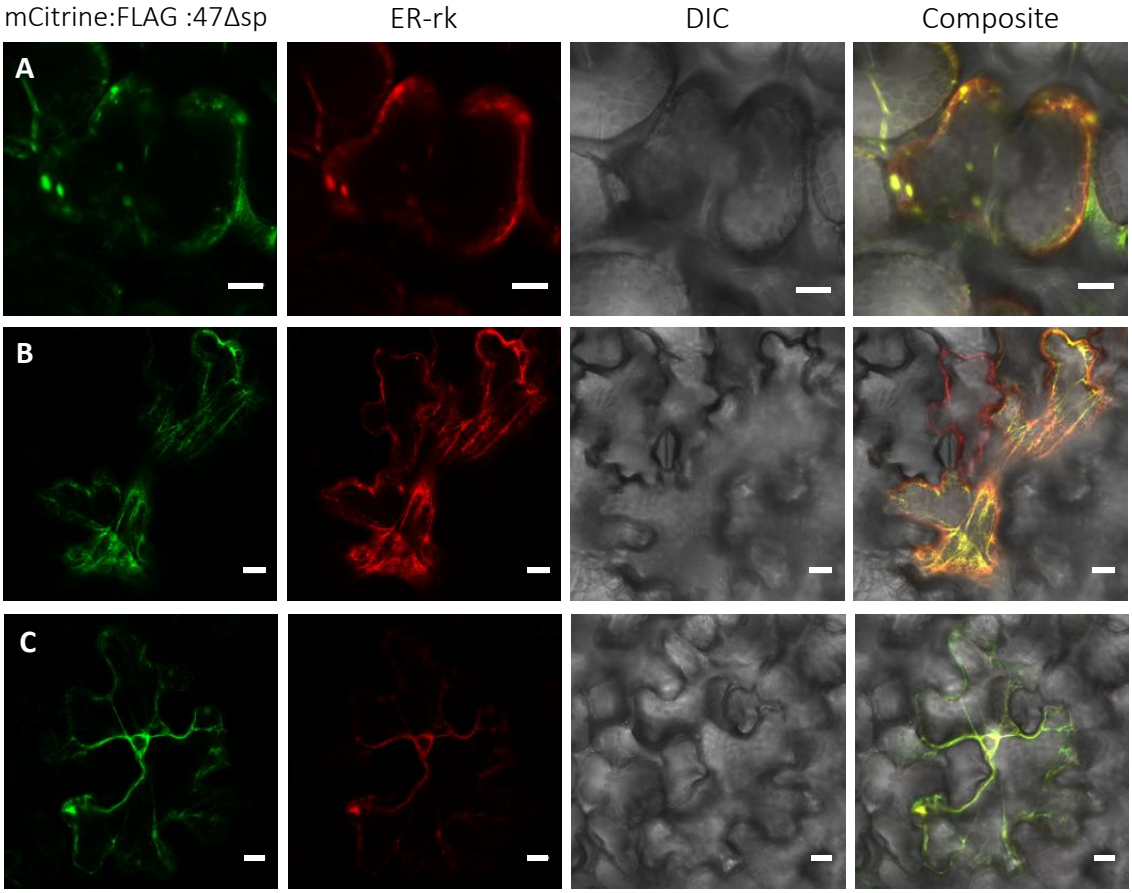


Figure 65 : Confirmation de la localisation de Pv47 au RE. Observation au microscope confocal de feuilles agroinfiltrées d'une construction permettant l'expression transitoire du marqueur ER-rk et la construction mCitrine:FLAG:47Δsp à 2 jpa. Pour chaque ligne, une image en fluorescence jaune (mCitrine :FLAG :47Δsp) ou rouge (ER-rk), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. La superposition de Pv47 avec le RE est visible dans les cellules du mésophylle **(A)** et de l'épiderme **(B et C)**. Barre d'échelle : 15 µm.

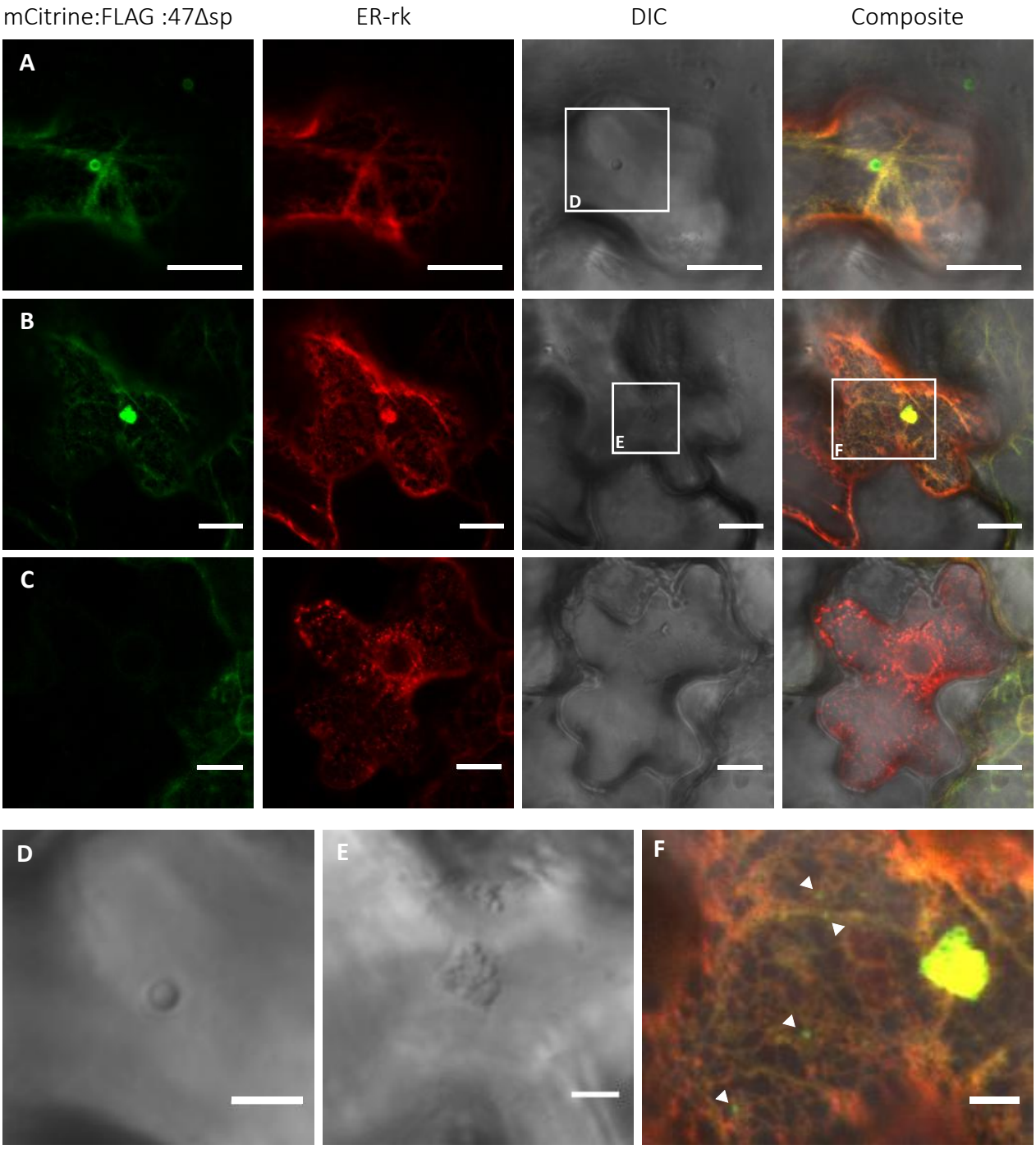


Figure 66 : Pv47 perturbe la structure du RE. Observation par microscopie confocale de feuilles agroinfiltrées avec des constructions permettant l'expression transitoire du marqueur du réticulum endoplasmique ER-rk et la construction mCitrine:FLAG:47Δsp à 2 jpa. Pour chaque ligne, une image en fluorescence jaune (mCitrine :FLAG :47Δsp) ou rouge (ER-rk), une image en contraste interférentiel différentiel (DIC) et une image superposant la fluorescence et le DIC sont montrées. **(A à C)** Des agrégats sont visibles et sont marqués par le RE et Pv47. **(D à F)** Des zooms et amélioration des clichés **A** et **B** ont été réalisés pour observer plus finement la morphologie de ces agrégats. Flèches blanches : Signaux spécifiques à la fluorescence de la citrine. Barre d'échelle : 15 µm (pour les clichés de **A** à **C**) et 5 µm (pour les clichés de **D** à **F**).

- Pour la seconde étape, j'ai souhaité regrouper les protéines dont les chances d'être de bons candidats étaient très faibles. Trois groupes se sont organisés ainsi :
  - Un groupe constitué de 44 protéines qui ont été identifiées une fois chez un autre effecteur (dont Pv33).
  - Un groupe de 9 protéines qui appartiennent à des familles protéiques qui sont usuellement retrouvées en immunoprécipitation.
  - Un groupe de 2 protéines qui ne sont pas retrouvées usuellement par immunoprécipitation, mais qui sont localisées aux mitochondries ou aux chloroplastes.

En suivant cette procédure, la liste finale était constituée de 10 protéines candidates majeures **(figure 68),** parmi lesquelles deux ont attiré mon attention :

La première est une protéine candidate de résistance, de type CC-NBS-LRR, dont la protéine connue la plus proche est R1A-3, qui est une protéine de résistance au mildiou de la pomme de terre provoqué par *P. infestans* **(Ballvora et al., 2002)**.

La seconde protéine est l'homologue de SEC31-B. SEC31 est une protéine essentielle au bon fonctionnement cellulaire qui a été caractérisée chez la levure et dont il existe deux homologues, SEC31-A et SEC31-B, chez l'homme et chez les plantes. SEC31 localise, comme Pv47, au niveau de RE où elle fait partie du complexe COPII et favorise la formation de vésicules qui vont permettre de transporter les protéines du RE jusqu'au Golgi **(Stagg et al., 2006; Watson and Stephens, 2005)**. Cette représentation 3D animée permet de se rendre compte de l'importance du rôle joué par SEC31 dans la structure de COPII: https://www.youtube.com/watch?v=ABGlD1vQG3s.

Des approches de co-immunoprécipitation sont en cours pour confirmer l'interaction entre l'effecteur Pv47 et R1A3 ainsi que SEC31. Évidemment il faut retenir que le crible réalisé sur les données permet de réaliser une recherche ciblée des interactants basée sur la plus forte probabilité, mais il peut avoir laissé échapper les interactants réels de Pv47.

1.5 Étude de l'effet de l'expression de Pv47 sur les défenses de la plante.

La présence de Pv47 à l'intérieur des cellules végétales de *N. benthamiana* semble déclencher des mécanismes de défense plus ou moins fort : dépôt de callose, production de ROS, de sesquiterpènes, de phytoalexines et parfois déclenchement de nécroses. Ces mécanismes de défense seront-il suffisants pour conduire à une résistance de la plante face aux agents phytopathogènes ? Ou au contraire, l'expression de l'effecteur peut-elle limiter l'efficacité de certaines voies de défenses facilitant ainsi l'infection par certains agents pathogènes ? Pour répondre à ces questions, des tests

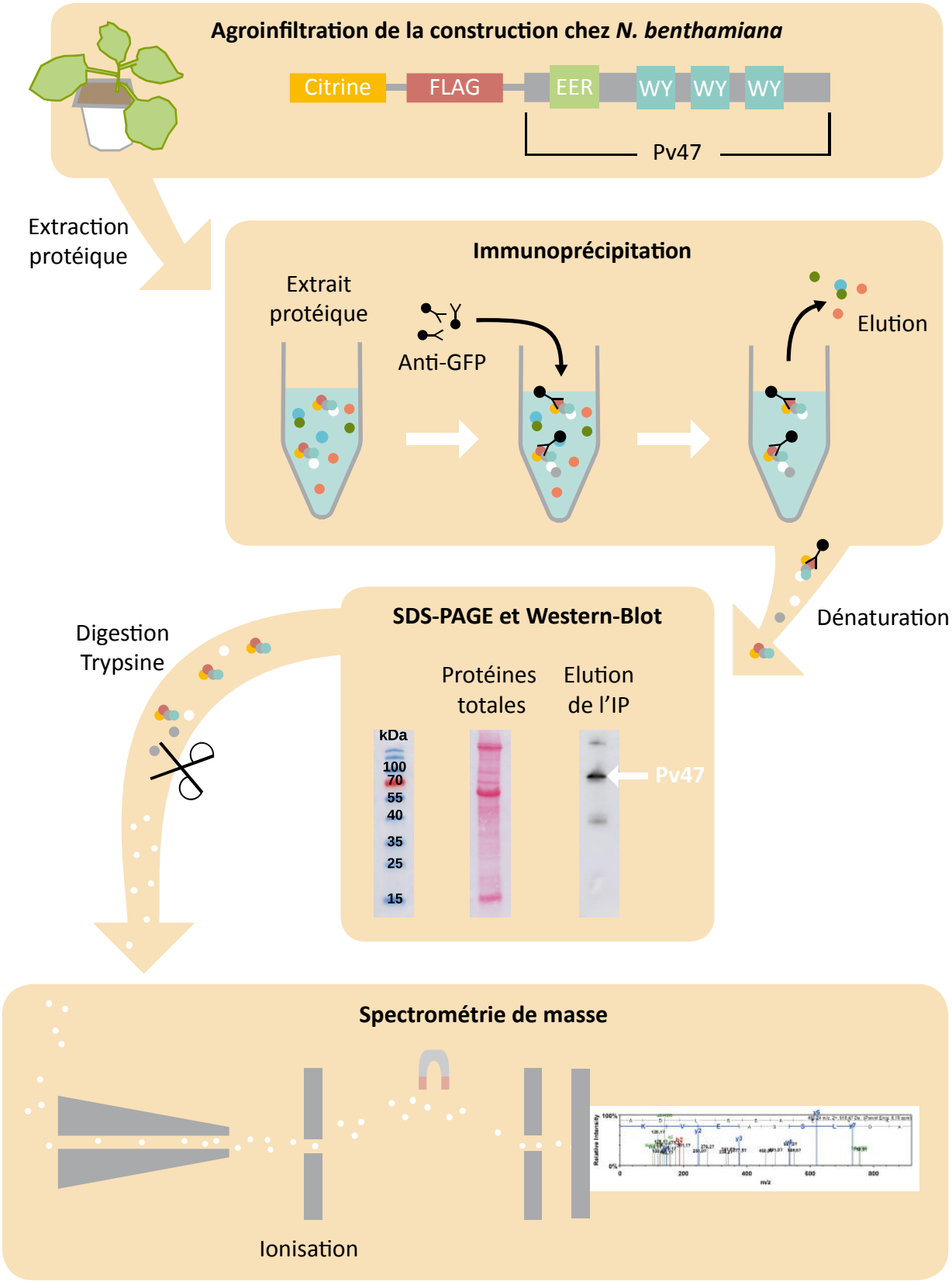
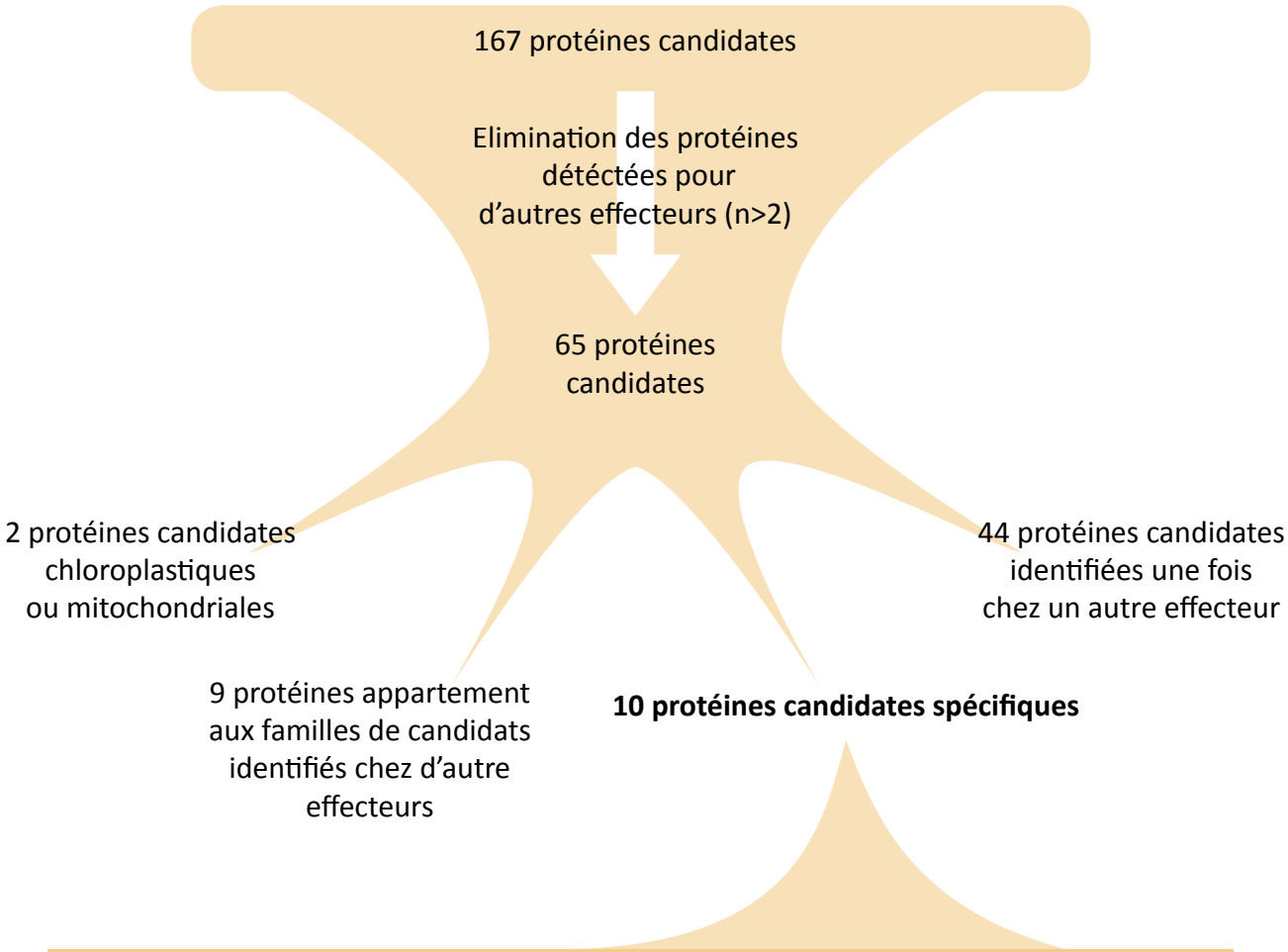


Figure 67 : Procédure pour identifier les interactants de Pv47.
La construction mCitrine:FLAG-47Δsp est exprimée dans *N. benthamiana* à l'aide d'*A. tumefaciens*. Les protéines sont extraites et immunoprécipitées : Pv47 et ses interactants sont retenus à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Les protéines éluées sont ensuite dénaturées, séparées par SDS-PAGE et digérées à la Trypsine. La présence de l'effecteur est confirmée par Western Blot à l'aide d'anticorps anti-FLAG. Les peptides sont ensuite ionisés et séparés au spectromètre de masse en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le détecteur convertit les impacts en courant électrique représenté par un spectre de masse. Ces peptides ensuite identifiés à l'aide du logiciel Scaffold à partir de la base de données Uniprot.



Protéines candidates	Processus Biologique	Localisation
eIF-2-alpha kinase activator GCN1 isoform	Traduction	NA
exportin-2-like	Transport de protéine	Noyaux
uncharacterized protein LOC107782957	Inconnue	Inconnue
UDP-glucose 6-dehydrogenase	Biosynthèse	Cytoplasme Noyaux
Plant ubx domain-containing protein		Cytoplasme
Uncharacterized protein	Inconnue	Inconnue
Protein transport protein SEC31 homolog B-like	Tranport de protéine	RE et Golgi
ATP-dependent RNA helicase A-like isoform X2	Traduction	Cytoplasme Noyaux
PDR-type ABC transporter	Transport de protéine	
putative late blight resistance protein homolog R1A-3	Résistance	Cytoplasme

Figure 68 : Recherche des interactants de Pv47.
La recherche d'interactants est effectuée parmi les 163 protéines identifiées par spectrométrie de masse. Une sélection basée sur les faux positifs obtenus chez d'autres effecteurs a permis de restreindre la liste à 102 protéines. Un second tri a permis d'identifier 10 protéines candidates présentées sous la forme de tableau. La localisation et la fonction biologique ont été recensées à l'aide d'Uniprot.

phytopathologiques ont été réalisés sur des organismes aux stratégies d'infection diverses : les oomycètes biotrophe *P. viticola* et hémibiotrophe *Phytophthora parasitica*, la bactérie *Pseudomonas syringae*, le virus PVX et le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Le même schéma expérimental utilisé dans l'étude de l'effecteur Pv44 a été réutilisé dans ces tests d'infection **(Figure 45)**.

Effet de l'expression de Pv47 sur l'infection par *Plasmopara viticola*

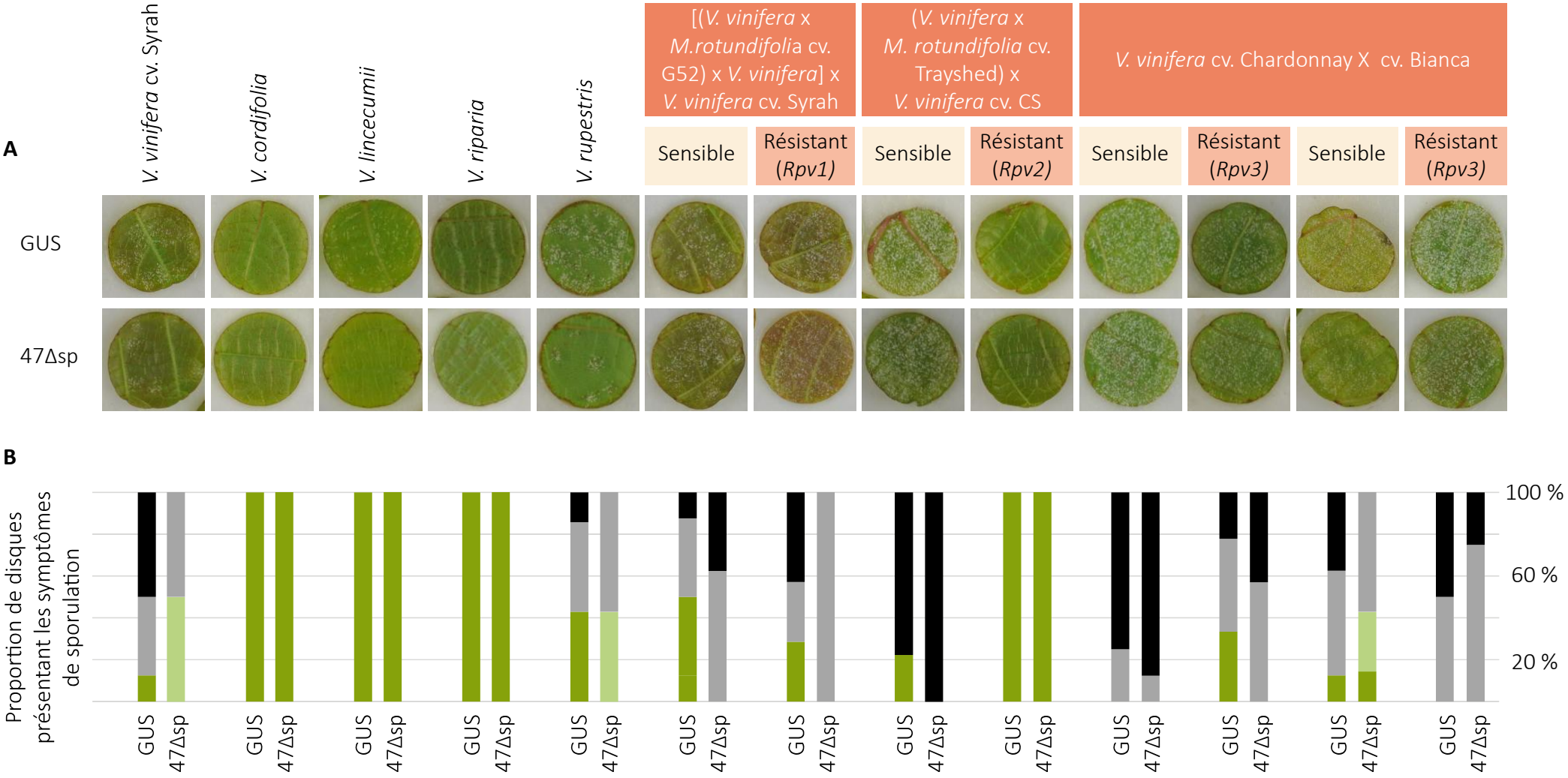
La possible implication de l'effecteur Pv47 dans l'infection par *P. viticola* a été étudiée chez la vigne. Pour cela l'effecteur a été exprimé transitoirement sur des disques foliaires de vigne selon la méthode décrite au Chapitre 1. Deux jours plus tard, les disques ont été inoculés avec *P. viticola*. La même échelle de symptômes, les mêmes génotypes et contrôles décrits au Chapitre 2 pour l'étude de Pv44 ont été utilisés **(Figure 46, A)**.

La sporulation de *P. viticola* a été observée sur des disques agroinfiltrés par Pv47 issus de quatre vignes résistantes (*V. cordifolia, V lincecumii, V. riparia, V. rupestris*), une vigne sensible (*V. vinifera* cv. Syrah) et des vignes issues de populations de ségregation où des individus résistants sont porteurs de *Rpv1*, *Rpv2* et *Rpv3* **(Figure 69).** Les niveaux de résistance et de sensibilité des disques exprimant 47Δsp sont très proches de la condition contrôle GUS. Dans ces conditions expérimentales, Pv47 seul ne semble pas perturber la sporulation de *P. viticola*. Comme pour Pv44, il faut considérer que seulement des ilots cellulaires expriment le transgène. Un faible niveau de transformation ne permet pas d'évaluer convenablement l'effet de Pv47 sur l'infection de *P. viticola*. Des tests phytopatologiques ont donc été réalisés sur *N. benthamiana,* facile à transformer transitoirement, pour la suite de l'étude.

Effet de l'expression de Pv47 sur l'infection par *Phytophthora parasitica*

Le premier test phytopathologique a été réalisé avec l'oomycète hémibiotrophe *P. parasitica*. Le test a été effectué trois fois sur des lots différents de plantes. Pour les deux premiers réplicats, les spores de l'agent pathogène ont été infiltrées sur la totalité de la feuille qui exprimait transitoirement GUS ou 47Δsp. Les symptômes d'infection ont été identiques entre les conditions GUS et 47Δsp.

Pour la troisième et dernière expérimentation, les spores de l'agent pathogène ont été infiltrées sur une petite aire et son expansion dans le reste du tissu foliaire a été mesurée **(Figure 70)**. L'aire d'infection observée de *P. parasitica* diminue de 27 % en présence de 47Δsp (pvalue = 6.78e-05). Pv47 semble donc ralentir la propagation de l'agent pathogène.



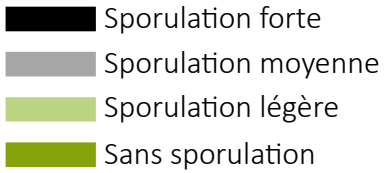


Figure 69 : L'expression transitoire de Pv47 ne semble pas perturber l'infection de *P. viticola*.
Des disques de vigne sont transformés transitoirement par agroinfiltration des constructions 47Δsp et GUS, puis inoculés 48 hpa par une suspension de sporanges de *P. viticola* à 2.10^5 sp/ml. **(A)** A 6 jpi les disques sont photographiés et les symptômes sont estimés visuellement selon quatre niveaux : non sporulant (vert foncé), sporulation légère (vert clair), sporulation moyenne (gris), sporulation forte (noir). **(B) Les proportions de chaque symptôme par condition sont représentées sous forme d'histogramme.** 8 disques issus de plantes différentes ont été utilisés par construction.

Effet de l'expression de Pv47 sur l'infection par le virus X de la pomme de terre (PVX)

L'effet de 47Δsp en présence du virus X de la pomme de terre (PVX) a été étudié chez *N. benthamiana*. Une version tagguée GFP du virus a été inoculée par agroinfiltration sur deux feuilles par plante exprimant transitoirement 47Δsp ou GUS comme contrôle **(Figure 71)**. L'expansion du virus a été observée et photographiée sous lumière UV à 10 jpa. Très peu de signal GFP a pu être observé sur les feuilles exprimant 47Δsp par rapport aux feuilles contrôles GUS. La propagation du virus dans le reste de la plante est également très faible voire inexistante chez les plantes infiltrées avec 47Δsp. Il semblerait que la présence de Pv47 limite fortement l'infection du virus dans la feuille inoculée (dite feuille source).

Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations : la première serait que l'effecteur Pv47 limite la réplication du virus ou sa propagation cellulaire ; la seconde serait que l'effecteur n'inhibe pas le virus directement mais le vecteur *A. tumefaciens* utilisé. Pour le vérifier, l'expérimentation a été réitérée en inoculant le virus sans avoir recours au vecteur *A. tumefaciens* : l'inoculation a été faite manuellement par frottement de broyat de tissu infecté **(Figure 72)**. Dix jours après l'inoculation manuelle, la propagation du virus est la même en condition 47Δsp que pour le contrôle. Il semblerait donc que l'effecteur Pv47 de *P.viticola* inhibe la transformation par *A. tumefaciens* dans les conditions de cette expérience, mais cette hypothèse nécessite une quantification plus fine.

Effet de l'expression de Pv47 sur l'infection par *Pseudomonas syringae*

Pour étudier l'effet de Pv47 sur une infection bactérienne, j'ai choisi *P. syringae,* une bactérie modèle de l'interaction plante-agent pathogène. La souche DC3000 a été inoculée par infiltration sur des feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées avec 47Δsp ou GUS **(Figure 73)**. Lorsque la bactérie est inoculée sur feuilles non infiltrées ou infiltrées par le contrôle GUS, elle conduit à un jaunissement des feuilles. En présence de 47Δsp les nécroses tissulaires sont systématiquement observées sur les 12 feuilles testées et semblent accentuées par rapport à la variabilité habituelle de l'effecteur sur *N. benthamiana*. La présence conjointe de Pv47 et *P. syringae* semble augmenter la réponse de défense chez la plante.

Effet de l'expression de Pv47 sur l'infection par *Botrytis cinerea*

Le dernier test phytopathologique mis en place sur *N. benthamiana* implique le champignon nécrotrophe *B. cinerea*. L'expérimentation a été réalisée sur deux périodes différentes : une en 2017 entre Juillet et Octobre et la seconde entre Février et Juin 2018. Comme pour les autres pathosystèmes, *B. cinerea* a été inoculé sur des feuilles agroinfiltrées au préalable par 47Δsp ou GUS **(Figure 74)**.

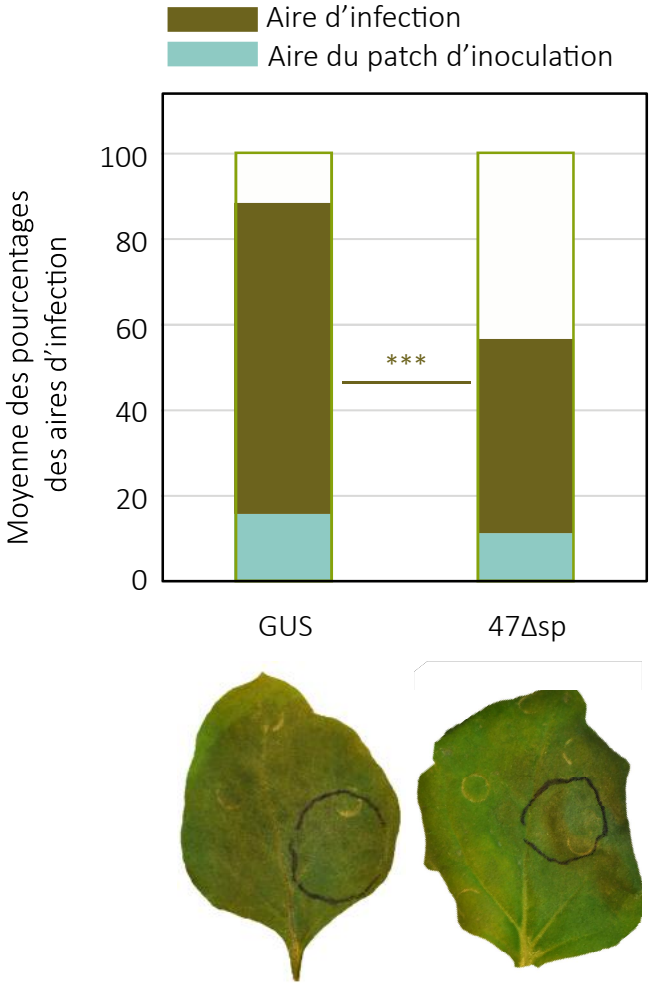


Figure 70 : Pv47 réduit l'infection de *P. parasitica*. *N. benthamiana* a été infiltré par 50 µL de spores de *P. parasitica* à une concentration de 1 sp/ml, deux jours après agroinfiltration avec des constructions permettant l'expression de 47Δsp ou GUS (n=14). Les symptômes ont été pris en photographie à 5 jours après inoculation. La surface des feuilles, l'aire d'infection et l'aire du patch d'inoculation des spores de *P. parasitica* ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ. La moyenne des ratios des aires d'infection sur la surface totale de la feuille est représentée sous forme d'histogramme. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Wilcoxon-Mann & Whitney. La triple astérisque indique les différences significatives (pvalue ≤ 0.001).

Les résultats des expériences faites sur la première période montrent que l'aire d'infection de *B. cinerea* est clairement rétrécie (diminution entre 40 et 92 %), voire inexistante, sur les tissus qui expriment 47Δsp **(Figure 74, A)**. Par ailleurs, un phénotype de macération apparait autour du site d'infection et peut s'étendre sur le tissu qui exprime l'effecteur.

Les résultats obtenus sur la seconde période ne sont pas si marqués. La réduction de l'aire d'infection de *B. cinerea* n'est plus aussi forte et les réplicats n'ont pas permis de reproduire ce résultat de façon satisfaisante **(Figure 74, B et C)**. De plus, le phénotype de macération n'a pas été observé lors de cette seconde expérimentation. Dans quelques cas (42%), elle a été remplacée par une forte nécrose induite par 47Δsp associée à une réduction concomitante de l'aire d'infection **(Figure 74, C)**. Cependant, malgré la différence phénotypique observée entre les deux réplicats biologiques, la réduction de la virulence est toujours visible et statistiquement significative. La variabilité observée peut être due à un changement des conditions de culture en serre ou une variabilité saisonnière de la photopériode.

Pour comprendre la nature du phénotype de macération, deux approches ont été utilisées pour suivre le développement de *B. cinerea* : une coloration au bleu Trypan et l'utilisation d'une souche de *B. cinerea* fluorescente **(Figure 75)**. Pour éviter la confusion entre la fluorescence GFP et l'autofluorescence des tissus végétaux résultant d'une mort cellulaire, l'autofluorescence a été observée dans le rouge pour ainsi délimiter la fluorescence spécifique de *B. cinerea* marqué GFP. Le bleu Trypan est un colorant connu pour marquer les hyphes des champignons ainsi que les cellules mortes.

La souche fluorescente de *B. cinerea* s'est révélée difficile à observer au sein des tissus de la plante. Il a cependant été possible de distinguer trois zones autour du point d'infection : une zone Z1 qui correspond au tissu sain, une zone Z2 qui fluoresce dans le vert et le rouge et qui correspond au phénotype de macération, et enfin une zone Z3 qui correspond aux tissus infectés par *B. cinerea* et qui fluoresce uniquement dans le vert. **(Figure 75, B)**.

L'utilisation du bleu Trypan a permis d'identifier deux zones de coloration **(Figure 75, D et E)**. La première au centre sur les sites d'infection où seuls les hyphes ont été colorées, et qui correspondrait à la zone Z3 ci-dessus, et une seconde sur le contour qui correspond au phénotype de macération étudié (Z2 ci-dessus). Elle est visible à la fois sur les tissus qui expriment 47Δsp mais également sur ceux qui expriment GUS, mais la taille de la tâche est plus limitée sur ces derniers.

Au vu des résultats d'autofluorescence et des colorations il semblerait que ce phénotype de macération se caractérise par un effondrement tissulaire. Il a été montré que *B. cinerea* secrète des inducteurs de programme de mort cellulaire, comme le botrydial et l'acide botcinique, dans les tissus avant que ses hyphes ne s'y développent **(Dalmais et al., 2011)**. Pour vérifier l'origine fongique de

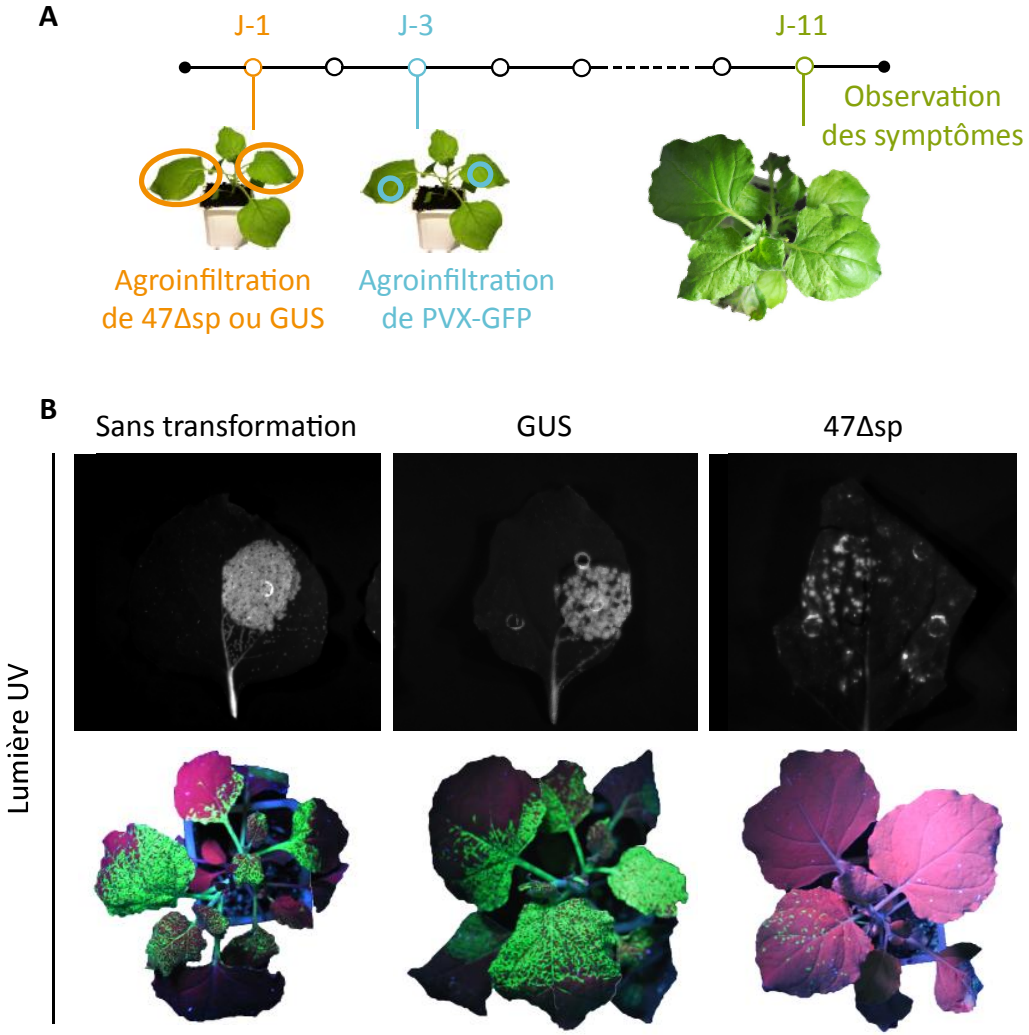


Figure 71 : L'expression de 47Δsp inhibe l'infection de PVX inoculé par agroinfiltration. (A) Agroinfiltration de l'effecteur candidat Pv47, sans son peptide signal (47Δsp) sur deux feuilles entières de *N. benthamiana* suivie de l'agroinfiltration d'un patch de PVX-GFP à 2jpa. L'agroinfiltration de GUS à la place de 47Δsp a été utilisée comme contrôle négatif. **(B)** Les feuilles agroinfiltrées et les plantes entières ont été photographiées sous lumière UV. Le test a été réalisé sur 4 plantes par condition.

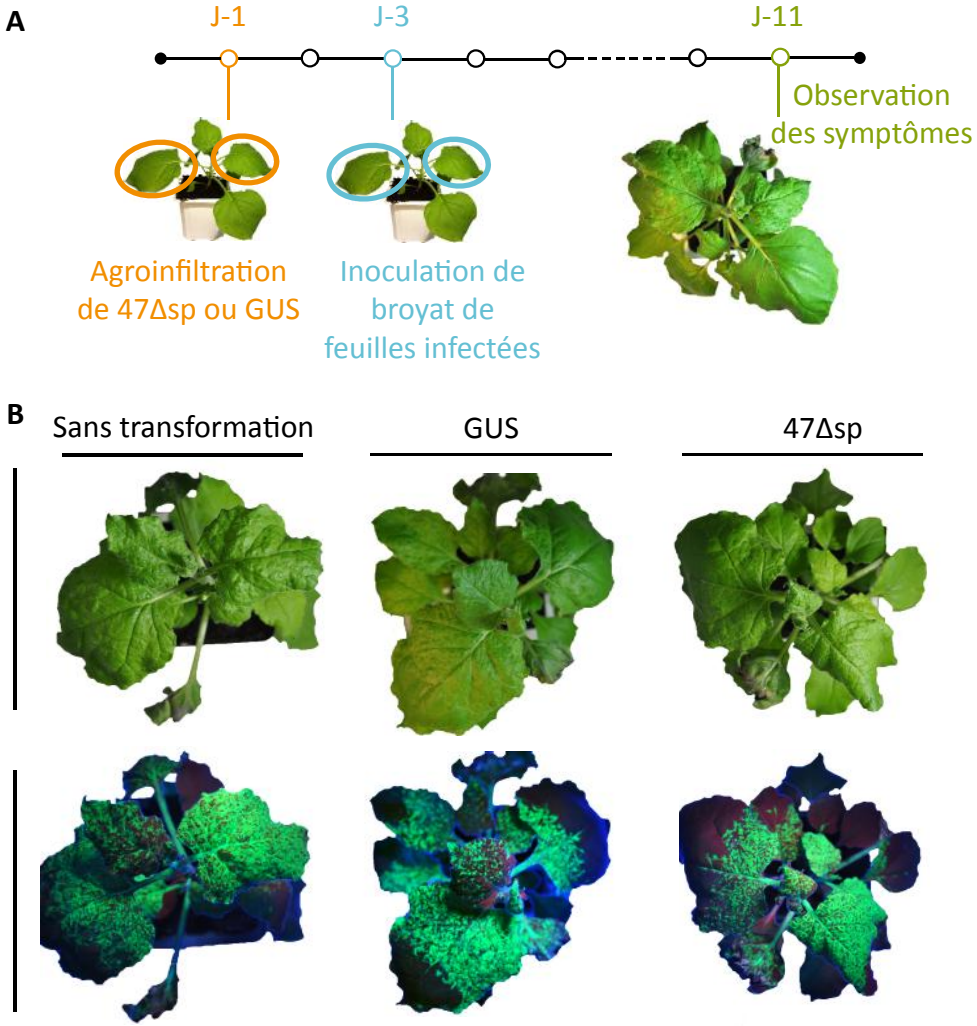


Figure 72 : L'expression de 47Δsp n'inhibe pas l'infection de PVX inoculé mécaniquement. (A) Agroinfiltration de l'effecteur candidat Pv47, sans son peptide signal (47Δsp) sur deux feuilles entières de N. benthamiana suivie à 2 jpa de l'inoculation de broyat de *N. benthamiana* infecté par PVX-GFP. L'agroinfiltration de GUS à la place de 47Δsp a été utilisée comme contrôle négatif. **(B)** Les plantes entières ont été photographiées sous lumière blanche et sous UV. Le test a été réalisé sur 6 plantes par condition.

cette mort cellulaire, les mêmes tests d'infection ont été réalisés avec des souches mutées pour certains de ces facteurs de mort cellulaire **(Figure 76)**. La souche *bot2*Δ ne produit plus de botrydial suite à l'inactivation du gène qui code pour la sesquiterpene cyclase 1 **(Pinedo et al., 2008)**. Le double mutant *bot2*Δ *boa6*Δ ne produit ni botrytidal ni acide botcinique suite à l'inactivation du gène *polyketide synthase 6* **(Massaroli et al., 2013)**. Les mutations *boa6*Δ (aussi appelé *pks6-4*) ou *bot2*Δ (aussi appelé *stc1-1.1.1*) n'ont pas d'effet sur la virulence de *B. cinerea*, mais le double mutant présente en revanche une réduction de virulence (**Dalmais et al., 2011)**.

L'utilisation de ces mutants n'a pas comme objectif d'étudier l'effet de Pv47 sur leur développement, mais de vérifier l'impact des mutants sur l'apparition de la tâche. Malheureusement chacune des expérimentations a été réalisée dans la seconde période décrite précédemment, durant laquelle l'apparition du phénotype de macération était moins consistante, voire absente. En effet, lors de l'infection avec les mutants le phénotype était parfois visible, mais rare et généralement remplacé par des nécroses, phénotype observé aussi avec la souche sauvage. Concernant l'infection, aucune répétabilité n'a pu être mesurée entre chaque réplicat comme pour la souche de *B. cinerea* sauvage, mais un effet de Pv47 sur l'infection par le mutant simple a été observé sur une des répétitions. Il est nécessaire d'identifier la source des variabilités des infiltrations et/ou des infections de *B. cinerea* avant de réitérer des tests avec les mutants et de clôturer cette piste.

Pour conclure, la présence de Pv47 réduit la sensibilité à *B. cinerea* et une nécrose particulière est observée autour du site d'inoculation lorsqu'il y a inhibition du développement du champignon.

Figure 73 : Pv47 augmente les symptômes induits par *P. syringae* DC3000.
N. benthamiana a été infiltré par la souche virulente *P. siringea* DC3000 à une concentration de 2.5 10^5 cfu/ml (5.40 log (cfu/ml)) sur deux feuilles, 48h après agroinfiltration des constructions permettant l'expression transitoire de 47Δsp ou de GUS (6 plantes par condition). Les feuilles inoculées ont été prises en photographie 72h après inoculation de *P. syringea* et sont représentatives des symptômes obtenus.

2. Discussion

L'étude de Pv47 a permis de caractériser un second effecteur de la famille WY-domain de *P. viticola* qui ne porte pas le motif RXLR. Beaucoup de résultats présentés ici sont préliminaires et doivent être confirmés à l'aide d'un second réplicat biologique. Cependant la concordance des résultats issus de différentes expérimentations, nous permet de discuter ces données préliminaires.

Une réponse différente entre les modèles végétaux

Les expérimentations ont montré que Pv47 perturbe les réponses de défense de *N. benthamiana*, son métabolisme et l'organisation intracellulaire. En revanche, et contrairement aux résultats obtenus avec Pv33 dont l'expression a conduit au déclenchement de réponses visibles chez la vigne, nous n'avons observé aucun symptôme chez la vigne. L'absence de résultat avec les techniques de transformation utilisées pour exprimer Pv47 ne signifie pas nécessairement qu'il n'a aucun impact sur les membres de la famille des Vitaceae, hôtes et non hôtes. En effet, il se peut que l'expression de Pv47 n'atteigne pas le seuil d'expression nécessaire pour déclencher des réponses. Des méthodes de transformation stable permettraient de valider son effet et peut-être de transposer les données obtenues sur *N. benthamiana* au cours de cette thèse.

La différence du niveau de réponse de *N. benthamiana* et *N. tabacum* à Pv47 laisse penser à une implication d'acteurs moléculaires différents dans les deux organismes. *N. tabacum* répond par une mort cellulaire rapide et franche, *N. benthamiana* de son côté induit, dans les cas les plus extrêmes, des nécroses visibles uniquement sur quelques ilots. Des expériences de recherche de callose et de ROS chez *N. benthamiana* ont été réalisées afin d'observer une réponse plus uniforme sur les tissus transformés, mais elles n'ont pas été concluantes. Tout comme la mort cellulaire, le dépôt de callose a également été observé uniquement sur des ilots cellulaires. Une cinétique plus tardive permettrait peut-être d'augmenter le nombre de cellules impliquées dans cette réponse. Concernant la production de ROS, ils sont bien détectés sur la totalité du disque, mais il s'agit de signaux sécrétés qui peuvent diffuser dans les tissus, ce qui rend difficile de tirer une conclusion.

Ce n'est pas la première fois qu'apparait une différence d'intensité de réponse entre *N. benthamiana* et *N. tabacum.* Lorsque les effecteurs bacteriens XopQ et HopQ1, respectivement de *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae* sont exprimés chez *N. tabacum*, ils induisent une forte mort cellulaire. Par contre, si ces effecteurs sont exprimés chez *N. benthamiana* aucune mort cellulaire ne se déclenche ; à la place, une chlorose est nettement visible qui s'accompagne par une résistance à une infection postérieure par des bactéries. Ces réponses végétales semblent dépendre d'une reconnaissance par un récepteur de type TIR-NBS-LRR **(Adlung and Bonas, 2017)**. Une différence

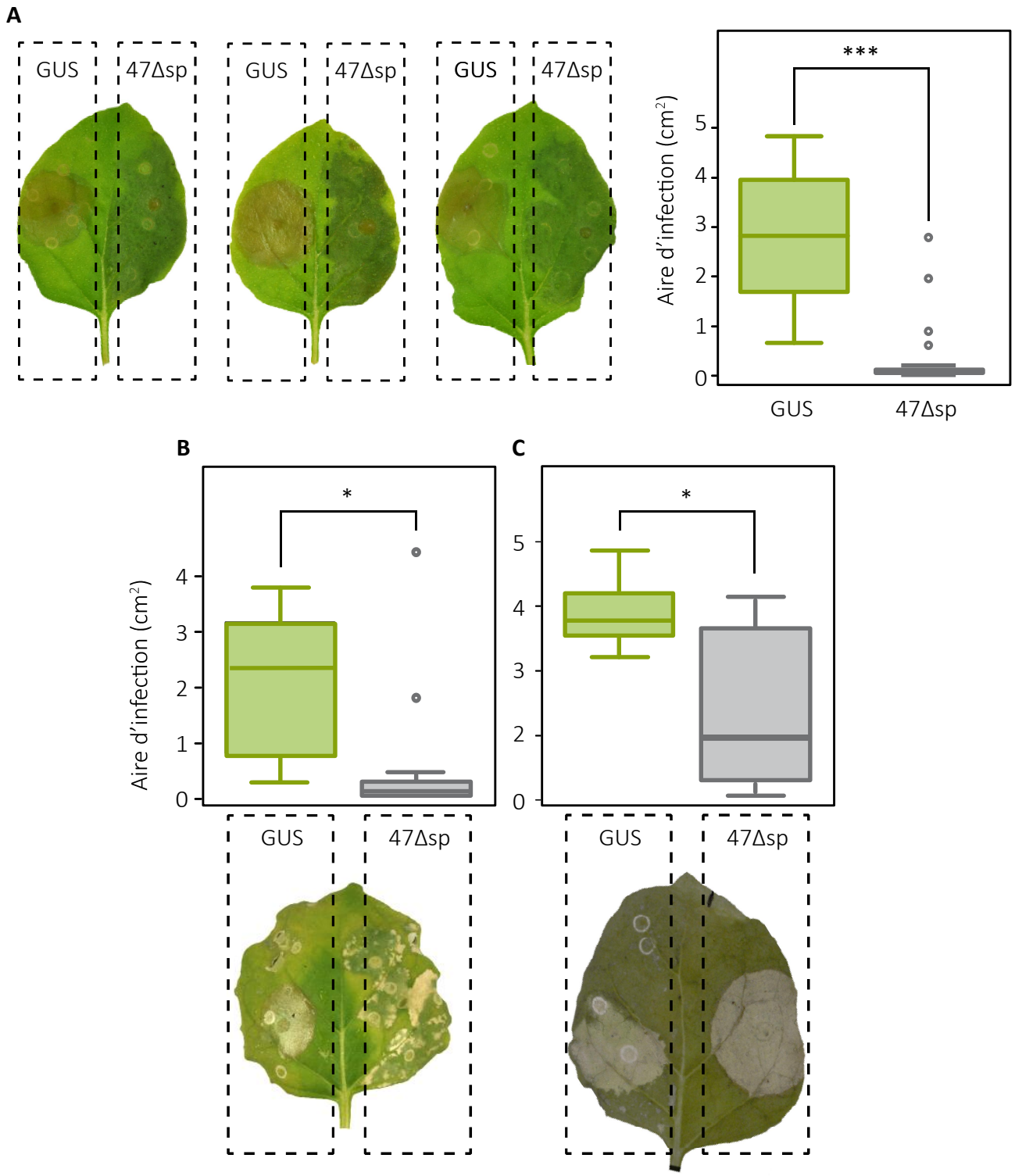


Figure 74 : Évaluation de la sensibilité à *Botrytis cinerea* de *N. benthamiana* après expression de Pv47 sur deux périodes différentes. Les feuilles de *N. benthamiana* sont agroinfiltrées d'une construction permettant l'expression transitoire de GUS sur la partie gauche des feuilles et de 47Δsp sur la partie droite. 2 jours après l'agroinfiltration, 5µL de spores de *B. cinerea* à 5.10^5 sp/ml sont déposés sur chaque côté de la feuille détachée. Les symptômes d'infection représentatifs ont été photographiés et l'aire de lésion causée par *B. cinerea* mesurée à 4 jpi. **(A)** Les expérimentations ont été réalisées trois fois sur une première période (de fin juillet à début octobre 2017). Un test T de Student non-apparié a permis de vérifier la répétabilité entre réplicats. La différence entre les conditions GUS et 47Δsp a été testée sur l'ensemble des données des trois réplicats (n1 = 11, n2 = 4, n3 = 11). La différence significative, basée sur un test-t de Student apparié, est réprésentée par trois astérisques ($P \leq 0.001$). **(B à C)** Les expérimentations ont été réalisées deux fois sur une deuxième période (de fin-février à mi-juin 2018). La non-répétabilité a été démontrée par un test T de Student non-apparié entre le premier n1 = 13 **(B)** et le second n2 = 6 **(C)**. Les différences significatives, basées sur un test T de Student apparié et une ANOVA, sont représentées par un astérisque (pvalue ≤ 0.05).

de réponse entre *N. benthamiana* et *N. tabacum* impliquant aussi un gène de type NBS-LRR a également été observé avec le couple R/Avr N/P50, originaire du virus de la mosaïque du tabac (TMV) et de son hôte, le tabac. L'expression du couple induit des nécroses uniquement chez *N. tabacum*. Chez *N. benthamiana* l'induction des défenses permet cependant de bloquer l'infection par le TMV **(Mestre and Baulcombe, 2006)**. L'ensemble de ces résultats montre que l'induction de mort cellulaire chez *N. benthamiana* peut être plus modérée que chez *N. tabacum*.

Pv47 : un gène d'avirulence ?

Différents phénomènes ont été observés suite à l'expression transitoire de Pv47 : induction de mort cellulaire chez *N. tabacum* et nécrose associée à la production de phytoalexines chez *N. benthamiana* ; production de ROS et dépôts de callose ; inhibition du developpement de *P. parasitica* hémibiotrophe, *B. cinerea* nécrotrophe et *A. tumefaciens*. Tous ces résultats suggèrent que Pv47 est une protéine de *P. viticola* qui induit une réponse immunitaire chez *N. benthamiana*. Une possibilité pour expliquer ce phénotype serait que Pv47 est détecté par le système de surveillance de la cellule végétale. Cette hypothèse se voit renforcée par l'identification parmi les candidats de l'immunoprécipitation d'un récepteur de la famille des CC-NB-LRR. La réalisation de co-IP et de tests d'invalidation du gène sont encore nécessaires pour conclure à l'identification d'un nouveau couple de gènes R-Avr.

L'identification d'un couple de gènes R-Avr appartenant à des organismes qui ne forment pas un couple hôte/agent pathogène parait étrange, mais pourrait s'expliquer par la présence de gènes proches de Pv47 chez des oomycètes qui infectent *N. benthamiana*. C'est pourquoi des séquences similaires à Pv47 ont été recherchées dans le protéome des trois oomycètes les plus proches de *P. viticola* et qui sont capables d'infecter *N. benthamiana* : *P. nicotianae*, *P. parasitica et P. infestans* ***(*McCarthy and Fitzpatrick, 2017).** L'alignement des séquences des premières occurrences obtenues par BLASTp permet de visualiser des similitudes entre les séquences et principalement au niveau du domaine C-terminal **(Figure 77)**. Cette similitude pourrait être suffisante pour activer le même type de réponses chez les Nicotianeae et maintenir la localisation au RE. Des recepteurs de type Coil-coil similaires pourraient se retrouver chez les Nicotianeae et les vignes. Le clonage et l'expression transitoire de ces effecteurs similaires à Pv47 permettraient de répondre à ces questions.

Au cours de la thèse, j'ai tenté d'exploiter la mort cellulaire nette provoquée par Pv47 sur *N. tabacum* pour vérifier si elle est dépendante de EDS1 et SGT1. EDS1 intervient dans les HR médiés par les récepteurs NB-LRR de type TIR chez les Nicotianeae. La technique du VIGS n'était pas décrite au départ comme efficace sur *N. tabacum*, cependant des rapports ont montré son efficacité sur le cultivar Petit Havana **(Xu et al., 2007; Zhang and Thomma, 2014)**. Les tests VIGS réalisés au laboratoire

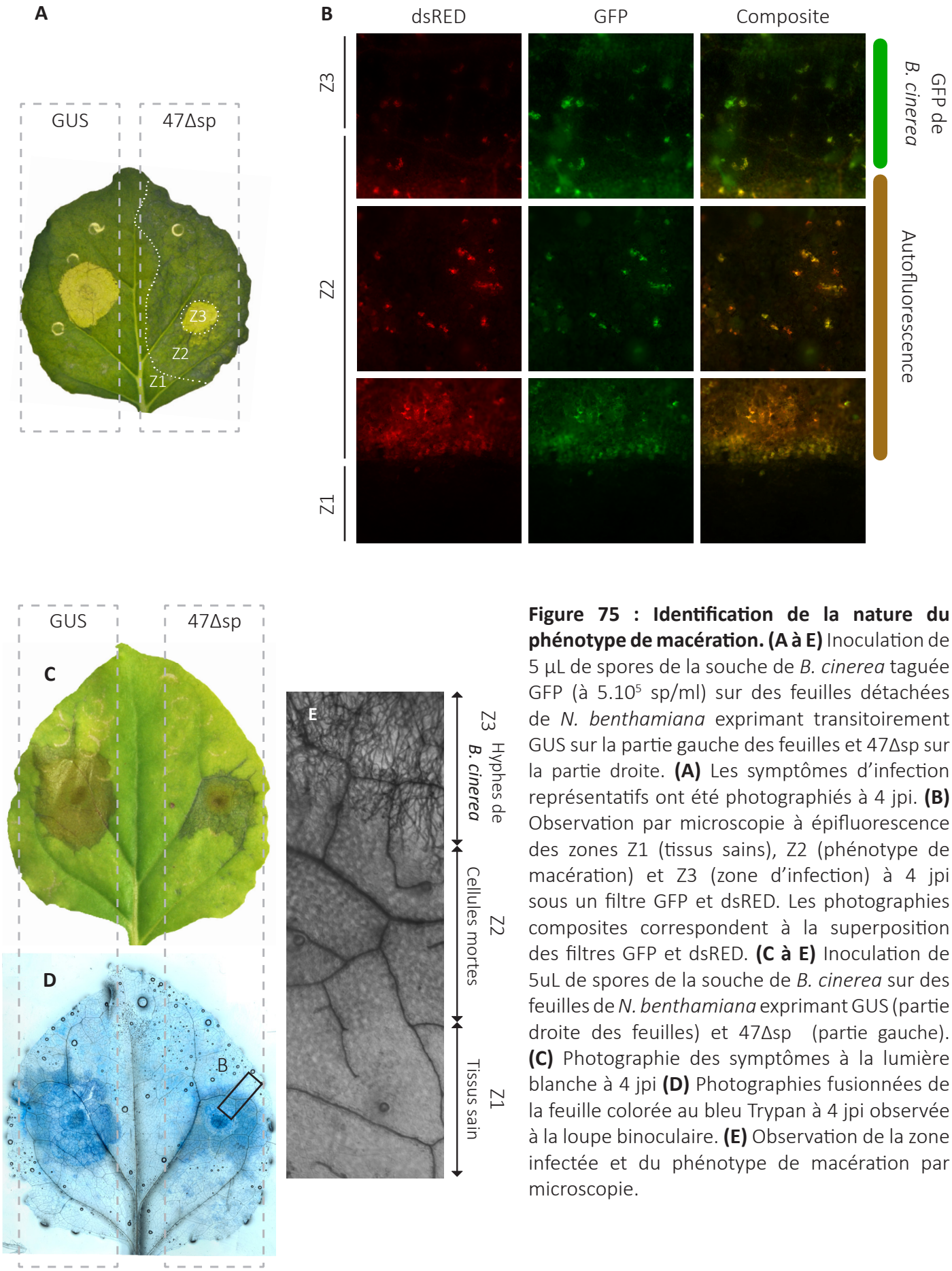


Figure 75 : Identification de la nature du phénotype de macération. (A à E) Inoculation de 5 µL de spores de la souche de *B. cinerea* taguée GFP (à 5.10^5 sp/ml) sur des feuilles détachées de *N. benthamiana* exprimant transitoirement GUS sur la partie gauche des feuilles et 47Δsp sur la partie droite. **(A)** Les symptômes d'infection représentatifs ont été photographiés à 4 jpi. **(B)** Observation par microscopie à épifluorescence des zones Z1 (tissus sains), Z2 (phénotype de macération) et Z3 (zone d'infection) à 4 jpi sous un filtre GFP et dsRED. Les photographies composites correspondent à la superposition des filtres GFP et dsRED. **(C à E)** Inoculation de 5uL de spores de la souche de *B. cinerea* sur des feuilles de *N. benthamiana* exprimant GUS (partie droite des feuilles) et 47Δsp (partie gauche). **(C)** Photographie des symptômes à la lumière blanche à 4 jpi **(D)** Photographies fusionnées de la feuille colorée au bleu Trypan à 4 jpi observée à la loupe binoculaire. **(E)** Observation de la zone infectée et du phénotype de macération par microscopie.

ont montré que l'infection avec les clones viraux dont nous disposions avait un effet dramatique pour *N. tabacum* cv. Petit Havana (résultat non présenté). Toutefois les effets de Pv47 sur *N. benthamiana* sont suffisamment détectable pour utiliser le VIGS pour étudier la dépendance de la réponse sur différents gènes. Un suivi de la quantité d'*A. tumefaciens* pourrait également être réalisé, comme il a été fait pour l'étude de l'effecteur bactérien XopQ **(Adlung and Bonas, 2017)**.

Toutes ces observations, en particulier les différences de réponse observées entre *N. tabacum* et *N. benthamiana* qu'on trouve souvent dans des couples R/Avr, font penser que Pv47 est reconnu par le système de surveillance de la plante. Alternativement, les réponses observées pourraient être le résultat des perturbations trop fortes au niveau du RE par l'effecteur. Ceci pourrait également expliquer la réduction de l'infection par des agents pathogènes biotrophes, hémibiotrophes ainsi que par l'agent pathogène nécrotrophe *B. cinerea* qui, dans les modalités d'inoculation utilisées, n'infectent pas les tissus déjà nécrosés. Il est essentiel de confirmer les interactions possibles de Pv47 avec R1A3 et SEC31 avant de tirer la moindre conclusion sur son rôle. De plus, pour vérifier le possible découplage ou lien entre l'effet de Pv47 sur le RE et les réponses de la plante, il est possible de réaliser des tests de délétions successives. Ces tests de délétions successives consistent à cloner des versions tronquées de Pv47 et les exprimer chez *N. benthamiana*. Si une délétion de séquence permet de délocaliser l'effecteur et de voir simultanément disparaitre les défenses végétales, un lien pourra être établi.

Pv47 et INF1 induisent potentiellement des voies de signalisation similaires

Pour évaluer le rôlé de Pv47 dans la suppression de la mort cellulaire, celui-ci a été co-exprimé avec différents inducteurs de mort cellulaire. Des résultats différents ont été obtenus selon la nature de l'inducteur utilisé, ce qui illustre l'existence de différentes voies de signalisation dans la mise en place des PCD.

Bax est un membre de la famille des protéines de Bcl-2. Son expression est connue pour induire une mort cellulaire en partie dépendante du stress du RE, la production de ROS et de gènes liés à la pathogénèse **(Jing et al., 2016; Lacomme and Cruz, 1999).** Sa localisation aux mitochondries, RE, Golgi et noyau perméabilise les membranes, et son effet est considéré comme un point de non-retour de l'apoptose (**Popgeorgiev et al., 2018)**. Il s'agit d'un inducteur très fort qui donne une réponse systématique. La mort cellulaire induite par Bax n'a pas été perturbée par la présence de Pv47.

INF1 est une protéine extracellulaire de *P. infestans* élicitrice de mort cellulaire **(Kamoun, 1993)** dont la fonction est le piégeage de lipides. INF1 est reconnue comme un PAMP par le récepteur ELR **(Du et al., 2015b)** activant un signal de mort cellulaire dépendante des acteurs caractérisés BAK1, SOBIR, SGT1, HSP90 et HSP70 **(Kanneganti et al., 2006; Kanzaki et al., 2003; Domazakis et al; 2018)**.

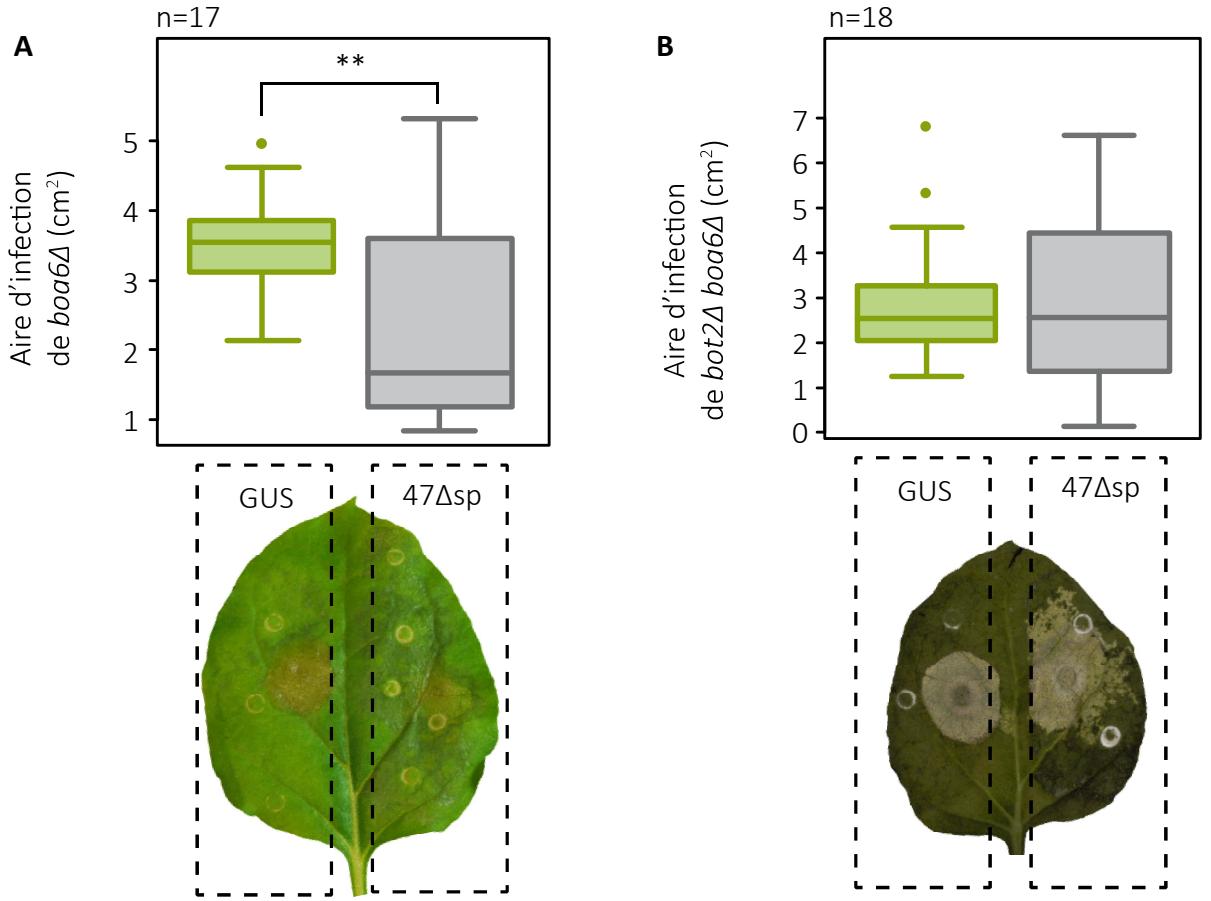


Figure 76 : Évaluation de la sensibilité à *Botrytis cinerea bot2Δ* et *boa6Δ* après expression de Pv47. Les feuilles *N. benthamiana* sont agroinfiltrées avec les constructions permettant l'expression transitoire de GUS sur la partie gauche des feuilles et de 47Δsp sur la partie droite. 2 jours après l'agroinfiltration, 5µL de spores de *B. cinerea* à 5.10^5 sp/ml sont déposés sur chaque côté de la feuille détachée. Les symptômes d'infection représentatifs ont été photographiés et l'aire de lésion causée par B. *cinerea* mesurée à 4 jpi, **(A)** pour la souche *boa6Δ* et **(B)** le double mutant *bot2Δboa6Δ*. La différence significative des données, basée sur un test T de Student apparié, est représentée par deux astérisques (pvalue ≤ 0.01).

En cas d'agroinfiltration séquentielle, INF1 induit une mort cellulaire qui n'est pas toujours très franche sur *N. benthamiana*. En présence de Pv47, la mort est nettement renforcée. L'hypothèse que la mort cellulaire induite par Pv47 et INF1 emprunte la même voie de signalisation expliquerait cette augmentation. C'est un phénomène qui a déjà été observé en co-exprimant INF1 avec PiNPP1 et PsojNIP, des NLP de *P. infestans* et *P. sojae* **(Kanneganti et al., 2006)**. Kanneganti montre que NPP1 de *P. infestans* et INF1 n'empruntent pas les mêmes voies de signalisation mais que celles-ci sont synergiques. Par ailleurs, il a été remarqué chez *A. thaliana* que le récepteur extracellulaire FLS2, qui détecte la flagelline (flg22), et le récepteur intracellulaire RPS2, qui détecte l'effecteur bactérien Avrpt2, activaient un même acteur de la défense végétale, RBOHD. Cette protéine produit les ROS nécessaires à l'activation de la résistance. L'activation de RBOHD semble dépendre de cascades de kinase différentes selon qu'il s'agit d'une activation de RPS2 ou de FLS2; il s'agirait d'un point de convergence entre deux voies de signalisation **(Kadota et al., 2018)**. Dans la littérature il est parfois décrit que l'ETI induit des réponses similaires à la PTI mais plus fortes et plus longues. Pv47, un effecteur potentiel de *P. viticola* reconnu par un récepteur intracellulaire, pourrait donc renforcer les voies communes activées par le PAMP INF1, reconnu par un récepteur extracellulaire. Une théorie qui ne peut être validé qu'en comparant les acteurs des deux voies.

L'augmentation de l'intensité de la réponse induite par INF1 due à la présence de Pv47 contraste avec l'absence de transformation observée avec Agrobacterium contenant PVX-GFP **(Figure 62)**. En effet *A. tumefaciens,* bien qu'aujourd'hui largement utilisé comme un outil de biotechnologie, reste un agent pathogène ciblé par les réactions de défense de la plante. Ainsi, il a été remarqué que la présence des effecteurs avirulents XopQ/HopQ déclenche une réponse immune chez la plante, inhibant la multiplication *de A. tumefaciens* et atténuant le niveau d'expression des protéines **(Adlung and Bonas, 2017)**. Ces effecteurs et Pv47 semblent activer le même type de réponses de défense. Ce phénomène pourrait expliquer l'absence de transformation observée avec Agrobacterium contenant PVX-GFP ; pourtant, les symptômes d'INF1 et de BAX n'ont pas été limités alors que leur expression dépend d'*A. tumefaciens*. En réalité, pour chacune des expérimentations, *A. tumefaciens* n'a pas été infiltrée à la même concentration. Pour mimer une infection virale réelle, la quantité de bactérie porteuse de PVX-GFP inoculée est extrêmement faible (DO=10^{-4}) alors que INF1 et Bax sont agroinfiltrés à DO = 0.2 La réponse à Pv47 suffirait donc pour bloquer une quantité faible de bactérie mais une fois passé un seuil, les défenses ne semblent être plus efficaces

A

Protéome	Couverture sur Pv47	E-value	Identité
P. infestans	100 %	$2e^{-21}$	25%
P. nicotianae	99%	$5e^{-32}$	35%
P. parasitica	99%	$4e^{-32}$	31%

B

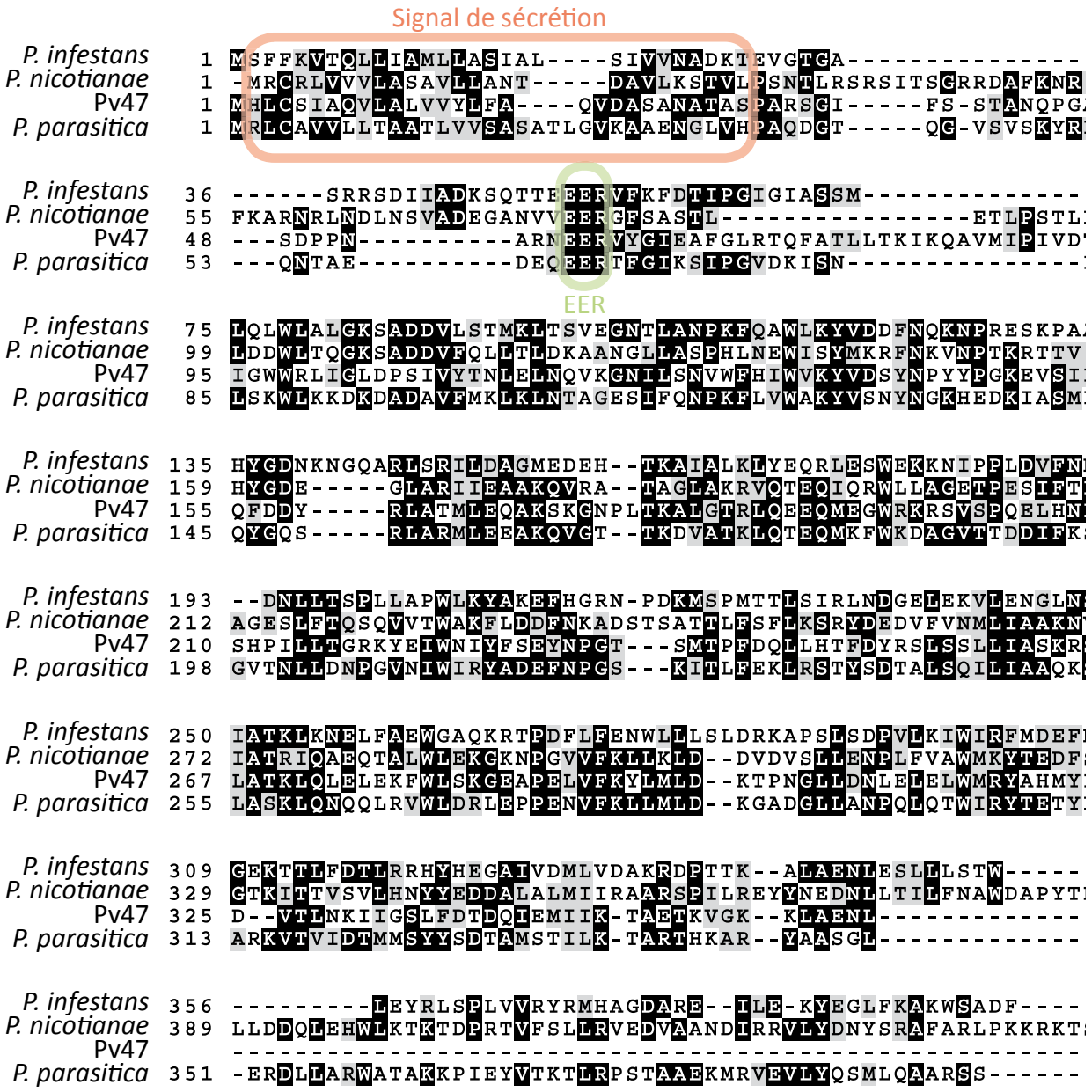


Figure 77 : Recherche de séquences protéiques similaires à Pv47 dans le protéome de trois oomycètes proches. (A) Score obtenu pour les premières occurences du BLASTp de Pv47 sur le protéome de *P. infestans*, de *P. nicotianae* et *P. parasitica*. **(B)** Aligment des séquences de Pv47 et des premieres occurences réalisé par ClustalW et réprésenté par BOXShade. En saumon: le peptide signal; en vert : l'EER.

L'analyse métabolique révèle un impact de Pv47 sur la production de phytoalexine

Le suivi du métabolome en condition d'infection par LC-MS est une approche quantitative qui fait l'objet d'importants développements au laboratoire de Métabolisme Secondaire de la Vigne (MSV) de l'INRA de Colmar. Sur la vigne, elle permet notamment de quantifier la biomasse du mildiou lui-même estimant la quantité de lipides spécifiques au pathogène et de suivre le déclenchement de défenses **(Negrel et al., 2018)**. La préparation des échantillons et la lecture des résultats sont simples et rapides par rapport à d'autres méthodes comme la RT-qPCR. La facilité d'augmentation de la quantité de répétitions en fait une approche statistiquement très intéressante.

L'utilisation de la LC-MS au cours de la thèse a permis de comparer le métabolome de *N. benthamiana* avec ou sans Pv47. Une accumulation de sesquiterpènes et de tryptophane deux à trois fois supérieure à la normale a été révélée. Les sesquiterpènes (C15) sont des phytoalexines majoritairement présentes en cas de stress biotique chez *N. benthamiana* et sont associées à la nécrose. La présence des phytoalexines de type terpène C15 marque donc l'effet de Pv47 comme éliciteur de défense végétale. Cependant c'est un résultat difficile à transposer directement sur la vigne ; en effet, cette plante réagit en majorité par la production de phytoalexines de type stilbène, comme le resvératrol **(Bavaresco and Fregoni, 2001; Jeandet et al., 2002; Schnee et al., 2008; Chong et al., 2009; Duan et al., 2015)**. Les sesquiterpènes (C15) sont des composés volatiles utilisés comme signal aérien. Il a été montré que leur production apportait une résistance de *N. benthamiana* au virus PVX **(Li et al., 2015a)** et que l'inhibition de gènes responsables de la synthèse de capsidiol, un sesquiterpène, augmente la virulence de *P. infestans (***Shibata et al., 2010)**. L'expérimentation réalisée dans le cadre de la thèse montre que la production de sesquiterpène induite par la présence de Pv47 ne semble pas être suffisante pour conduire à une résistance au PVX.

La suraccumulation de l'acide aminé tryptophane en présence de Pv47 donne des pistes potentielles de recherche sur le rôle éventuel de Pv47 comme facteur de virulence chez *P. viticola*. Le tryptophane se trouve à la base de la synthèse de différentes protéines antifongiques **(Consonni et al., 2010)**, la plus étudiée étant la camalexine. En effet, les mutants de *A. thaliana* pour le gène *pad3*, ainsi que le double mutant *syp79B2syp79B3*, ne sont plus capables de produire de camalexine et de glycosinolate d'indole nécessaires à la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes comme *B. cinera* (même si les résultats diffèrent en fonction de la souche) **(Schlaeppi et al., 2010)**. La forte accumulation de tryptophane pourrait donc être une clef pour mieux comprendre la résistance à *B. cinerea* induite par Pv47. Par ailleurs, l'accumulation de tryptophane en présence de Pv47 peut être doublement interprétée : elle peut être due soit à une surproduction de l'acide aminé par la plante soit à une inhibition de sa prise en charge pour la synthèse protéique. Pour le vérifier, la production de composés dérivés du tryptophane peut être suivie par analyse métabolique ciblée.

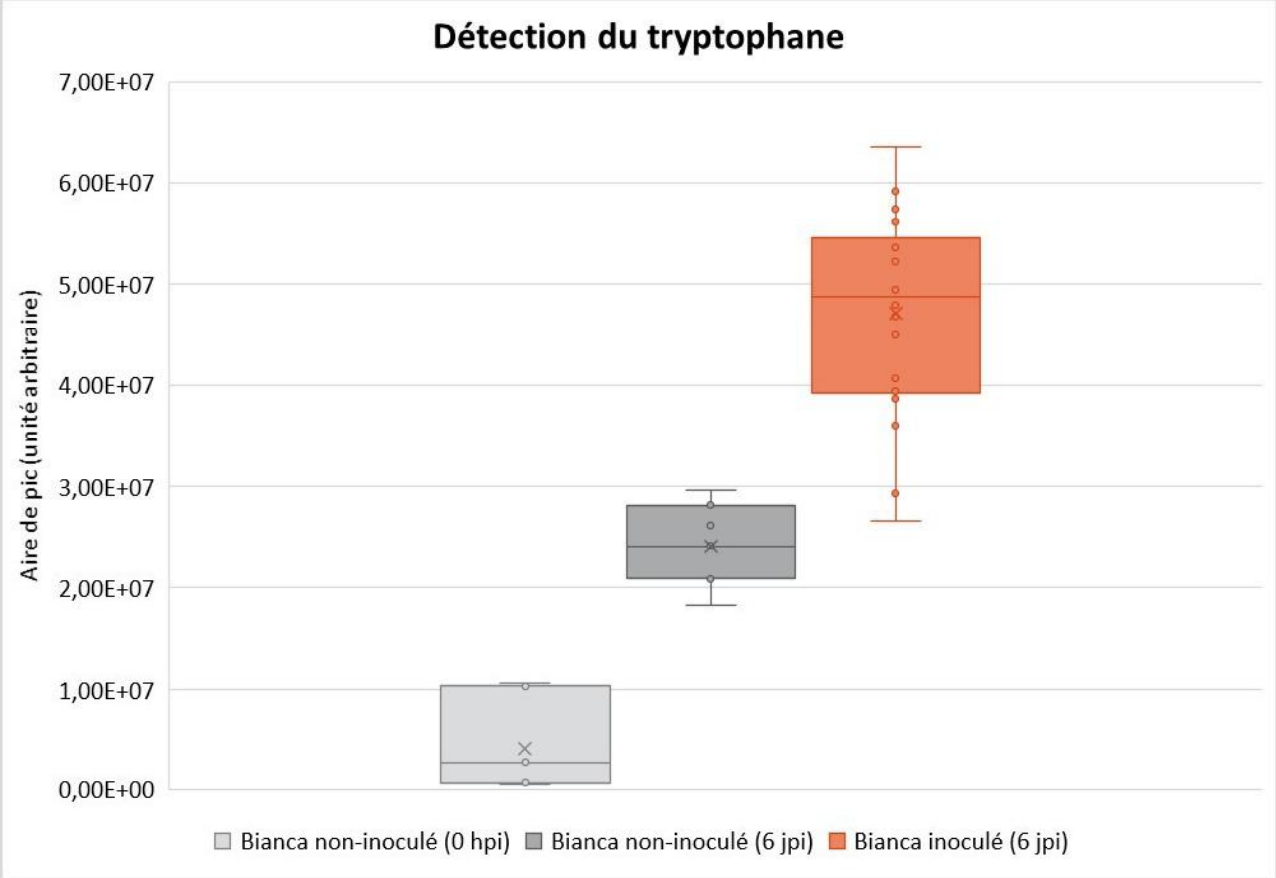


Figure 78 : Détection du tryptophane mesuré dans les extraits de feuilles de vigne «Bianca» infectées par du mildiou ou non infectées à 72 h. Les disques de *V. vinifera* cv. Bianca sont inoculés par des spores de *P. viticola* isolat Lednice. 72h après agroinfiltration les tissus sont récoltés, lyophilisés et broyés. Les métabolites sont extraits au méthanol. L'apigénine est ajoutée comme étalon interne. Les analyses métabolomiques sont réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). La séparation des métabolites est obtenue par chromatographie liquide sur une colonne à phase inverse (apolaire). Au niveau du spectromètre de masse, les molécules sont ionisées par une source à electronébulisation (ESI pour *ElectroSpray Inozation*) en mode positif. Toutes les données brutes sont analysées à l'aide du pack avec le script XCMS sous R. Les aires des pics correspondant au tryptophane présent dans les extraits sont mesurées avec le logiciel Xcalibur. Représentation de la quantité moyenne de tryptophane obtenue dans trois expérimentations indépendantes. Les intensités sont données en unités arbitraires. Crédit : Dr Lise Negrel.

Les observations sur le tryptophane sont prometteuses car c'est l'un des rares résultats obtenus sur *N. benthamiana* qui soit transposable sur vigne. En effet, des données non publiées du laboratoire montrent que le tryptophane est retrouvé en quantité importante chez la vigne infectée par *P. viticola* **(Figure 78)**. Ces analyses ont été réalisées sur le cultivar Bianca porteur du QTL de résistance *Rpv3*. La quantité de tryptophane est doublée suite à l'inoculation de la souche Lednice qui contourne *Rpv3*. La production de tryptophane augmente donc fortement au cours du développement du mildiou. S'agit-il d'un effet uniquement lié à la présence de l'effecteur Pv47 ? L'inoculation d'un isolat qui ne produit pas l'effecteur peut répondre à la question. Mais une redondance fonctionnelle des effecteurs existe chez les oomycètes et pourra empêcher la vérification.

Le suivi des hormones de *N. benthamiana* en présence de Pv47 a été initié au cours de la thèse. Cependant aucune différence hormonale n'a été observée par l'analyse ciblée vis-à-vis de la condition contrôle GFP. Deux précisions expliquent cette absence. Tout d'abord, la stratégie expérimentale n'aurait en réalité probablement pas permis de voir d'importantes différences hormonales entre les deux conditions. En effet les agroinfiltrations de GFP et Pv47 ont été réalisées en patch sur les mêmes feuilles. Cette localisation trop rapprochée peut expliquer l'absence de différence dans les teneurs des hormones étudiées entre les deux conditions en raison de leur transport de cellule à cellule. Ensuite le protocole de prélèvement des tissus foliaires utilisé n'est probablement pas optimal pour l'extraction d'hormones, très peu ont pu être mesurées à la fois dans les conditions GFP et Pv47. Un prélèvement de disque foliaire au diamètre plus important permettrait améliorer la détection des hormones. Un perfectionnement des techniques pour l'analyse du métabolome chez *N. benthamiana* est nécessaire. Il est également possible de suivre des marqueurs de synthèse des voies hormonales par qPCR **(Attard et al., 2010)**.

Pv47 apparait associé au réticulum endoplasmique (RE)

Pv47 a été montré comme localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE), une association qui a été observée chez plusieurs effecteurs RXLR. Le RE est un organite central dans la machinerie cellulaire. Il est notamment responsable du bon repliement des protéines et intervient dans le trafic vésiculaire, la production de ROS, la gestion des flux calciques **(Liebrand et al., 2012**).

Nombreux sont les effecteurs de différentes origines biologiques qui ont été localisés au RE. Sur 49 effecteurs RXLR de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis*, 18% sont localisés au niveau du RE **(Caillaud et al., 2012)**. Il a été montré que trois effecteurs bactériens, PipBSt, SopBSt, and WipBLp, localisent au ER lorsqu'ils sont exprimés chez la levure (**Weigele et al., 2017)**. Un effecteur de la bacterie *Pseudomonas syringea*, HOPD1, interagit avec un facteur de transcription au niveau du RE, ce qui lui permet de supprimer l'ETI **(Block et al., 2014)**. Cette stratégie a été aussi observée chez les

oomycètes ; l'effecteur Pi03192 de *P. infestans* interagit avec deux facteurs de transcription, empêche leur passage du RE au noyau et supprime ainsi la PTI **(McLellan et al., 2013**).

Le RE est également sollicité pour la mise en place de la mort cellulaire **(Xu et al., 2012)**. Lorsque la quantité de protéines mal repliées augmente fortement et sature les complexes cellulaires de dégradation, la cellule rentre en situation de « stress du RE ». La réponse UPR (Unfolded Protein Response) permet d'augmenter les capacités d'élimination de la cellule mais peut aboutir à l'apoptose de la cellule **(Mori, 2000; Cai et al., 2014)**. Un effecteur de *P. sojae,* Avh262, est capable de supprimer la mort dû au stress du ER en stabilisant les chaperonnes impliqués dans l'UPR (Jing et al., 2016). Certains agents pathogènes comme le champignon *Piriformospora indica* au contraire induisent un stress au RE par le biais de l'inhibition de l'UPR dans les cellules colonisées. Ceci conduit au gonflement du RE et l'activation de la mort cellulaire avec l'implication des caspases permettant la phase nécrotrophe de l'interaction **(Qiang et al., 2012).**

Pv47 pourrait cibler les voies de sécrétion du RE

Les expériences d'immunoprécipitation ont identifié la protéine SEC31-B parmi les plausibles interactants de Pv47. Cette interaction doit encore être confirmée par une autre technique, mais SEC31-B constitue un très bon candidat car il est aussi localisé au niveau du RE et en plus il est présent chez la vigne. SEC31-B est une protéine cytoplasmique qui intervient dans le complexe protéique COPII. COPII permet le bourgeonnement de la membrane plasmique du RE jusqu'à la formation des vésicules. Une fois que la membrane de la vésicule s'est refermée et s'est décrochée du RE, le complexe COPII se disloque pour se reformer à proximité de la membrane du RE. Les composants de COPII restent ainsi à proximité du RE. C'est ce qui a été observé grâce aux constructions de SEC23-a, SEC23-d, et SEC24-a, éléments du complexe COPII, fusionnés aux protéines fluorescentes GFP et RFP : leur expression chez *N. benthamiana* montre une localisation très similaire à Pv47, avec le signal fluorescent dessinant un maillage caractéristique du RE avec des points plus intenses **(Aboulela et al., 2018)**. Ces points correspondent aux sites de sortie du RE, appelés ERES (de l'anglais Endoplasmic Reticulum Exit Sites), qui sont les lieux de la formation de vésicules. Ces points rappellent ceux observés sur le RE dans les cellules qui expriment Pv47 marqué à la citrine **(Figure 66)**. Lorsqu'un autre acteur du complexe COPII, SEC24A, est muté chez *A. thaliana* des perturbations de la morphologie du RE tubulaire ainsi que de la membrane du Golgi ont été observées **(Faso et al., 2009)**. Une explication pour l'apparition des agrégats observés sur le RE lors de l'expression de Pv47 **(Figure 66)** pourrait donc être que Pv47 perturbe la formation de vésicules de la même manière que la mutation de SEC24A. Une observation de l'ultrastructure du RE par microscopie électronique permettrait de mieux distinguer les agrégats. De plus, marquer SEC31 avec une protéine fluorescente permettrait de vérifier sa présence ou absence

sur ces perturbations. Cependant, l'observation potentielle des ERES marqués par Citrine-FLAG-Pv47 et l'apparition d'agrégats sur le RE suggèrent l'idée que Pv47 interagit avec SEC31-B.

Les observations microscopiques et l'identification de SEC31-B comme interactant me portent à proposer l'hypothèse que Pv47 ciblerait le trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi. Cette idée s'appuie sur le fait qu'une perturbation du complexe COPII où intervient SEC31 conduit à une diminution du diamètre des Golgi et une déstructuration **(Osterrieder et al., 2010)** ; les mêmes phénomènes sont observables suite à un traitement BFA, inhibiteur du trafic vésiculaire. **(Ritzenthaler et al., 2002)**. Pour vérifier rapidement les liens entre Pv47 et le trafic vésiculaire, il est envisageable de suivre l'évolution du Golgi après expression de 47Δsp par microscopie grâce à des marqueurs spécifiques. Une autre approche est de vérifier si Pv47 perturbe la sécrétion d'une GFP fusionnée à peptide signal. Elle a été utilisée pour caractériser XopJ, un effecteur bactérien de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. La co-expression de l'effecteur et de secGFP montre une accumulation sec-GFP dans les structures réticulées et une diminution dans le liquide apoplastique **(Bartetzko et al., 2009)**.

Le trafic vésiculaire est une composante importante de la PTI **(Wang et al., 2014)**. Les molécules antifongiques, comme les inhibiteurs de protéases, ou les phytoalexines sont sécrétées dans la matrice extra-haustoriale par les voies d'exocytose. Certains effecteurs ciblent ces sécrétions pour diminuer l'impact de la PTI. Ainsi, Avrblb2, un effecteur RXLR de *P. infestans,* interfère avec la sécrétion de la cystéine protéase C14 de type papaïne en intervenant au niveau de la membrane plasmique près de l'haustoria **(Bozkurt et al., 2011).** Un autre effecteur de *P. infestans*, AVR1, interagit avec un composant du complexe Exocyst, perturbant potentiellement le trafic vésiculaire **(Du et al., 2015c).**

La localisation de Pv47 pourrait ne pas se limiter au RE

Un autre élément lié au trafic vésiculaire dans le cadre d'une infection est l'organisation de l'interface entre la cellule hôte et l'agent pathogène. Lorsque l'oomycète développe l'haustoria à l'intérieur de la cellule végétale, une membrane extra-haustoriale (EHM) se superpose, qui est plus tardivement recouverte par une enveloppe de paroi protectrice **(Meyer et al., 2009b).** Ces caractéristiques ont été observées chez certains oomycètes et champignons mais ne sont pas systématiques. Des observations par microscopie électronique indiquent que l'EHM a une composition et une différentiation fonctionnelle différentes de la membrane plasmique **(Hansen and Nielsen, 2017)**. Les structures associées à l'EHM semblent provenir de la prolifération de corps multi-vésiculaires (MVB) sécrétés par les TGN (réseau des trans-Golgi) qui s'accumulent à proximité des haustoria au moment d'une infection **(Meyer et al., 2009; Hansen and Nielsen, 2017; Li et al., 2018).** Mais il est possible que ce ne soit pas la seule voie impliquée. En effet, un composant du trafic vésiculaire spécifique au RE, la protéine SAR1, élément de COPII, a été retrouvée sur l'EHM **(Kwaaitaal**

et al., 2017). Cependant, l'inhibition du trafic conventionnel RE-Golgi par la BFA ne perturbe pas la formation de l'EHM. Il est alors supposé que l'EHM est formé également à partir d'un trafic non-conventionnel où interviennent certains éléments de COPII. Ainsi, il a été proposé que *Blumeria gramini* f. sp *hordei* introduit des effecteurs pour contrôler le trafic vésiculaire et faciliter la formation de l'EHM **(Kwaaitaal et al., 2017)**. En accord avec cette idée, il a été montré que l'effecteur Avh262 de *P. sojae,* capable de supprimer la HR, localise au niveau du RE quand il est exprimé chez *N benthamiana* mais dans la cadre d'une infection par *P. sojae* il est relocalisé au niveau de l'EHM **(Jing et al., 2016)**. Également, une réorganisation du RE de la cellule infectée autour des haustoria a été observée dans le cadre de l'infection de *H. arabidopsidis* **(Caillaud et al., 2012)**.

Quelle est la localisation réelle de Pv47 dans le cadre d'une infection ? Cette relocalisation serait-elle également possible pour Pv47 ? Il n'est pas possible actuellement de transformer *P. viticola* pour connaitre la réelle localisation de Pv47 dans le cadre d'une infection. Pour le vérifier il a deux approches possibles. La première serait d'introduire la séquence de Pv47 dans le génome d'un agent pathogène plus facile à transformer, comme *P. infestans*. L'approche repose sur la très grande similitude des stratégies d'infection que l'on retrouve au sein des oomycètes. La seconde approche serait d'infecter des feuilles de *N. benthamiana*, qui expriment transitoirement Pv47 marqué à la citrine, à l'aide d'un oomycète compatible comme *P. nicotianae*, *P. parasitica* ou *P. infestans*.

Pv47 inhibe le développement de *Botrytis cinerea* à un stade spécifique de son infection

L'expression transitoire de Pv47 chez *N. benthamiana* induit la mort cellulaire et inhibe le développement du champignon nécrotrophe *B. cinerea*. Cette apparente contradiction peut s'expliquer sur la base des dernières connaissances sur le cycle infectieux de cet agent pathogène. L'infection de *B. cinerea* est divisée en deux étapes. La première étape a lieu au cours des 24 premières heures, les conidies germent à la surface supérieure des feuilles et sécrètent des facteurs inducteurs de nécrose sur le site d'infection qui dessine alors la lésion primaire. La plante sécrète également de son côté des facteurs inducteurs de mort cellulaire fongique. Pendant les 24 heures suivantes se déroule une phase de quiescence pendant laquelle la plupart des hyphes de *B. cinerea* meurent. La seconde étape a lieu à 72 heures après la germination des spores, les hyphes qui survivent sécrètent des facteurs inducteurs de mort cellulaire végétale. Les tissus végétaux meurent et macèrent avant d'être colonisés par les hyphes **(van Kan, 2003; Shlezinger et al., 2011)**. Lorsque *B. cinerea* est inoculé sur des tissus qui expriment Pv47, les spores germent, pénètrent et forment la lésion primaire. Mais au moment de la deuxième étape, la croissance des hyphes ne semble pas être capable de repartir alors qu'une zone de mort cellulaire parfois très grande se propage à partir du site d'inoculation. Ceci pourrait s'expliquer par la réponse immune induite par Pv47, qui prédisposerait la plante à se défendre

de l'infection avec plus d'efficacité. Dans cette situation, les hyphes meurent en totalité ou leur croissance est freinée par les défenses végétales induites par Pv47 (comme la production de ROS, de barrière de callose, de composés antifongiques). Pour valider cette hypothèse, des marqueurs de viabilité cellulaire peuvent être utilisés sur les hyphes, en parallèle au suivi de l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Une cinétique plus fine réalisée avec une souche fluorescente de *B. cinerea*, assistée par microscope confocale, aiderait aussi à mieux comprendre ce phénomène.

Les résultats obtenus avec *B. cinerea* sont différents selon la période de l'année dans laquelle ont été faites les expériences. Les variations des conditions de cultures peuvent être à l'origine de cette variabilité observée. Les tests sont donc à réitérer au fil des saisons, une approche fréquente dans le cadre de tests phytopathologiques. Ceci dit, malgré la variabilité observée dans les tests phytopathologiques de *B. cinerea* il a été possible d'observer de façon régulière que la présence de Pv47 cause une réduction du développement de *B. cinerea*.

La tâche de tissus nécrosés autour de l'infection est surprenante car elle se développe très largement sur les tissus qui expriment Pv47, parfois très loin du site d'inoculation de *B. cinerea*. Sa présence ne semble pas être strictement nécessaire pour voir une augmentation de la résistance à *B. cinerea*. S'agit-il d'une propagation des facteurs de mort cellulaire du champignon qui diffusent à travers l'apoplasme? Ou le stress induit par Pv47 concomitant avec la mort des cellules au site d'infection propage-t-il une HR particulière de cellules en cellule avec un effet domino ? L'utilisation de souches mutées pour des facteurs de nécrose de *B. cinerea* était une approche intéressante pour répondre à la première question mais elle n'a pas été concluante, car les tests ont été réalisés dans une période où le phénotype de macération n'était pas ou peu visible. Pour répondre à la seconde question, suivre l'expression de gènes marqueurs d'une mort cellulaire de type HR sur les tissus nécrosés peut être une solution. Mais comme énoncé précédemment, les morts cellulaires sont très difficiles à distinguer. L'obtention de lignées d'*A. thaliana* surexprimant Pv47 permettra de valider le phénotype obtenu avec *B. cinerea* sur un second hôte et aussi d'éliminer la possibilité que la procédure d'agroinfiltration joue un rôle dans le phénomène.

3. Conclusion

Dans ce chapitre j'ai montré que Pv47 est un effecteur candidat de *P. viticola* localisé au RE qui active des réponses de résistance chez des Nicotianeae. Ces réponses se traduisent par une restriction du développement de certains agents pathogènes. Cependant, certaines expériences nécessitent d'être répétées et certains résultats, notamment les immunoprecipitations, doivent être complétés par d'autres méthodes. Par exemple, des plantes d'*A. thaliana* surexprimant Pv47 sont en cours d'obtention ; ces lignées permettront de vérifier si la localisation et les perturbations du RE sont

toujours visibles, mais également de réaliser des tests d'infection par un oomycète biotrophe *H. arabidopsidis*, proche dans sa stratégie d'infection à *P. viticola*.

Il est donc encore difficile de conclure quant au rôle exact de cet effecteur au cours de l'infection. Néanmoins, la confirmation des interactions avec le gène de résistance de type R1a3 et/ou la protéine SEC31-B ouvrirait des voies pour l'utilisation de ces protéines pour la création de variétés résistantes au mildiou de la vigne. L'utilisation du gène de type R1a3 devrait faire appel à des programmes de biotechnologie en introduisant le gène de résistance des Nicotianeae chez les vignes cultivées. Concernant SEC31-B, l'identification de l'homologue chez la vigne et l'étude de la variabilité naturelle du gène dans une collection d'accessions de vigne pourrait conduire à l'identification d'allèles du gène qui ne sont pas ciblés par Pv47 et qui auront le potentiel de fonctionner comme des gènes de résistance récessifs.

Conclusions et Perspectives

Ma thèse s'inscrit dans un programme de recherche qui vise à développer de nouvelles variétés de vigne durablement résistantes contre le mildiou, causé par l'oomycète *Plasmopara viticola*. Le but de mon projet de thèse était d'identifier de nouveaux gènes de résistance chez la vigne. Mon travail s'est donc organisé selon deux axes principaux :

- Identifier des gènes de résistance majeurs chez des vignes résistantes originaires d'Asie et d'Amérique.
- Réaliser une analyse fonctionnelle des effecteurs de *P. viticola* afin d'identifier leurs rôles dans les stratégies d'infection de l'oomycète et de caractériser leurs cibles protéiques chez son hôte.

Le premier volet de la thèse a débuté par une recherche d'effecteurs de *P. viticola* reconnus par les vignes résistantes, *via* l'expression transitoire d'une quinzaine d'effecteurs conservés sur des vignes résistantes. L'approche a été initiée sur des effecteurs de la famille RXLR puis a été étendue aux effecteurs de la famille WY-domain. Outre *Pv33*, aucun effecteur candidat reconnu par les vignes resistantes n'a pu être identifié. Ceci peut être principalement attribué au faible nombre d'effecteurs utilisés pour le crible. Il pourrait également s'expliquer par les limites techniques et biologiques de la transformation de la vigne. En effet ; le protocole de transformation de tissus foliaire utilisé, bien qu'étant le plus efficace décrit, est responsable d'un important bruit de fond. Ce dernier pourrait être trop élevé pour réussir à distinguer une mort cellulaire de type HR sur les cellules transformées. Des techniques complémentaires et alternatives ont été testées :

- Un contrôle positif, sous forme de couple R/Avr connu chez la vigne, a été recherché pour permettre la discrimination des morts cellulaires de type HR du bruit de fond de l'expérimentation. Réalisé *via* la co-expression des effecteurs avec le gène de résistance cloné *Rpv1* chez le modèle végétal *N. benthamiana*, aucun effecteur testé n'a permis d'identifier de couple R/Avr.
- Les réactions de défense ont été suivies *via* l'accumulation de transcrits du gène *VvHSR,* marqueur d'une mise en place de HR. La technique s'est révélée efficace pour étudier la HR induite par l'expression de Pv33 sur *V. vinifera* cv. Syrah, variété sensible et facile à transformer.
- Une approche indépendante de l'utilisation d'*A. tumefaciens* a été initiée *via* l'infiltration des effecteurs purifiés et produits par des levures. Les premiers résultats ont montré que les effecteurs ne transloquent pas directement dans les cellules végétales. Cette limite interrompt toute possibilité d'observer une réaction cellulaire *via* cette technique.

L'approche de suivi de l'expression de VvHSR comme marqueur de HR est prometteuse et devra être exploitée pour la suite du projet de recherche. Néanmoins les enjeux majeurs reposent sur la difficulté à transformer transitoirement certains cépages résistants ainsi que sur la vérification de l'efficacité de la transformation. Ces difficultés pourront être surmontées par l'utilisation comme témoin positif de Pv33 ou d'autres effecteurs de *P. viticola* nouvellement décrits dans la littérature comme inducteurs de HR. Une fois que ces problèmes seront résolus, le crible devra être appliqué à un plus grand nombre d'effecteurs. Le choix pourrait se porter sur ceux qui ont un profil d'expression plus précoce au cours de l'infection, à l'image de *Pv33* dont l'expression est précoce dans les spores germées.

L'obstacle majeur dans la recherche de gènes de résistance de la vigne et de couples R/Avr par expression transitoire d'effecteurs candidats est la transformation des tissus foliaires. Cette limite semble assez importante pour s'interroger sur la pertinence de la stratégie. D'autres approches peuvent être utilisées dans la recherche de couples R/Avr ; comme la cartographie génétique du gène *Avr* par croisement d'isolats virulents et avirulents de pathogène ; ou une stratégie de génétique d'association par reséquençage d'isolats virulents et avirulents pour identifier des mutations associées à la virulence. A ce jour, ces approches peuvent être utilisées seulement pour identifier le gène *Avr* correspondant au QTL de résistance fort *Rpv3*, car c'est le seul gène pour lequel il existe des isolats virulents.

Le second volet de la thèse consistait en une caractérisation fonctionnelle des effecteurs RXLR de *P.* viticola. En raison de fortes concurrences entre équipes de recherche, ce volet s'est élargi à la caractérisation fonctionnelle d'une famille protéique encore très peu étudiée chez les oomycètes : les protéines sécrétées avec un domaine WY. La littérature scientifique montre que ces protéines sont présentes chez plusieurs espèces d'oomycètes, laissant présager un rôle dans leur pouvoir infectieux. Nous avons pu souligner l'existence de cette famille chez *P. viticola*, ainsi qu'une ressemblance de séquence de certaines de ces protéines avec des effecteurs RXLR d'autres oomycètes. J'ai montré que l'une de ces protéines induit une mort cellulaire de type HR chez la vigne, ce qui suggère que cette nouvelle famille protéique pourrait fonctionner comme des effecteurs.

La caractérisation fonctionnelle des effecteurs RXLR et WY-domain a été réalisée chez *N. benthamiana.* Malgré son éloignement phylogénétique de la vigne, ce modèle est aisément transformable et permet d'avoir une idée de la fonction des effecteurs une fois présents dans une cellule végétale ainsi que d'obtenir des informations sur les cibles protéiques des effecteurs. Malgré les différences entre les vignes et les Nicotianeae, il a été possible d'observer l'activation de défenses végétales pour trois effecteurs Pv33, Pv44 et Pv47. De plus, les résultats d'analyses métabolomiques

d'accumulation du tryptophane chez *N. benthamiana*, suite à l'expression transitoire d'un de ces effecteurs, évoquent ceux de l'accumulation du même acide aminé dans un contexte d'infection de vignes par *P. viticola*. Ces observations nous confortent dans la pertinence du choix de *N. benthamiana* comme modèle de substitution à la vigne.

J'ai caractérisé trois effecteurs de *P. viticola* au cours de cette thèse. Les résultats de cette caractérisation se trouvent résumés dans le **(Tableau 9)**. Mes résultats ont permis d'observer que ces trois effecteurs ont des localisations très différentes : l'effecteur Pv33 est nucléaire, l'effecteur RXLR Pv44 est cytoplasmique et Pv47 est associé au réticulum endoplasmique. Ces observations illustrent la stratégie multifonctionnelle déployée par *P. viticola* pour contrôler les cellules infectées. Connaître la localisation de ces trois effecteurs est également une information cruciale pour déterminer plus précisément leur fonction à sein de la virulence du parasite. Ainsi, il est possible de proposer une implication potentielle de Pv33 et Pv47 au niveau de l'expression génique et du système sécrétoire de la cellule hôte respectivement. Seule la localisation de Pv33 a été confirmée chez l'hôte *V. vinifera* cv. Syrah. Sa concentration dans l'espace confiné qu'est le noyau le rend visible au sein des tissus difficiles à transformer. Pour confirmer la localisation de Pv44 et Pv47 il serait possible de transformer des cellules de vigne en culture liquide *via Agrobacterium* ou par bombardement de microparticule **(Baribault et al., 1989) (Hébert et al., 1993).** Ces techniques ne permettent pas de faire une caractérisation fonctionnelle détaillée, mais elles permettent de vérifier la localisation subcellulaire des effecteurs. Des lignées transgéniques d'*A.thaliana* qui expriment les effecteurs fusionnés à un marqueur fluorescent sont en cours d'obtention, elles permettront de vérifier la localisation des effecteurs sur une gamme d'hôte plus importante.

L'expression transitoire de chacun de ces trois effecteurs induit l'apparition de nécroses plus ou moins contrastées chez *N. benthamiana,* associées à une production de phytoalexines. Certaines de ces morts cellulaires ont déjà été observées chez d'autres modèles végétaux : l'expression transitoire de *Pv47* induit une mort cellulaire chez *N. tabacum* spp et celle de *Pv33* induit des nécroses chez d'autres espèces de *Nicotiana* ainsi que chez chez *V. vinifera* cv. Syrah. Il n'a pas été possible à l'heure actuelle de déterminer l'origine précise de ces nécroses. Chacune des morts cellulaires observées présente des caractéristiques particulières :

- la mort cellulaire induite par l'expression de *Pv33* est détectée chez différentes Nicotianeae et chez la vigne. J'ai montré également que cette mort cellulaire est indépendante de protéines impliquées dans la signalisation de défense végétale EDS1, dépendante de la protéine SGT1 et d'une localisation nucléaire. Ces résultats

		Pv44	Pv33	Pv47
N. benthamiana	Localisation	Cytoplasmique	Nucléaire (Nucléole et foyers nucléaires)	Réticulum Endoplasmique
	Mécanismes de défense végétale en réponse à l'effecteur	Mort cellulaire Production de phytoalexines	Mort cellulaire dépendante de SGT1	Ilots nécrotiques/Mort cellulaire Production de phytoalexines et de ROS, Dépôt de Calloses
	Suppression des défenses végétales induite par Inf1	Oui	nd	Renforce la mort cellulaire
	Résistance à :			
	P. parasitica	Inchangée	nd	Augmentée
	P. syringea sp. DC3000	Inchangée	nd	Nécrose renforcée
	A.tumefaciens	Inchangée	nd	Augmentée
	PVX	Inchangée	nd	Inchangée
	Botritys cinerea	Inchangée	nd	Augmentée
	Recherche des cibles		Initiée (Candidats SHUV1 et GTL1 à confimer)	Initiée (Candidats SEC31B et R1A3 à confimer)
V. viniferacv. syrah	Localisation	-	Nucléaire	-
	Mécanismes de défense végétale en réponse à l'effecteur	-	Mort cellulaire Sur-expression de VvHSR	-

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus pour Pv33, Pv44 et Pv47 sur *N. benthamiana* et transposés sur *Vitis vinfiera cv. Syrah.*
«-»: indeterminé par les approches expérimentales mises en œuvre; nd : non déterminé.

suggèrent que la mort cellulaire ne serait pas induite par la détection de l'effecteur par un gène de résistance.

- Pv47 entraîne une mort cellulaire chez *N. tabacum* ainsi qu'une production de ROS et un dépôt de callose chez *N. benthamiana*. Le fait que l'expression de cet effecteur réduit la sensibilité à plusieurs pathogènes fait penser à une induction de réponses immunes *via* la détection par un gène de résistance.
- La mort cellulaire induite par Pv44 chez *N. benthamiana* n'est pas systématique, elle peut dépendre d'un seuil déclencheur.

Le déclenchement de ces nécroses pourrait dépendre d'une détection indirecte des effecteurs par leur activité dans les cellules végétales et du rôle essentiel des fonctions cellulaires végétales modifiées par leur présence. Lorsque leurs cibles seront identifiées, au vu des symptômes contrastés déjà observés, les mécanismes moléculaires qui régissent l'activité de ces effecteurs devraient être relativement aisés à identifier.

Deux des effecteurs semblent complémentaires au vu des voies de signalisation de défenses végétales mises en jeux par leur présence. La co-expression de INF1 et Pv47 montre une augmentation de la nécrose induite par le premier, un résultat qui indique une synergie dans les voies de signalisation activées par la détection de INF1 et Pv47. Mes résultats de co-expression de Pv44 avec INF1 montrent que l'effecteur est capable de supprimer la HR induite par ce dernier. Ces données illustrent l'interdépendance des effecteurs entre eux. A l'image du model en Zigzag, la mort cellulaire provoqué par Pv47 devrait donc être supprimée par Pv44. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée par co-expression des deux effecteurs chez *N. benthamiana* parce qu'ils sont clonés dans le même plasmide, ce qui empêche la réalisation des tests de suppression d'induction de mort cellulaire.

Au cours de l'étude fonctionnelle des effecteurs de *P. viticola* pour la recherche de nouveaux gènes de résistance, il est primordial de vérifier leurs implications dans la virulence du parasite. L'impossibilité de transformer la vigne ou *P. viticola* est un réel frein pour obtenir cette information. Pour pallier ce problème, j'ai testé la capacité d'infection de différents agents pathogènes aux modes d'infection variés en présence des effecteurs Pv44 et Pv37 chez *N.benthamiana*. Les tests ont été réalisés avec un champignon nécrotrophe, un oomycète hémibiotrophe, deux bactéries respectivement biotrophe et hémi-biotrophe et un virus. Pv47 a montré une capacité à réduire l'infection de certains d'entre eux. Le problème majeur de cette étude réside dans le fait qu'aucun agent pathogène biotrophe, et donc similaire à *P. viticola,* n'a été testé. La génération de transformants d'*A. thaliana* qui expriment chacun des effecteurs a été initiée, cependant les lignées

n'ont pas pu être obtenues à temps pour réaliser les tests d'infection par l'oomycète biotrophe obligatoire *Hyaloperonospora arabidopsidis*. S'il n'était pas possible d'obtenir des lignées d'*A. thaliana* exprimant les effecteurs constitutivement, il serait nécessaire de passer par un système d'expression inductible.

Les cibles protéiques de deux effecteurs, Pv33 et Pv47, ont été recherchées par immunoprécipitation après expression transitoire chez *N. benthamiana*. Cette expérimentation serait à étendre à Pv44, dont l'étude a été intentionnellement arrêtée au cours de la thèse. Plusieurs cibles candidates ressortent pour Pv33 et Pv47 et la confirmation de l'interaction est en cours. Pour l'effecteur Pv33, qui se concentre dans le nucléole et les foyers nucléaires, deux interactants potentiels sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle : le facteur de transcription GTL1 et l'histone méthyle-transférase SUVH1. Après confirmation de l'interaction, les cibles génétiques de Pv33 pourront être identifiées soit par observation des variations du transcriptome grâce aux techniques de puce à ADN ou RNA-Seq, soit par Chip-seq. Concernant Pv47, il serait intéressant de tester deux interactants potentiels : une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique, SEC31B, qui rappelle l'association de Pv47 au RE, et un gène de résistance de type NBS-LRR, qui pourrait être responsable du phénotype de mort cellulaire observé.

Connaître les cibles de ces trois effecteurs est essentiel pour identifier de nouvelles sources de résistance à *P. viticola*. De la même manière que le gène de résistance récessif *prv2* du piment contre le virus PVY, il sera possible de rechercher des variantes de séquence de ces cibles chez d'autres vignes. En effet, quelques mutations pourraient empêcher l'interaction avec les effecteurs de *P. viticola*. Pour identifier les motifs nécessaires à l'interaction entre les effecteurs et leurs cibles protéiques, il est possible de cloner des séquences tronquées des effecteurs et de vérifier le maintien de l'interaction par co-immunoprécipitation après expression chez *N. benthamiana*. Il faut cependant conserver l'hypothèse qu'une redondance fonctionnelle semble exister chez les effecteurs des oomycètes et qu'elle peut rendre caduques les gènes de résistance choisis. L'étape de vérification de l'implication des effecteurs dans la virulence de *P. viticola* citée plus haut est donc primordiale.

Pour conclure, ce projet de thèse n'a pas permis d'identifier des facteurs de résistance majeurs contre *P. viticola via* l'approche de criblage définie au départ, mais ce travail a permis de mettre en évidence des pistes techniques à explorer pour rendre le crible plus performant et pouvoir ainsi l'élargir à un nombre plus grand d'effecteurs. En parallèle, l'étude fonctionnelle de deux familles d'effecteurs constitue une voie de recherche prometteuse pour l'identification de résistances alternatives.

Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Les plants de vigne utilisés dans les expérimentations ont été cultivés en serre ou en culture in vitro.

Les vignes cultivées en serre semi-contrôlée sont cultivées en pots à partir de boutures à 22-19°C (jour-nuit) sous une photopériode de 16/8h (jour-nuit). Les plants sont multipliés par bouturage tous les 3 mois.

Les vignes en culture in vitro sont maintenues par repiquage de boutures sur milieu gélosé stérile (1.28 g/l de *McCroown Woodyplant medium*, 12.5 g/l de saccharose, 3.75 g/l d'agar) pH 6.5 en tubes et cultivées en chambre de culture à 22-19°C (jour-nuit) sous une photopériode de 16/8h (jour/nuit). Les plantes sont multipliées par bouturage toutes les 8 semaines.

Les lignées de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana. tabacum* cv. Havana et cv. Samsun sont cultivées en serre semi-contrôlée à une température minimale de 18°C et maximale de 28° (jour-nuit) et sous une photopériode de 14/10h (jour-nuit, 10 klx minimum).

Les lignées de *Nicotiana benthamiana* utilisées à l'Université de Århus sont fournies par Sejet, Horsens, Danemark. Le matériel végétal est cultivé en chambre de croissance à une température de 17°C sous une photopériode de16/8h (jour-nuit) sous une humidité de 75% pendant deux semaines.

2. Matériels microbiens

Plasmopara viticola (isolat Pv221) est maintenu sur feuilles de *Vitis vinifera* cv. Muscat Ottonel placées en boites de Petri sur papier filtre humide et incubées en chambre de Thermoplan à 21°C sous une photopériode de 16h/8h (jour-nuit). L'oomycète est maintenu par repiquage toutes les semaines : des feuilles de plantes cultivées en serre sont détachées, lavées placées en boites de Petri sur du papier filtre humide et inoculées avec une suspension de spores. Les boites de Petri sont maintenues à l'obscurité pendant 24h et puis incubées comme indiqué ci-dessus.

Phytophthora parasitica (isolat 329) est maintenu en boite de Petri sur milieu malt-agar (10 g/L) à l'obscurité en chambre de Thermoplan à 23°C. L'oomycète est maintenu par repiquage tous les mois par transferts de cubes de gélose infectés par du mycélium.

Botrytis cinerea (isolat BMM et B05.10, souches transformées B05-10-GFP, B05-10-*stc1*Δ, B05-10-*pks6* Δ) est cultivé sur milieu V8 clarifié-agar (5% V8, 0.1g/L de CaCo3, 3.75 g/L d'agar) à l'obscurité en chambre de Thermoplan à 23°C. Le repiquage se fait par dépôt de spores en suspension à 10^8 sp/mL minimum toutes les 2 semaines (avec un maximum de 4 repiquages).

***Pseudomonas syringea* pv. tomato DC3000** est cultivé en milieu NYGB supplémenté par de la kanamycine (25 µg/mL) et de la rifampicine (100 µg/mL) à 28°C à l'obscurité pendant 48h en milieux solide et 8 à 16h en milieu liquide.

Pichia pastoris est maintenu en milieu liquide LB supplémenté par de la Zeocine (100 µg/mL) sous agitation à 37 °C à l'obscurité.

Les souches B. cinera, P. syringae, Agrobacterium tumefaciens, Escherichia coli et P. pastoris sont maintenues par glycérol stock (25% glycerol final) à -80°C.

3. Extraction d'ADN et ARN

Pour l'extraction de l'ARN de *P. viticola* : se référer à **(Dussert et al., 2018)**.

Pour l'extraction de l'ADN de *V. vinifera* infécté : Deux disques (1 cm de diamètre) foliaires infectés sont broyés dans l'azote liquide. 600 µL de tampon d'extraction (5% de TRIS 1M à pH =8, 2% d 'EDTA 0,5M pH=8, 4,1% de NaCl, 1% de CTAB et 1% de PVP) sont ajoutés, les échantillons sont chauffés à 61°C pendant 1h puis supplémentés par 400 µL de chloroforme/alcool isoamilique. Après centrifugation (à 16 000 x g pendant 10 min à 4°C), la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube avec 2/3 de volume d'isopropanol. Après 30 minute d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés (16 000 x g pendant 10 min) et le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans de l'eau stérile.

4. Clonage d'effecteurs et transformation de *A. tumefaciens*

Pour les constructions marquées avec le gène rapporteur GFP se référer au protocole figurant dans **(Combier et al., 2019)**.

Amplification : les séquences des gènes ont été amplifiées à partir d'ADN génomique et d'ARNm rétrotranscrits de feuilles infectées, en utilisant des amorces contenant les sites de restriction appropriés. Les PCRs ont été conduites en utilisant la polymérase de haute fidélité Phusion (New England Biolabs). Le programme utilisé comprend 35 cycles de 15s à 98°C, 30s à 60°C, 45s à 72°C, suivis par une extension finale de 5 minutes à 72°C.

Clonage : Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *Xba*1 et *Xma*1 et clonés dans le plasmide pBIN61 digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide pBIN61 est dérivé du plasmide binaire pBIN19 et comporte, entre autres, un gène de résistance à la kanamycine qui permet de sélectionner les colonies transformées et des sites d'hybridation d'amorces universelles de séquençage M13.

Transformation de *E. coli* : Des bactéries *E. coli* DH10B sont transformées par électroporation avec les produits de ligation. L'électroporation est effectuée avec le Gene Pulser II (BioRad) (réglage : capacitance de 50 µF, résistance de 200 Ω, et différence de potentiel 1,8 kV) et des cuves dont l'écartement entre les électrodes est de 0,1 cm. Les colonies transformées sont ensuite sélectionnées sur du milieu LB contenant de la kanamycine (50 µg/mL).

PCR colonie : Après 24h, les colonies sont utilisées comme sources d'ADN dans le mélange composé de 0.05 unité de polymérase GoTaq (Promega), 0.5 pmol de chaque amorce et les amorces universelles M13. Le programme utilisé comprend 30 cycles de 20s à 94°C, 20s à 55°C, 2 minutes à 72°C suivis par une extension finale de 10 minutes à 72°C.

Validation de la construction : Les plasmides sont ensuite extraits grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). L'identité des gènes clonés est confirmée par séquençage. Les séquences sont assemblées à l'aide des modules PreGap4et GAP4 du logiciel Staden puis alignées avec les séquences de référence en utilisant le logiciel SerialCloner.

Transformation de *A. tumefaciens* : Les bactéries *A. tumefaciens* C58C1 contenant le plasmide pCH32 sont transformées par électroporation avec les plasmides recombinés, les colonies transformées sont sélectionnées sur milieu LB supplémenté en kanamycine (50 µg/mL) et en tétracycline (2,5 µg/mL).

5. Expression transitoire par agroinfiltration

Les agroinfiltrations de *N. benthamiana* ont été réalisées comme décrit dans **(Mestre et al., 2016).**

Les agroinfiltrations de *V. vinifera* ont été réalisées comme décrit dans **(Santos-Rosa et al., 2008)**. Cependant la suspension bactérienne a été supplémentée de 0,3% de Silwet-L77. L'infiltration des disques de vignes issus des plus jeunes feuilles étalées a été réalisé par immersion pendant 10 min dans la solution bactérienne tel que décrit dans **(Lizamore and Winefield, 2015)**.

6. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)

Le silencing de SUVH1 de *N. benthamiana* a été réalisé comme décrit dans **(Combier et al., 2019).**

7. Clonage SLIC, transformation de levures et infiltration de protéines purifiées

Amplification : les séquences des effecteurs ont été amplifiées à partir des clones dans pBIN61 en utilisant la polymérase d'haute-fidélité Phusion (Finnzymes), avec 0,5 pmol de chaque primer, 10 mM de dNTPs, 5X du tampon GC. Le programme utilisé comprend 30 cycles de 10s à 98°C, 30s à 58°C, 72°C (le temps paramétré en fonction de la longueur du fragment attendu : 45 sec pour 1kb, suivis par une extension finale de 10 minutes à 72°C. Les amorces pour SLIC ont une extension de 25 nucléotides qui s'alignent avec le vecteur pPICZαA-GFP (vecteur Invitrogène Modifié)

Clonage : Le SLIC est adapté du protocole **(Jeong, 2012)**, 400 ng de vecteur ont été utilisé au lieu des 100 ng décrits. 20 ng de RecA ont été ajoutés par réaction (Thermo fisher).

Transformation de *E. coli* : Pour la transformation de *E. coli*, 2 µl du mélange de plasmides a été complété par 20 µL de tampon KCM 5X et 78 µL d'eau dans un tube de 1,5 mL, et incubé pendant 2 minutes sur glace. Le mélange plasmidique a été ajouté à des *E. coli* (Souche DH5B) rendues compétentes chimiquement et incubées pendant 20 minutes sur glace, puis 10 minutes à température ambiante. Le mélange est complété par 600 µL de milieu LB et incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. 150 µL sont déposés sur milieu gélosé de LB supplémenté par de la zéomycin (100 ng/µL).

PCR colonie : Après 24h, les colonies ont été utilisées comme source d'ADN dans un mélange composé de 0,05 unité de Taq polymérase (VWR), 0,5 pmol de chaque primer, 10 mM de Tris/HCl pH 8,5, $(NH_4)_2SO_2$, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,1% deTween-20 (tampon VWR), 10mM de dNTPs. Le programme PCR utilisé est : 1 cycle 94°C pendant 4 minutes, 35 cycles 94°C 1 minutes, 52°C 1 minutes, 72°C (le temps paramétré en fonction de la longueur du fragment attendu : 45 sec pour 1kb). Les constructions ont été vérifiées par PCR à l'aide des amorces SLIC et par séquençage. La linéarisation vectorielle a été réalisée par digestion de nuit à l'aide d'*Eco*RI (Fermentas).

Transformation de *P. pastoris*: Les levures ont été rendues compétentes et transformées selon les instructions du kit Easycomp (Invitrogen).

Expression inductible des constructions : Les levures transformées sont cultivées dans un milieu WM8 supplémenté de 3 % de méthanol absolu pendant 1 semaine sous agitation (320 RMP) à 28°C. La présence du GFP dans le surnageant a été évaluée par stéréomicroscopie (GFP) ou par observation au GelDoc sous lumière bleu.

Milieux WM8 : 50 g/L de sucrose, 0,25 g/L de $NH_4H_2PO_4$, 2,8 g/L de NH_4Cl, 10 g/L de glutamate de sodium, 0,25 g/L de $MgCl_2{\cdot}6H_2O$, 0,1 g/L de $CaCl_2$ $2H_2O$, 2 g/L de KH_2PO_4, 0,55 g/L de $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 75 mg/L de myo-inositol, 1,75 mg/L de $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$, 0,5 mg/L de $FeSO_4{\cdot}7H2O$, 0,1 mg/L de $CuSO_4{\cdot}5H_2O$, 0,1 mg/L de $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, 0,1 mg/L de $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$, 10 mg/L d'acide nicotinique, 25 mg/L de

pyridoxin-HCl, 10 mg/L de thiamin-HCl, 2,5 mg/L de biotine, 50 mg/L de calcium pantothenate. **(Boettner et al., 2002).**

Purification et Infiltration : Le surnageant de *P. pastoris* enrichi dans l'effecteur cloné est obtenu après centrifugation à 13 000 x g. Les feuilles de *N. benthamiana* de 4 semaines sont infiltrées avec 50 µL de surnageant à l'aide d'une seringue de 1 mL.

8. Imagerie

Les photographies prises sous lumière blanche et bleue, ainsi que celles prises par observation sous loupe binoculaire et microscopie à épifluorescence, ont été réalisées tel que décrit dans **(Combier et al., 2019).** La quantification du signal GFP sur les photos prises sous lumière bleue est réalisée à l'aide du logiciel Gene-Tools sur la zone dessinée par quatre cercles pour chaque patch d'infiltration. Les photographies réalisées sous microscopie confocale ont été réalisées à la plateforme de microscopie de l'IBMP, Strasbourg, en utilisant le microscope confocal LSM780 (Zeiss).

9. Essais phytopathologiques

Plasmopara viticola : Des disques de 1 cm de la première feuille étalée de vigne préalablement transformé par les constructions des effecteurs testés sont déposés sur papier humide en boite de Pétri. Les spores de *P. viticola* sont obtenues à partir de feuilles infectées par incubation dans l'eau et agitation. Une suspension de 10^5 sp/ml de spores est appliquée par spray sur la face inférieure des disques de vigne de manière uniforme. Les disques sont maintenus 24h à l'obscurité puis 6 jours en chambre de Thermoplan à 21°C sous une photopériode de 16/8h (jour-nuit).

Botrytis cinera : Les feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées son détachées à 48 hpa et déposées sur papier humide dans des boites de Petri face inférieure vers le haut. De l'eau stérile est versée sur les boites de Pétri contenant le mycélium de *B. cinerea*, l'ensemble est raclé, les spores sont récupérées avec un cône de 5mL sectionné, déposées dans un Falcon de 50mL et agitées. Le contenu est filtré sur gaze et centrifugé 5 minutes à 250 x g. Le culot est re-suspendu dans 500 µL d'eau stérile. Si la concentration des spores récoltées est supérieure à 10^8 sp/mL, elles sont diluées à 5.10^5 sp/mL. Une goutte de spores est déposée sur la surface de la feuille. Les boites sont fermées au sparadrap micropore et sont ensuite placées sous lumière tamisée à 23°C jusqu'à observation des symptômes.

***Pseudomonas syringea* pv tomato DC3000** : La souche bacteriénne est étalée sur milieu solide NYGA supplémenté en Rifampicine (100 µg/mL) et Kanamycine (25 µg/mL), puis mise à incuber à l'obscurité pendant 48h à 28°C. Une colonie est transférée en culture liquide de NYGB supplémenté

en Rifampicine (100 µg/mL) et Kanamicine (25 µg/mL) et mis en culture à 28°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600} entre 0.6 et 1. Après centrifugation à 2500 x g pendant 10 minutes, le culot bactérien est resuspendu dans du $MgCl_2$ 10 mM. Les bactéries sont infiltrées dans les feuilles de *N. benthamiana* sur plante entière à une DO de 10^5 cfu/ml. Les plantes sont conservées dans des chambres humides sous une photopériode de 14/10h (jour-nuit) jusqu'à observation des symptômes.

Phytophthora parasitica : La souche est cultivée pendant 1 semaine en milieu liquide V8 clarifié à 24°C sous lumière continue. Le mycélium est lacéré et incubé 4 jours sur de l'agar 2%. Les spores sont libérées par choc thermique (1h à 4°C, suivie de 30 minutes à 37°C), de l'eau est ajoutée entre les deux incubations. La feuille de *N. benthamiana* est blessée à l'aide d'une seringue, puis 50 µL de spores sont infiltrés à 1 sp/mL. Les plantes sont conservées dans une humidité de 100% à 24 °C sous une photopériode de 14/10h (jour-nuit) jusqu'à observation des symptômes.

PVX : La souche d'agrobactérie contenant le clone viral est mise en culture liquide de milieu LB supplémenté de Kanamicine (50 µg/mL) et Tétracycline (2,5 µg/mL). Deux feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement sont agroinfiltrées par PVX-GFP dilué à 1/1000 d'une DO_{600} mesurée à 1. Les plantes sont conservées en laboratoire de confinement de niveau 2 jusqu'à apparition des symptômes. La propagation du virus est suivie sous lumière UV. Pour l'inoculation mécanique du virus, les feuilles infectées de *N. benthamiana* sont récoltées et broyées à l'aide d'un mortier dans le tampon d'inoculation. Du carbonum est saupoudré sur les feuilles transformées transitoirement par les effecteurs. Le broyat est appliqué par friction manuelle.

10. Analyses métabolomiques

Les feuilles de *N. benthamiana* sont agroinfiltrées par des souches d'*A. tumefaciens* porteuses de la construction 47Δsp et GFP. Pour minimiser la variabilité des échantillons, deux patchs d'infiltration sont faits par feuille avec chaque construction. Quarante-huit heures post-agroinfiltration, des disques des feuilles transformées sont récoltés, déshydratés à l'aide d'un lyophilisateur, pesés et broyés. Les extractions sont réalisées à 60°C pendant 45 minutes dans 100 µL de méthanol supplémenté de l'étalon Apigenin (1 µg/mL). Après vortex de 15 secondes, le mélange est centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes et le surnagent est transféré dans des vials en verre adaptés aux injecteurs automatiques.

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un système de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) Dionex Ultimate 3000, équipé d'une colonne Nucleodur C18 HTec (Macherey-Nagel, 150 mm x 2 mm diamètre interne, particules de 1,8 µm de diamètre) maintenue à 30 °C. L'éluant

utilisé est à 80 % d'eau, 19.9% d'acétonitrile et 0.1 % d'acide formique. Le débit est maintenu à 0,25 mL/min. Le volume d'échantillon injecté est de 1 µL.

La HPLC est couplée à un spectromètre de masse haute résolution Exactive (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) équipé d'une source à ionisation électrospray opérant en mode positif ou négatif. Les données sont traitées par les logiciels Xcalibur (processing setup, QuanBrowser). Pour l'analyse non ciblée, les données LC-MS ont été traitées par le package XCMS sur le logiciel R.

11. Coloration histochimique

Coloration DAB : Des disques foliaires issus de feuilles de *N. benthamiana* transformés transitoirement sont colorés avec du DAB (3,3'-diaminobenzidine) selon le protocole détaillé par **(Daudi et O'Brien, 2012)**

Bleu d'aniline : Des disques foliaires issus de feuilles de *N. benthamiana* transformées transitoirement sont incubés dans du méthanol absolu pendant une nuit pour fixer les tissus et décolorer les pigments chlorophylliens, puis 6h dans du chloral hydrate (2,5 g/mL) pour terminer la solubilisation des pigments. Les disques sont lavés trois fois dans du tampon phosphate disodique 0,1 M à pH 8 pendant 15 minutes puis colorés au bleu d'aniline (0,05% dans du tampon phosphate). Les disques sont montés entre lame et lamelle dans du bleu d'aniline face inferieur vers le haut pour l'observation au microscope sous un filtre 340/425 nm.

Bleu trypan : Les disques foliaires *de N. benthamiana* transformés transitoirement et inoculés par *B. cinerea* sont incubés dans 10 mL d'une solution de coloration au bleu Trypan (1 mL d'acide lactique, 1 mL de glycérol, 10 mL de phénol, 10 mg de bleu Trypan) pendant une nuit, puis incubés à 100 °C pendant 1 minute et décolorés deux fois au chloral hydrate (2,5 g/mL) pendant une heure. Les disques sont montés entre lame et lamelle dans 50 % (vol/vol) de glycérine/eau pour l'observation au microscope et au macroscope.

12. Immunoprécipitation

Extraction protéique : Six disques de feuilles transformées transitoirement sont figés dans l'azote liquide, broyés dans du tampon de lyse (10% de Glycérol, 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM d'EDTA pH 8.0, 150 mM de NaCl, 2% (w/v) de polyvinylpyrrolidone (PVP), 1 mM de DTT, 0.1% de Tween-20, supplémenté d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma P9599) sur glace et centrifugé à 3000 x g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnagent est conservé sur glace.

Immunoprécipitation : Les échantillons sont incubés avec des billes liées à des anticorps anti-GFP pendant 1 à 3 heures à 4°C sous agitation douce, puis centrifugé à 800 x g pendant 1 à 2 minutes. Le culot est lavé au tampon d'immunoprécipitation (10% de Glycérol, 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM d'EDTA pH 8.0, 150 mM de NaCl, 0.1% (v/v) de Tween-20) cinq fois, avec une centrifugation à 800 x g pendant 1 à 2 minutes entre les deux lavages. Le mélange est complété de 150 à 200 ng/µL de peptides FLAG (3x), puis incubé à 4°C pendant 30 min sous agitation douce et centrifugé. Le surnagent est additionné de tampon Laemmli, incubé 5 min à 95°C et centrifugé 1 min à 16 000 x g. Le surnagent est utilisé pour une migration SDS–PAGE selon la procédure décrite dans **(Combier et al., 2019)**. Les peptides sont digérés à la Trypsine et séparés par spectrométrie de masse (Maldi-ToF). Les résultats sont analysés avec le logiciel Scaffold avec un seuil d'identification des protéines égal à 95%, un nombre minimal de peptides uniques égal à 2 et un seuil d'identification de peptides égal à 95%

Références

Aboulela, M., Nakagawa, T., Oshima, A., Nishimura, K., and Tanaka, Y. (2018). The Arabidopsis COPII components, AtSEC23A and AtSEC23D, are essential for pollen wall development and exine patterning. J. Exp. Bot. *69*, 1615–1633.

Adlung, N., and Bonas, U. (2017). Dissecting virulence function from recognition: cell death suppression in Nicotiana benthamiana by XopQ/HopQ1-family effectors relies on EDS1-dependent immunity. Plant J. *91*, 430–442.

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014). Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. *98*, 5301–5317.

Ahmed, M.B., Santos, K.C.G.D., Sanchez, I.B., Petre, B., Lorrain, C., Plourde, M.B., Duplessis, S., Desgagné-Penix, I., and Germain, H. (2018). A rust fungal effector binds plant DNA and modulates transcription. Sci Rep *8*, 14718.

Alaimo, S., Marceca, G.P., Giugno, R., Ferro, A., and Pulvirenti, A. (2018). Current Knowledge and Computational Techniques for Grapevine Meta-Omics Analysis. Front Plant Sci *8.2241*.

Allègre, M., Héloir, M.-C., Trouvelot, S., Daire, X., Pugin, A., Wendehenne, D., and Adrian, M. (2009). Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? Molecular Plant-Microbe Interactions *22*, 977–986.

Allen, R.L.,Bittner-Eddy P.D.,Greenville-Briggs L.,Meitz J.C., Rehmany A.P., Rose L.E. and Beynon J.L. (2004). Host-Parasite Coevolutionary Conflict Between Arabidopsis and Downy Mildew. Science *306*, 1957–1960

Alvarez-Venegas, R., Sadder, M., Hlavacka, A., Baluška, F., Xia, Y., Lu, G., Firsov, A., Sarath, G., Moriyama, H., Dubrovsky, J.G., et al. (2006). The Arabidopsis homolog of trithorax, ATX1, binds phosphatidylinositol 5-phosphate, and the two regulate a common set of target genes. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 6049–6054.

Ambiaud, E. (2013). Fortes disparités de protection contre l'oïdium et le mildiou. Pratiques phytosanitaires dans la viticulture en 2010. 8p.

Andrivon, D., Bardin, M., Bertrand, C., Brun, L., Daire, X., Fabre, F., Gary, C., Montarry, J., Nicot, J., Reignault, P., et al. (2018). Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques ? INRA-DEPE 70.

Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., and Arce-Johnson, P. (2016). Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. Front Plant Sci *7*, 382.

Arnold, C., Gillet, F., and Gobat, J.-M. (1998). Situation de la vigne sauvage *Vitis vinifera* ssp. *silvestris* en Europe. Vitis *37*, 159–170.

Asai, S., and Shirasu, K. (2015). Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. Current Opinion in Plant Biology *28*, 1–8.

Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., and Keller, H. (2010). The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent Phytophthora parasitica infection. New Phytol. *187*, 449–460.

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.

Bae, C., Kim, S., Lee, D.J., and Choi, D. (2013). Multiple Classes of Immune-Related Proteases Associated with the Cell Death Response in Pepper Plants. PLoS One *8*. *e63533*

Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstädler, A., Lotti, C., De Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., et al. (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. Mol. Plant Microbe Interact. *21*, 30–39.

Bailey, K., Çevik, V., Holton, N., Byrne-Richardson, J., Sohn, K.H., Coates, M., Woods-Tör, A., Aksoy, H.M., Hughes, L., Baxter, L., et al. (2011). Molecular cloning of ATR5Emoy2 from Hyaloperonospora arabidopsidis, an avirulence determinant that triggers RPP5-mediated defense in Arabidopsis. Molecular Plant-Microbe Interactions *24*, 827–838.

Baize, D., Saby, N., and Deslais, W. (2007). Teneurs en huit éléments en traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. Résultats d'une collecte de données à l'échelon national. Rapport final simplifié.

Ballvora, A., Ercolano, M.R., Weiß, J., Meksem, K., Bormann, C.A., Oberhagemann, P., Salamini, F., and Gebhardt, C. (2002). The R1 gene for potato resistance to late blight (Phytophthora infestans) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. The Plant Journal *30*, 361–371.

Baribault, T.J., Skene, K.G., and Steele Scott, N. (1989). Genetic transformation of grapevine cells. Plant Cell Rep. *8*, 137–140.

Bartetzko, V., Sonnewald, S., Vogel, F., Hartner, K., Stadler, R., Hammes, U.Z., and Börnke, F. (2009). The Xanthomonas campestris pv. vesicatoria type III effector protein XopJ inhibits protein secretion: evidence for interference with cell wall-associated defense responses. Mol. Plant Microbe Interact. *22*, 655–664.

Bashandy, H., Jalkanen, S., and Teeri, T.H. (2015). Within leaf variation is the largest source of variation in agroinfiltration of Nicotiana benthamiana. Plant Methods *11-47*.

Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J. *7*, 1045–1053.

Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov *5*, 493–506.

Bavaresco, L., and Fregoni, C. (2001). Physiological Role and Molecular Aspects of Grapevine Stilbenic Compounds. In Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine, K.A. Roubelakis-Angelakis, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 153–182.

Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., et al. (2010). Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the Hyaloperonospora arabidopsidis genome. Science *330*, 1549–1551.

Beakes, G.W., Glockling, S.L., and Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete "fungi." Protoplasma *249*, 3–19.

Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Curr. Opin. Plant Biol. *7*, 391–399.

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. Theoretical and Applied Genetics *120*, 163–176.

Ben-Amar, A., Cobanov, P., Buchholz, G., Mliki, A., and Reustle, G. (2013). In planta agro-infiltration system for transient gene expression in grapevine (Vitis spp.). Acta Physiol Plant *35*, 3147–3156.

Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., and Baulcombe, D.C. (2000). Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. The Plant Journal *21*, 73–81.

Bengtsson, G., Ohlsson, L., and Rundgren, S. (1985). Influence of fungi on growth and survival of Onychiurus armatus (Collembola) in a metal polluted soil. Oecologia *68*, 63–68.

Bent, A.F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annu Rev Phytopathol *45*, 399–436.

Bernoux, M., Burdett, H., Williams, S.J., Zhang, X., Chen, C., Newell, K., Lawrence, G.J., Kobe, B., Ellis, J.G., Anderson, P.A., et al. (2016). Comparative Analysis of the Flax Immune Receptors L6 and L7 Suggests an Equilibrium-Based Switch Activation Model. Plant Cell *28*, 146–159.

Bezier, A. (2002). Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. Journal of Experimental Botany *53*, 2279–2280.

Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.-D., Young, C., Kamoun, S., and Haldar, K. (2006). The Malarial Host-Targeting Signal Is Conserved in the Irish Potato Famine Pathogen. PLoS Pathogens *2*, e50.

Bierne, H., and Cossart, P. (2012). When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. Cellular Microbiology *14*, 622–633.

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

Bitsadze, N., Aznarashvili, M., Vercesi, A., Chipashvili, R., and Failla, O. (2015). Screening of Georgian grapevine germplasm for susceptibility to downy mildew (Plasmopara viticola). VITIS *54*, 193–196.

Block, A., Toruño, T.Y., Elowsky, C.G., Zhang, C., Steinbrenner, J., Beynon, J., and Alfano, J.R. (2014). The Pseudomonas syringae type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the Arabidopsis transcription factor NTL9. New Phytologist *201*, 1358–1370.

Boddey, J.A., Hodder, A.N., Günther, S., Gilson, P.R., Patsiouras, H., Kapp, E.A., Pearce, J.A., de Koning-Ward, T.F., Simpson, R.J., Crabb, B.S., et al. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. Nature *463*, 627–631.

Boevink, P.C., Wang, X., McLellan, H., He, Q., Naqvi, S., Armstrong, M.R., Zhang, W., Hein, I., Gilroy, E.M., Tian, Z., et al. (2016). A Phytophthora infestans RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease. Nat Commun *7. 10311*.

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.

Bos, J.I.B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J., and Kamoun, S. (2006). The C-terminal half of Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in Nicotiana benthamiana. The Plant Journal *48*, 165–176.

Bos, J.I.B., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., et al. (2010). Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. PNAS *107*, 9909–9914.

Bouquet, A. (2009). Réductionsdes intrants phytosanitaires: les varietes de vignes resistantes aux parasites : vieille histoire ou nouvelles perspectives? Le Progrès agricole et viticole *126*, 234–243.

Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Wendehenne, D. (2011). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. New Phytologist *192*, 127–139.

Boutemy, L.S., King, S.R.F., Win, J., Hughes, R.K., Clarke, T.A., Blumenschein, T.M.A., Kamoun, S., and Banfield, M.J. (2011). Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins: A CONSERVED BUT ADAPTABLE FOLD UNDERPINS FUNCTIONAL DIVERSITY. Journal of Biological Chemistry *286*, 35834–35842.

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

Boyd, L.A., Ridout, C., O'Sullivan, D.M., Leach, J.E., and Leung, H. (2013). Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Trends in Genetics *29*, 233–240.

Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M., Huitema, E., van der Hoorn, R.A., et al. (2011). Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 20832–20837.

Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J., and Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. Current Opinion in Plant Biology *15*, 483–492.

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.

Breuer, C., Kawamura, A., Ichikawa, T., Tominaga-Wada, R., Wada, T., Kondou, Y., Muto, S., Matsui, M., and Sugimoto, K. (2009). The Trihelix Transcription Factor GTL1 Regulates Ploidy-Dependent Cell Growth in the Arabidopsis Trichome. Plant Cell *21*, 2307–2322.

Brigneti, G., Garcia-Mas, J., and Baulcombe, D.C. (1997). Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene Rysto in potato. Theor Appl Genet *94*, 198–203.

Brilli, M., Asquini, E., Moser, M., Bianchedi, P.L., Perazzolli, M., and Si-Ammour, A. (2018). A multi-omics study of the grapevine-downy mildew (Plasmopara viticola) pathosystem unveils a complex protein coding- and noncoding-based arms race during infection. Sci Rep *8.757*.

Browning, K.S. (1996). The plant translational apparatus. Plant Mol Biol *32*, 107–144.

Bruisson, S., Maillot, P., Schellenbaum, P., Walter, B., Gindro, K., and Deglène-Benbrahim, L. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis stimulates key genes of the phenylpropanoid biosynthesis and stilbenoid production in grapevine leaves in response to downy mildew and grey mould infection. Phytochemistry *131*, 92–99.

Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., et al. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to Leptosphaeria maculans in Brassica napus. New Phytologist *185*, 285–299.

Bultault, J.-P., Delame, N., Jacquet, F., and Zardet, G. (2011). L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction. Notes et études socio-économiques n°35, Centre d'étude et de prospectives, Service de la statistique et de la prospective, 24p.

van der Burgh, A.M., Postma, J., Robatzek, S., and Joosten, M.H.A.J. (2018). Kinase activity of SOBIR1 and BAK1 is required for immune signalling. Mol. Plant Pathol.

Burruano, S. (2000). The life-cycle of Plasmopara viticola, cause of downy mildew of vine. Mycologist *14*, 179–182.

Cai, Y.-M., Yu, J., and Gallois, P. (2014). Endoplasmic reticulum stress-induced PCD and caspase-like activities involved. Front Plant Sci *5.41*.

Caillaud, M.-C., Piquerez, S.J.M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J.D.G. (2012). Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. The Plant Journal *69*, 252–265.

Caillaud, M.-C., Asai, S., Rallapalli, G., Piquerez, S., Fabro, G., and Jones, J.D.G. (2013). A Downy Mildew Effector Attenuates Salicylic Acid–Triggered Immunity in Arabidopsis by Interacting with the Host Mediator Complex. PLoS Biology *11*, e1001732.

Caillaud, M.-C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S.J.M., Jones, A.M.E., Robatzek, S., Jones, J.D.G., and Faulkner, C. (2014). The Plasmodesmal Protein PDLP1 Localises to Haustoria-Associated Membranes during Downy Mildew Infection and Regulates Callose Deposition. PLOS Pathogens *10*, e1004496.

Casagrande, K., Falginella, L., Castellarin, S.D., Testolin, R., and Di Gaspero, G. (2011). Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. Planta *234*, 1097–1109.

Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A., and Ellis, J.G. (2006). Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. Plant Cell *18*, 243–256.

Catanzariti, A.-M., Lim, G.T.T., and Jones, D.A. (2015). The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. New Phytol. *207*, 106–118.

Cavalier-Smith, T., and Chao, E.E.-Y. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). J. Mol. Evol. *62*, 388–420.

Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., and Staskawicz, B.J. (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. Science *278*, 1963–1965.

Chalal, M., Winkler, J.B., Gourrat, K., Trouvelot, S., Adrian, M., Schnitzler, J.-P., Jamois, F., and Daire, X. (2015). Sesquiterpene volatile organic compounds (VOCs) are markers of elicitation by sulfated laminarine in grapevine. Front Plant Sci *6.350*.

Chaparro-Garcia, A., Schwizer, S., Sklenar, J., Yoshida, K., Petre, B., Bos, J.I.B., Schornack, S., Jones, A.M.E., Bozkurt, T.O., and Kamoun, S. (2015). Phytophthora infestans RXLR-WY Effector AVR3a Associates with Dynamin-Related Protein 2 Required for Endocytosis of the Plant Pattern Recognition Receptor FLS2. PLOS ONE *10*, e0137071.

Charron, C., Nicolaï, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., and Caranta, C. (2008). Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. Plant J. *54*, 56–68.

Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature *468*, 527–532.

Choi, S., Jayaraman, J., Segonzac, C., Park, H.-J., Park, H., Han, S.-W., and Sohn, K.H. (2017). Pseudomonas syringae pv. actinidiae Type III Effectors Localized at Multiple Cellular Compartments Activate or Suppress Innate Immune Responses in Nicotiana benthamiana. Front Plant Sci *8*, 2157.

Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Science *177*, 143–155.

Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., and Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with Botrytis cinerea. Journal of Experimental Botany *65*, 6589–6601.

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 ! Med Sci (Paris) *32*, 335–339.

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

Cock, P.J.A., Grüning, B.A., Paszkiewicz, K., and Pritchard, L. (2013). Galaxy tools and workflows for sequence analysis with applications in molecular plant pathology. PeerJ *1*, e167.

Colcol, J.F., and Baudoin, A.B. (2015). Sensitivity of Erysiphe necator and Plasmopara viticola in Virginia to QoI Fungicides, Boscalid, Quinoxyfen, Thiophanate Methyl, and Mefenoxam. Plant Disease *100*, 337–344.

Consonni, C., Bednarek, P., Humphry, M., Francocci, F., Ferrari, S., Harzen, A., Ver Loren van Themaat, E., and Panstruga, R. (2010). Tryptophan-derived metabolites are required for antifungal defense in the Arabidopsis mlo2 mutant. Plant Physiol. *152*, 1544–1561.

Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. Nature Reviews Immunology *16*, 537–552.

Cowger, C., and Mundt, C.C. (2002). Aggressiveness of Mycosphaerella graminicola Isolates from Susceptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. Phytopathology *92*, 624–630.

Dalmais, B., Schumacher, J., Moraga, J., LE Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G., and Viaud, M. (2011). The Botrytis cinerea phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. Mol. Plant Pathol. *12*, 564–579.

Das, Reddy, Upadhyaya, and Sopory (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (Vitis vinifera L.). Plant Cell Reports *20*, 999–1005.

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*.

Day, R.N., and Davidson, M.W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. Chem Soc Rev *38*, 2887–2921.

Dean, N., and Pelham, H.R. (1990). Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. The Journal of Cell Biology *111*, 369–377.

Dean, P., Scott, J.A., Knox, A.A., Quitard, S., Watkins, N.J., and Kenny, B. (2010). The Enteropathogenic E. coli Effector EspF Targets and Disrupts the Nucleolus by a Process Regulated by Mitochondrial Dysfunction. PLoS Pathog *6, e1000961.*

Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J.M., Lansac, M., Eyquard, J.P., García, J.A., Candresse, T., Le Gall, O., and Revers, F. (2006). Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. Mol. Plant Microbe Interact. *19*, 541–549.

Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.-H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M., and Delière, L. (2014). Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of Plasmopara viticola, the causal agent of grapevine downy mildew. Infection, Genetics and Evolution *27*, 500–508.

Demol, J. (2002). Amélioration des plantes: application aux principales espèces cultivées en régions tropicales (Presses Agronomiques de Gembloux).

Deng, W., Pu, X.A., Goodman, R.N., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1995). T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. Mol. Plant Microbe Interact. *8*, 538–548.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. *36*, W465-469.

Derevnina, L., Chin-Wo-Reyes, S., Martin, F., Wood, K., Froenicke, L., Spring, O., and Michelmore, R. (2015). Genome Sequence and Architecture of the Tobacco Downy Mildew Pathogen Peronospora tabacina. Molecular Plant-Microbe Interactions *28,* 1198-215.

Deslandes, L., and Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. Trends Plant Sci. *17*, 644–655.

Dietrich, C., and Maiss, E. (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected Nicotiana benthamiana plants. J. Gen. Virol. *84*, 2871–2876.

Diez-Navajas, A.M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C., and Merdinoglu, D. (2008). Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, Plasmopara viticola, studied at the tissue level. Phytopathology *98*, 776–780.

Ding, B., and Wang, G.-L. (2015). Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. Front Plant Sci *6,* 675.

Ding, B., Bellizzi, M. del R., Ning, Y., Meyers, B.C., and Wang, G.-L. (2012). HDT701, a Histone H4 Deacetylase, Negatively Regulates Plant Innate Immunity by Modulating Histone H4 Acetylation of Defense-Related Genes in Rice. The Plant Cell *24*, 3783–3794.

Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H.Y., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., and Tyler, B.M. (2008). RXLR-Mediated Entry of Phytophthora sojae Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. THE PLANT CELL ONLINE *20*, 1930–1947.

Dry, I.B., Feechan, A., Anderson, C., Jermakow, A.M., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., and Thomas, M.R. (2010). Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. Australian Journal of Grape and Wine Research *16*, 94–105.

Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., and Patel, D.J. (2015a). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. Nat Rev Mol Cell Biol *16*, 519–532.

Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L.C.P., Zhou, J., Liebrand, T.W.H., Xie, C., Govers, F., Robatzek, S., et al. (2015b). Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. Nature Plants *1*, 15034.

Du, Y., Mpina, M.H., Birch, P.R.J., Bouwmeester, K., and Govers, F. (2015c). Phytophthora infestans RXLR Effector AVR1 Interacts with Exocyst Component Sec5 to Manipulate Plant Immunity. Plant Physiol. *169*, 1975–1990.

Duan, D., Halter, D., Baltenweck, R., Tisch, C., Tröster, V., Kortekamp, A., Hugueney, P., and Nick, P. (2015). Genetic diversity of stilbene metabolism in Vitis sylvestris. J Exp Bot *66*, 3243–3257.

Dubos, B. (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. (Ed. Feret.).

Dubrovina, A.S., and Kiselev, K.V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. Planta *246*, 597–623.

Duchene, E., and Schneider, C. (2005). Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. Agronomy for Sustainable Development *25*, 93–99.

Dufayard, J.-F., Bettembourg, M., Fischer, I., Droc, G., Guiderdoni, E., Périn, C., Chantret, N., and Diévart, A. (2017). New Insights on Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase Orthologous Relationships in Angiosperms. Front Plant Sci *8*, 381.

Dufour, M.-C., Magnin, N., Dumas, B., Vergnes, S., and Corio-Costet, M.-F. (2016). High-throughput gene-expression quantification of grapevine defense responses in the field using microfluidic dynamic arrays. BMC Genomics *17,* 957.

Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol *42*, 185–209.

Dussert, Y., Gouzy, J., Richart-Cervera, S., Mazet, I.D., Delière, L., Couture, C., Legrand, L., Piron, M.-C., Mestre, P., and Delmotte, F. (2016). Draft Genome Sequence of Plasmopara viticola, the Grapevine Downy Mildew Pathogen. Genome Announc *4,* e00987-16.

Dussert, Y., Mazet, I.D., Couture, C., Gouzy, J., Piron, M.-C., Kuchly, C., Bouchez, O., Rispe, C., Mestre, P., and Delmotte, F. (2018). A high-quality grapevine downy mildew genome assembly reveals rapidly evolving and lineage-specific putative host adaptation genes. BioRxiv 350041.

Dutta, A., Choudhary, P., Caruana, J., and Raina, R. (2017). JMJ27, an Arabidopsis H3K9 histone demethylase, modulates defense against Pseudomonas syringae and flowering time. Plant J. *91*, 1015–1028.

Enkerli, K., Mims, C.W., and Hahn, M.G. (1997). Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete Phytophthora sojae. Can. J. Bot. *75*, 1493–1508.

Evangelisti, E. (2013). Analyse fonctionnelle de trois effecteurs RXLR de l'oomycète Phytophthora parasitica sécrétés au cours de la pénétration de la plante hôte. Université Nice-Sophia Antipolis.

Fang, Y., Jang, H.S., Watson, G.W., Wellappili, D.P., and Tyler, B.M. (2017). Distinctive Nuclear Localization Signals in the Oomycete Phytophthora sojae. Front Microbiol *8,* 10.

Faso, C., Chen, Y.-N., Tamura, K., Held, M., Zemelis, S., Marti, L., Saravanan, R., Hummel, E., Kung, L., Miller, E., et al. (2009). A Missense Mutation in the Arabidopsis COPII Coat Protein Sec24A Induces the Formation of Clusters of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. Plant Cell *21*, 3655–3671.

Fawke, S., Doumane, M., and Schornack, S. (2015). Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. Microbiol Mol Biol Rev *79*, 263–280.

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. The Plant Journal *76*, 661–674.

Fevre, R.L., Evangelisti, E., Rey, T., and Schornack, S. (2015). Modulation of Host Cell Biology by Plant Pathogenic Microbes. Annual Review of Cell and Developmental Biology *31*, 201–229.

Figueiredo, A., Martins, J., Sebastiana, M., Guerreiro, A., Silva, A., Matos, A.R., Monteiro, F., Pais, M.S., Roepstorff, P., and Coelho, A.V. (2017). Specific adjustments in grapevine leaf proteome discriminating resistant and susceptible grapevine genotypes to Plasmopara viticola. J Proteomics *152*, 48–57.

Fischer, I., Diévart, A., Droc, G., Dufayard, J.-F., and Chantret, N. (2016). Evolutionary Dynamics of the Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) Subfamily in Angiosperms. Plant Physiology *170*, 1595–1610.

Flor, H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept | Annual Review of Phytopathology. *9*, 275-296.

Fontaine, M.C., Austerlitz, F., Giraud, T., Labbé, F., Papura, D., Richard-Cervera, S., and Delmotte, F. (2013). Genetic signature of a range expansion and leap-frog event after the recent invasion of Europe by the grapevine downy mildew pathogen Plasmopara viticola. Mol. Ecol. *22*, 2771–2786.

Frith, M.C., Saunders, N.F.W., Kobe, B., and Bailey, T.L. (2008). Discovering Sequence Motifs with Arbitrary Insertions and Deletions. PLoS Computational Biology *4*, e1000071.

Furuya, S., Mochizuki, M., Aoki, Y., Kobayashi, H., Takayanagi, T., Shimizu, M., and Suzuki, S. (2011). Isolation and characterization of Bacillus subtilis KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. Biocontrol Science and Technology *21*, 705–720.

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., 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 PHYSIOLOGY *157*, 804–814.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ *25*, 486–541.

Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C.L., Noel Ellis, T.H., and Maule, A.J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. Plant J. *40*, 376–385.

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.

Gelvin, S.B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *67*, 16–37.

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*, 3–44.

Giannakopoulou, A., Steele, J.F.C., Segretin, M.E., Bozkurt, T.O., Zhou, J., Robatzek, S., Banfield, M.J., Pais, M., and Kamoun, S. (2015). Tomato I2 Immune Receptor Can Be Engineered to Confer Partial Resistance to the Oomycete *Phytophthora infestans* in Addition to the Fungus *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant-Microbe Interactions *28*, 1316–1329.

Giesbers, A.K.J., Pelgrom, A.J.E., Visser, R.G.F., Niks, R.E., Ackerveken, G.V. den, and Jeuken, M.J.W. (2017). Effector-mediated discovery of a novel resistance gene against Bremia lactucae in a nonhost lettuce species. New Phytologist *216*, 915–926.

Gill, H.K., and Garg, H. (2014). Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. Pesticides - Toxic Aspects. 197-230.

Gilroy, E.M., Taylor, R.M., Hein, I., Boevink, P., Sadanandom, A., and Birch, P.R. (2011). CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma membrane and is suppressed by Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a. New Phytol *190*, 653–666.

Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., and Gleba, Y. (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfected with noncompeting viral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 14701–14706.

Gisi, U., and Sierotzki, H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. Eur J Plant Pathol *122*, 157–167.

Glover, J.R., Andrews, D.W., Subramani, S., and Rachubinski, R.A. (1994). Mutagenesis of the amino targeting signal of Saccharomyces cerevisiae 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. J. Biol. Chem. *269*, 7558–7563.

Gobbin, D., Jermini, M., Loskill, B., Pertot, I., Raynal, M., and Gessler, C. (2005). Importance of secondary inoculum of Plasmopara viticola to epidemics of grapevine downy mildew. Plant Pathology *54*, 522–534.

Gobbin, D., Bleyer, G., Keil, S., Kassemeyer, H.H., and Gessler, C. (2007). Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. Plant Pathology *56*, 843–847.

Göhre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. Annual Review of Phytopathology *46*, 189–215.

Gómez-Zeledón, J., and Spring, O. (2018). Up-regulated RxLR effector genes of Plasmopara viticola in synchronized host-free stages and infected leaves of hosts with different susceptibility. Fungal Biology. *122*, 1125-1133

Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., and Lommel, S.A. (2008). Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. MPMI *21*, 1015–1026.

Griswold, M.G., Fullman, N., Hawley, C., Arian, N., Zimsen, S.R.M., Tymeson, H.D., Venkateswaran, V., Tapp, A.D., Forouzanfar, M.H., Salama, J.S., et al. (2018). Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet *392*, 1015–1035.

Guerreiro, A., Figueiredo, J., Sousa Silva, M., and Figueiredo, A. (2016). Linking Jasmonic Acid to Grapevine Resistance against the Biotrophic Oomycete Plasmopara viticola. Plasmopara Viticola *28*, 565.

Guyomard, H., This, P., Escudier, J.-L., and Georget, M. (2014). Filière vigne et produits de la vigne.

Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., et al. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen Phytophthora infestans. Nature *461*, 393–398.

Hansen, L.L., and Nielsen, M.E. (2017). Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? J. Exp. Bot. *69*, 59–68.

Hardham, A.R. (2007). Cell biology of plant-oomycete interactions. Cell. Microbiol. *9*, 31–39.

Hébert, D., Kikkert, J.R., Smith, F.D., and Reisch, B.I. (1993). Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. Plant Cell Reports *12*, 585–589.

Hein, I., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., and Birch, P.R.J. (2009). The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. Molecular Plant Pathology *10*, 547–562.

Hemstad, P.R., and Reisch, B.I. (1985). In vitro Production of Galls Induced by Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes on Vitis and Rubus. Journal of Plant Physiology *120*, 9–17.

Henry, G., Thonart, P., and Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. *16*, 257-268.

Hewezi, T., Juvale, P.S., Piya, S., Maier, T.R., Rambani, A., Rice, J.H., Mitchum, M.G., Davis, E.L., Hussey, R.S., and Baum, T.J. (2015). The Cyst Nematode Effector Protein 10A07 Targets and Recruits Host Posttranslational Machinery to Mediate Its Nuclear Trafficking and to Promote Parasitism in Arabidopsis. Plant Cell *27*, 891–907.

Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y. (2010). Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in Arabidopsis for nonhost resistance against anthracnose pathogens. Plant Cell *22*, 2429–2443.

Hiscox, J.A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. Nature Reviews Microbiology *5*, 119–127.

Hofmann, N.R. (2017). An Emerging Paradigm? RxLR Cleavage before Effector Secretion. The Plant Cell *29*, 1177–1178.

Hollomon, D.W. (2016). Fungicide resistance: facing the challenge – a review. Plant Protection Science *51*, 170–176.

Houterman, P.M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M.J., Cornelissen, B.J.C., Takken, F.L.W., and Rep, M. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus Fusarium oxysporum activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. Plant J. *58*, 970–978.

Hu, L., Wu, X., Li, H., Zhao, Q., Wang, Y., and Ye, J.-R. (2018). An effector, BxSapB1, induces cell death and contributes to virulence in the pine wood nematode Bursaphelenchus xylophilus. Mol. Plant Microbe Interact. 23

Huang, G., Liu, Z., Gu, B., Zhao, H., Jia, J., Fan, G., Meng, Y., Du, Y., and Shan, W. (2019). An RXLR effector secreted by Phytophthora parasitica is a virulence factor and triggers cell death in various plants. Molecular Plant Pathology.

Huang, J., Gu, L., Zhang, Y., Yan, T., Kong, G., Kong, L., Guo, B., Qiu, M., Wang, Y., Jing, M., et al. (2017). An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. Nature Communications *8*, 2051.

Huang, M., Sanchez-Moreiras, A.M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., and Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from Arabidopsis thaliana flowers, the sesquiterpene (E)-β-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. New Phytologist *193*, 997–1008.

Humphry, M., Reinstädler, A., Ivanov, S., Bisseling, T., and Panstruga, R. (2011). Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea er1 plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. Mol. Plant Pathol. *12*, 866–878.

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

Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T., and Jacobsen, S.E. (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. Chromosoma *112*, 308–315.

Jaouannet, M., Perfus-Barbeoch, L., Deleury, E., Magliano, M., Engler, G., Vieira, P., Danchin, E.G.J., Rocha, M.D., Coquillard, P., Abad, P., et al. (2012). A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. New Phytologist *194*, 924–931.

Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M. (2002). sPlants, Antifungal Activity, and Metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry *50*, 2731–2741.

Jiang, R.H.Y., and Tyler, B.M. (2012). Mechanisms and Evolution of Virulence in Oomycetes. Annual Review of Phytopathology *50*, 295–318.

Jiao, Y., Wang, D., Wang, L., Jiang, C., and Wang, Y. (2017). VqMAPKKK38 is essential for stilbene accumulation in grapevine. Hortic Res *4*, 17058.

Jin, H., Li, S., and Villegas, A. (2006). Down-Regulation of the 26S Proteasome Subunit RPN9 Inhibits Viral Systemic Transport and Alters Plant Vascular Development. Plant Physiol *142*, 651–661.

Jing, M., Guo, B., Li, H., Yang, B., Wang, H., Kong, G., Zhao, Y., Xu, H., Wang, Y., Ye, W., et al. (2016). A Phytophthora sojae effector suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated immunity by stabilizing plant Binding immunoglobulin Proteins. Nat Commun *7*. 11685

He, Z., Wang, Z., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., & Chory, J. (2000). Perception of Brassinosteroids by the Extracellular Domain of the Receptor Kinase BRI1. *Science, 288*(5475), 2360-2363.

Johnson, R. (1984). A Critical Analysis of Durable Resistance. Annual Review of Phytopathology *22*, 309–330.

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

Jones, J.T., Kumar, A., Pylypenko, L.A., Thirugnanasambandam, A., Castelli, L., Chapman, S., Cock, P.J.A., Grenier, E., Lilley, C.J., Phillips, M.S., et al. (2009). Identification and functional characterization of effectors in expressed sequence tags from various life cycle stages of the potato cyst nematode Globodera pallida. Molecular Plant Pathology *10*, 815–828.

Judelson, H.S. (2012). Dynamics and Innovations within Oomycete Genomes: Insights into Biology, Pathology, and Evolution. Eukaryotic Cell *11*, 1304–1312.

Judelson, H.S., and Blanco, F.A. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. Nature Reviews Microbiology *3*, 47–58.

Kadota, Y., Liebrand, T.W.H., Goto, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Menke, F.L.H., Torres, M.-A., Molina, A., Zipfel, C., Coaker, G., et al. (2019). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants. New Phytologist *0*.

Kale, S.D., and Tyler, B.M. (2011). Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. Cell. Microbiol. *13*, 1839–1848.

Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., et al. (2010). External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. Cell *142*, 284–295.

Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., and Taliansky, M. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses. Front Plant Sci *9*.

Kamoun, S. (1993). Extracellular Protein Elicitors from *Phytophthora* : Host-Specificity and Induction of Resistance to Bacterial and Fungal Phytopathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions *6*, 15.

van Kan, J.A. (2003). Infection strategies of Botrytis cinerea. In VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 669, pp. 77–90.

Kanneganti, T.-D., Huitema, E., Cakir, C., and Kamoun, S. (2006). Synergistic Interactions of the Plant Cell Death Pathways Induced by Phytophthora infestans Nep1-Like Protein PiNPP1.1 and INF1 Elicitin. MPMI *19*, 854–863.

Kanneganti, T.-D., Bai, X., Tsai, C.-W., Win, J., Meulia, T., Goodin, M., Kamoun, S., and Hogenhout, S.A. (2007). A functional genetic assay for nuclear trafficking in plants. The Plant Journal *50*, 149–158.

Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., and Terauchi, R. (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to Pseudomonas cichorii in Nicotiana benthamiana. Molecular Plant Pathology *4*, 383–391.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., and Angenon, G. (1997). An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Science *122*, 101–108.

Karczmarek, A., Overmars, H., Helder, J., and Goverse, A. (2004). Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. Mol. Plant Pathol. *5*, 343–346.

Kaur, N., Reumann, S., and Hu, J. (2009). Peroxisome Biogenesis and Function. Arabidopsis Book *7*.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. (2007). A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. Science *318*, 648–651.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protocols *10*, 845–858.

Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A.C., Balmuth, A.L., Robert-Seilaniantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D.J., MacLean, D., et al. (2011). Gene Gain and Loss during Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of Arabidopsis thaliana. PLoS Biol *9*. e100109

Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. Annual Review of Cell and Developmental Biology *22*, 159–180.

King, S.R.F., McLellan, H., Boevink, P.C., Armstrong, M.R., Bukharova, T., Sukarta, O., Win, J., Kamoun, S., Birch, P.R.J., and Banfield, M.J. (2014). Phytophthora infestans RXLR Effector PexRD2 Interacts with Host MAPKKKε to Suppress Plant Immune Signaling[W][OPEN]. Plant Cell *26*, 1345–1359.

Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., and Hirochika, H. (2005). Association of VvmybA1 Gene Expression with Anthocyanin Production in Grape (Vitis vinifera) Skin-color Mutants. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science *74*, 196–203.

Koeck, M., Hardham, A.R., and Dodds, P.N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. Cell. Microbiol. *13*, 1849–1857.

Koh, S., André, A., Edwards, H., Ehrhardt, D., and Somerville, S. (2005). Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible Erysiphe cichoracearum infections. Plant J. *44*, 516–529.

Kong, L., Qiu, X., Kang, J., Wang, Y., Chen, H., Huang, J., Qiu, M., Zhao, Y., Kong, G., Ma, Z., et al. (2017). A Phytophthora Effector Manipulates Host Histone Acetylation and Reprograms Defense Gene Expression to Promote Infection. Current Biology *27*, 981–991.

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[OPEN]. Plant Cell *30*, 285–299.

Kroj, T., Chanclud, E., Michel-Romiti, C., Grand, X., and Morel, J. (2016). Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. New Phytol *210*, 618–626.

Krzyzaniak, Y., Trouvelot, S., Negrel, J., Cluzet, S., Valls, J., Richard, T., Bougaud, A., Jacquens, L., Klinguer, A., Chiltz, A., et al. (2018). A Plant Extract Acts Both as a Resistance Inducer and an Oomycide Against Grapevine Downy Mildew. Front Plant Sci *9*. 1085

Kuersten, S., Ohno, M., and Mattaj, I.W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. Trends Cell Biol. *11*, 497–503.

Kumar, A., Ganini, D., and Mason, R.P. (2016). Role of cytochrome c in α-synuclein radical formation: implications of α-synuclein in neuronal death in Maneb- and paraquat-induced model of Parkinson's disease. Mol Neurodegener *11*. 70

Kuta, D.D., and Tripathi, L. (2005). Agrobacterium -induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium -mediated DNA transfer. African Journal of Biotechnology *4*, 752-757–757.

Kwaaitaal, M., Nielsen, M.E., Böhlenius, H., and Thordal-Christensen, H. (2017). The plant membrane surrounding powdery mildew haustoria shares properties with the endoplasmic reticulum membrane. J Exp Bot *68*, 5731–5743.

Lacomme, C., and Cruz, S.S. (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. PNAS *96*, 7956–7961.

Langcake, P., and Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. Physiological Plant Pathology *9*, 77–86.

Langcake, P. (Shell B.L., and Lovell, P.A. (1980). Light and electron microscopical studies of the infection of Vitis spp. by Plasmopara viticola, the downy mildew pathogen. Vitis - Berichte Ueber Rebenforschung Mit Dokumentation Der Weinbauforschung (Germany, F.R.).

Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α. J Biol Chem *282*, 5101–5105.

Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., and Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. Sci Rep *8*. 1618

Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., and Chong, J. (2009). Characterization of Vitis vinifera NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. BMC Plant Biology *9*, 54.

Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N., and Cooke, B.M. (2008). The Downy Mildews - Genetics, Molecular Biology and Control (Springer Netherlands).

Lecampion, C., Caranta, C., and Robaglia, C. (2009). La lutte pour la traduction : utilisation des facteurs d'initiation de la traduction eIF4E par les phytovirus à ARN. Virologie *13*, 223–232.

Lee, S., Fu, F., Xu, S., Lee, S.Y., Yun, D.-J., and Mengiste, T. (2016). Global Regulation of Plant Immunity by Histone Lysine Methyl Transferases. Plant Cell *28*, 1640–1661.

Legros, J.P., and Argelès, J. (2017). Henri Marès (1820-1901) vainqueur de l'oïdium. Etudes Héraultaises.

Leister, D. (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. Trends in Genetics *20*, 116–122.

Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., and Chen, Q. (2013). Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. J Vis Exp. *77*, 50521

Levadoux, L. (1956). LES POPULATIONS SAUVAGES ET CULTIVÉES DE VITIS VINIFERA L. 60.

Lévesque, C.A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J.P., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robideau, G.P., Thines, M., Win, J., et al. (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen Pythium ultimum reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biol *11*, R73.

Li, M.Z., and Elledge, S.J. (2012). SLIC: A Method for Sequence- and Ligation-Independent Cloning. In Gene Synthesis, J. Peccoud, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 51–59.

Li, H., Wang, H., Jing, M., Zhu, J., Guo, B., Wang, Y., Lin, Y., Chen, H., Kong, L., Ma, Z., et al. (2018a). A Phytophthora effector recruits a host cytoplasmic transacetylase into nuclear speckles to enhance plant susceptibility. Elife *7*. e40039

Li, R., Tee, C.-S., Jiang, Y.-L., Jiang, X.-Y., Venkatesh, P.N., Sarojam, R., and Ye, J. (2015a). A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of Nicotiana benthamiana against Potato virus X. Sci Rep *5*. 9682.

Li, S., Liu, L., Li, S., Gao, L., Zhao, Y., Kim, Y.J., and Chen, X. (2016). SUVH1, a Su(var)3-9 family member, promotes the expression of genes targeted by DNA methylation. Nucleic Acids Res. *44*, 608–620.

Li, X., Wu, J., Yin, L., Zhang, Y., Qu, J., and Lu, J. (2015b). Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in Vitis amurensis grapevine. Plant Physiology and Biochemistry *95*, 1–14.

Li, X., Bao, H., Wang, Z., Wang, M., Fan, B., Zhu, C., and Chen, Z. (2018b). Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies in Plant Immunity. Front Plant Sci *9*. 979

Li, Z.T., Dhekney, S.A., and Gray, D.J. (2011). Use of the VvMybA1 gene for non-destructive quantification of promoter activity via color histogram analysis in grapevine (Vitis vinifera) and tobacco. Transgenic Res. *20*, 1087–1097.

Liebrand, T.W.H., Smit, P., Abd-El-Haliem, A., de Jonge, R., Cordewener, J.H.G., America, A.H.P., Sklenar, J., Jones, A.M.E., Robatzek, S., Thomma, B.P.H.J., et al. (2012). Endoplasmic reticulum-quality

control chaperones facilitate the biogenesis of Cf receptor-like proteins involved in pathogen resistance of tomato. Plant Physiol. *159*, 1819–1833.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. Cell *56*, 801–813.

Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., and Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected Nicotiana benthamiana using quantitative real-time PCR. PLoS ONE *7*, e46451.

Liu, S., Zhang, C., Chao, N., Lu, J., and Zhang, Y. (2018a). Cloning, Characterization, and Functional Investigation of VaHAESA from Vitis amurensis Inoculated with Plasmopara viticola. Int J Mol Sci *19*.1204

Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., Xu, J., Liu, S., Chen, L., Chen, T., et al. (2014). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. Nature Communications *5*, 4686.

Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant J. *30*, 415–429.

Liu, Y., Lan, X., Song, S., Yin, L., Dry, I.B., Qu, J., Xiang, J., and Lu, J. (2018b). In Planta Functional Analysis and Subcellular Localization of the Oomycete Pathogen Plasmopara viticola Candidate RXLR Effector Repertoire. Front. Plant Sci. *9*. 286.

Lizamore, D., and Winefield, C. (2015). The addition of an organosilicone surfactant to Agrobacterium suspensions enables efficient transient transformation of in vitro grapevine leaf tissue at ambient pressure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) *120*, 607–615.

Lo Presti, L., and Kahmann, R. (2017). How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. Current Opinion in Plant Biology *38*, 19–24.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). The Dynamic Plant Cell Wall. Molecular Cell Biology. 4th Edition.

Lu, Y.-J., Schornack, S., Spallek, T., Geldner, N., Chory, J., Schellmann, S., Schumacher, K., Kamoun, S., and Robatzek, S. (2012). Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. Cellular Microbiology *14*, 682–697.

Ma, H., Xiang, G., Li, Z., Wang, Y., Dou, M., Su, L., Yin, X., Liu, R., Wang, Y., and Xu, Y. (2018). Grapevine VpPR10.1 functions in resistance to Plasmopara viticola through triggering a cell death-like defence response by interacting with VpVDAC3. Plant Biotechnol J *16*, 1488–1501.

Ma, K.-W., Flores, C., and Ma, W. (2011). Chromatin Configuration as a Battlefield in Plant-Bacteria Interactions1. Plant Physiol *157*, 535–543.

Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. Mol. Cell *54*, 263–272.

Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., and Willats, W.G.T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. Front Plant Sci *5*, 178.

Marchive, C., Léon, C., Kappel, C., Coutos-Thévenot, P., Corio-Costet, M.-F., Delrot, S., and Lauvergeat, V. (2013). Over-Expression of VvWRKY1 in Grapevines Induces Expression of Jasmonic Acid Pathway-Related Genes and Confers Higher Tolerance to the Downy Mildew. PLoS One *8*. e54185

Marco, Y.J., Ragueh, F., Godiard, L., and Froissard, D. (1990). Transcriptional activation of 2 classes of genes during the hypersensitive reaction of tobacco leaves infiltrated with an incompatible isolate of the phytopathogenic bacterium Pseudomonas solanacearum. Plant Mol. Biol. *15*, 145–154.

Massaroli, M., Moraga, J., Bastos Borges, K., Ramírez-Fernández, J., Viaud, M., González Collado, I., Durán-Patrón, R., and Hernández-Galán, R. (2013). A shared biosynthetic pathway for botcinins and botrylactones revealed through gene deletions. Chembiochem *14*, 132–136.

McCarthy, C.G.P., and Fitzpatrick, D.A. (2017). Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes. MSphere *2*, e00095-17.

McDonald, B.A., and Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu Rev Phytopathol *40*, 349–379.

McGovern, P.E. (2003). Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture (Princeton University Press).

McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., et al. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. PNAS *114*, E10309-E10318

McGowan, J., and Fitzpatrick, D.A. (2017). Genomic, Network, and Phylogenetic Analysis of the Oomycete Effector Arsenal. MSphere *2*, e00408-17.

McHale, L., Tan, X., Koehl, P., and Michelmore, R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biol *7*, 212.

McLellan, H., Boevink, P.C., Armstrong, M.R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S.C., Beynon, J.L., and Birch, P.R.J. (2013). An RxLR Effector from Phytophthora infestans Prevents Re-localisation of Two Plant NAC Transcription Factors from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. PLoS Pathog *9*. e1003670.

Mestre, P., and Baulcombe, D.C. (2006). Elicitor-Mediated Oligomerization of the Tobacco N Disease Resistance Protein. The Plant Cell *18*, 491–501.

Mestre, P., Piron, M.-C., and Merdinoglu, D. (2012). Identification of effector genes from the phytopathogenic Oomycete Plasmopara viticola through the analysis of gene expression in germinated zoospores. Fungal Biology *116*, 825–835.

Mestre, P., Carrere, S., Gouzy, J., Piron, M.-C., Tourvieille de Labrouhe, D., Vincourt, P., Delmotte, F., and Godiard, L. (2016). Comparative analysis of expressed CRN and RXLR effectors from two *Plasmopara* species causing grapevine and sunflower downy mildew. Plant Pathology 65: 767-781.

Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R., and Schulze-Lefert, P. (2009a). Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. The Plant Journal *57*, 986–999.

Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R., and Schulze-Lefert, P. (2009b). Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. Plant J. *57*, 986–999.

Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., and Baulcombe, D.C. (2002). Interaction between domains of a plant NBS–LRR protein in disease resistance-related cell death. EMBO J *21*, 4511–4519.

Moissiard, G., and Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. Mol. Plant Pathol. *5*, 71–82.

Montaigne, E., Coelho, A., and Khefifi, L. (2016). Economic issues and perspectives on innovation in new resistant grapevine varieties in France. Wine Economics and Policy *5*, 73–77.

Morgan, W., and Kamoun, S. (2007). RXLR effectors in plant pathogenic oomycetes. Current Opinion in Microbiology *10*, 1–7.

Mori, K. (2000). Tripartite Management of Unfolded Proteins in the Endoplasmic Reticulum. Cell *101*, 451–454.

Motion, G.B., Amaro, T.M.M.M., Kulagina, N., and Huitema, E. (2015). Nuclear processes associated with plant immunity and pathogen susceptibility. Brief Funct Genomics *14*, 243–252.

Muench, D.G., and Mullen, R.T. (2003). Peroxisome dynamics in plant cells: a role for the cytoskeleton. Plant Science *164*, 307–315.

Mukaihara, T., Tamura, N., and Iwabuchi, M. (2010). Genome-wide identification of a large repertoire of Ralstonia solanacearum type III effector proteins by a new functional screen. Mol. Plant Microbe Interact. *23*, 251–262.

Munro, S., and Pelham, H.R.B. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell *48*, 899–907.

Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F., Aradhya, M.K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J.-M., Ware, D., et al. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. PNAS *108*, 3530–3535.

Nakajima, I., Ban, Y., Azuma, A., Onoue, N., Moriguchi, T., Yamamoto, T., Toki, S., and Endo, M. (2017). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. PLOS ONE *12*, e0177966.

Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmler, K., Hause, G., Aurich, A.-C., Dorn, R., Jenuwein, T., et al. (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. EMBO J *24*, 1418–1429.

Negrel, L., Halter, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Rustenholz, C., Merdinoglu, D., Hugueney, P., and Baltenweck, R. (2018). Identification of Lipid Markers of Plasmopara viticola Infection in Grapevine Using a Non-targeted Metabolomic Approach. Front Plant Sci *9*. 360.

Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. The Plant Journal *51*, 1126–1136.

Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., and Eisenhaber, F. (2003a). Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. J. Mol. Biol. *328*, 567–579.

Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A., and Eisenhaber, F. (2003b). Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. J. Mol. Biol. *328*, 581–592.

Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomènech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., et al. (2006). An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. Plant J. *48*, 452–462.

Noirot, E., Der, C., Lherminier, J., Robert, F., Moricova, P., Kiêu, K., Leborgne-Castel, N., Simon-Plas, F., and Bouhidel, K. (2014). Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. J Exp Bot *65*, 5011–5022.

Oh, S.-K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Win, J., Bos, J.I.B., Liu, H.-Y., van Damme, M., et al. (2009). In Planta Expression Screens of Phytophthora infestans RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the Solanum bulbocastanum Disease Resistance Protein Rpi-blb2. Plant Cell *21*, 2928–2947.

OIV (2009). Liste des descripteurs OIV pour les variétés et espèces de Vitis (2ème édition).

O'Leary, B.M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H.N., and Preston, G.M. (2014). The Infiltration-centrifugation Technique for Extraction of Apoplastic Fluid from Plant Leaves Using Phaseolus vulgaris as an Example. J Vis Exp. 94, 52113

Osterrieder, A., Hummel, E., Carvalho, C.M., and Hawes, C. (2010). Golgi membrane dynamics after induction of a dominant-negative mutant Sar1 GTPase in tobacco. J Exp Bot *61*, 405–422.

Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. New Phytol. *183*, 190–199.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathology *58*, 409–424.

Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J. (1996). Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to Peronospora parasitica specified by several different RPP genes. Plant Cell *8*, 2033–2046.

Parlevliet, J.E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. Euphytica *124*, 147–156.

Pecrix, Y., Buendia, L., Penouilh-Suzette, C., Maréchaux, M., Legrand, L., Bouchez, O., Rengel, D., Gouzy, J., Cottret, L., Vear, F., et al. (2019). Sunflower resistance to multiple downy mildew pathotypes revealed by recognition of conserved effectors of the oomycete Plasmopara halstedii. Plant J.

Pennini, M.E., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., and Subtil, A. (2010). Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. PLoS Pathog. *6*, e1000995.

Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y., and Pertot, I. (2008). Induction of systemic resistance against Plasmopara viticola in grapevine by Trichoderma harzianum T39 and benzothiadiazole. Biological Control *47*, 228–234.

Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., and Mestre, P. (2010). Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. BMC Plant Biology *10*, 147.

Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M., and Holland, D. (1996). Establishment of an Agrobacterium-mediated transformation system for grape (Vitis vinifera L.): the role of antioxidants during grape-Agrobacterium interactions. Nat. Biotechnol. *14*, 624–628.

Péros, J.-P., Berger, G., Portemont, A., Boursiquot, J.-M., and Lacombe, T. (2011). Genetic variation and biogeography of the disjunct Vitis subg. Vitis (Vitaceae). Journal of Biogeography *38*, 471–486.

Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? PLoS Biology *12*, e1001801.

Petre, B., Saunders, D.G.O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K.V., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. (2016). Heterologous Expression Screens in Nicotiana benthamiana Identify a Candidate Effector of the Wheat Yellow Rust Pathogen that Associates with Processing Bodies. PLoS One *11*. e0149035.

Pierre, O., Hopkins, J., Combier, M., Baldacci, F., Engler, G., Brouquisse, R., Hérouart, D., and Boncompagni, E. (2014). Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules. New Phytologist 202, 849-863.

Pinedo, C., Wang, C.-M., Pradier, J.-M., Dalmais, B., Choquer, M., Le Pêcheur, P., Morgant, G., Collado, I.G., Cane, D.E., and Viaud, M. (2008). Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen Botrytis cinerea. ACS Chem. Biol. *3*, 791–801.

Poni, S., Chiari, G., Caffi, T., Bove, F., Tombesi, S., Moncalvo, A., and Gatti, M. (2017). Canopy physiology, vine performance and host-pathogen interaction in a fungi resistant cv. Sangiovese x Bianca accession vs. a susceptible clone. Sci Rep *7*. 6097.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y., and Roby, D. (1994). hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. Plant J. *5*, 507–521.

Popgeorgiev, N., Jabbour, L., and Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. Front. Cell Dev. Biol. *6*. 13.

Poque, S., Pagny, G., Ouibrahim, L., Chague, A., Eyquard, J.-P., Caballero, M., Candresse, T., Caranta, C., Mariette, S., and Decroocq, V. (2015). Allelic variation at the rpv1 locus controls partial resistance to Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology *15*, 159.

Pu, X., and Goodman, R.N. (1992). Induction of necrogenesis by Agrobacterium tumefaciens on grape explants. Physiological and Molecular Plant Pathology *41*, 241–254.

Pumplin, N., and Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. Nature Reviews Microbiology *11*, 745–760.

Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M.U., Kogel, K.-H., and Schäfer, P. (2012). The Mutualistic Fungus Piriformospora indica Colonizes Arabidopsis Roots by Inducing an Endoplasmic Reticulum Stress–Triggered Caspase-Dependent Cell Death[C][W]. Plant Cell *24*, 794–809.

Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., Wang, X., Liu, X., Xiang, Q., Jiang, S., et al. (2013). Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. Nature Genetics *45*, 330–333.

Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W. (2015). Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. Proc Natl Acad Sci U S A *112*, 5850–5855.

Ramirez-Prado, J.S., Piquerez, S.J.M., Bendahmane, A., Hirt, H., Raynaud, C., and Benhamed, M. (2018). Modify the Histone to Win the Battle: Chromatin Dynamics in Plant–Pathogen Interactions. Front Plant Sci *9*. 355

Ramírez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Chong, J., Laloue, H., Stempien, E., Abou-Mansour, E., Fontaine, F., Larignon, P., Mazet-Kieffer, F., Farine, S., et al. (2014). Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defence gene expression patterns and necrosis in Vitis vinifera cv. Chardonnay cells. Protoplasma *251*, 1417–1426.

Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., and Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. Plant J. *68*, 100–113.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature *406*, 593–599.

Rehman, S., Gupta, V.K., and Goyal, A.K. (2016). Identification and functional analysis of secreted effectors from phytoparasitic nematodes. BMC Microbiol *16*. 48

Reumann, S. (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. Plant Physiol. *135*, 783–800.

Reuveni, M., Zahavi, T., and Cohen, Y. (2001). Controlling downy mildew (Plasmopara viticola) in field-grown grapevine with β-aminobutyric acid (BABA). Phytoparasitica *29*, 125–133.

Richter, F., Gabby, L., McDowell, K.A., Mulligan, C.K., De La Rosa, K., Sioshansi, P.C., Mortazavi, F., Cely, I., Ackerson, L.C., Tsan, L., et al. (2017). Effects of decreased dopamine transporter levels on nigrostriatal neurons and paraquat/maneb toxicity in mice. Neurobiol Aging *51*, 54–66.

Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, L.A., and Robinson, D.G. (2002). Reevaluation of the Effects of Brefeldin A on Plant Cells Using Tobacco Bright Yellow 2 Cells Expressing Golgi-Targeted Green Fluorescent Protein and COPI Antisera. The Plant Cell *14*, 237–261.

Robin, G.P., Kleemann, J., Neumann, U., Cabre, L., Dallery, J.-F., Lapalu, N., and O'Connell, R.J. (2018). Subcellular Localization Screening of Colletotrichum higginsianum Effector Candidates Identifies Fungal Proteins Targeted to Plant Peroxisomes, Golgi Bodies, and Microtubules. Front. Plant Sci. *9*. 562

Ron, M., and Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. Plant Cell *16*, 1604–1615.

Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. J. Gen. Virol. *88*, 1029–1033.

Roupe, K.A., Remsberg, C.M., Yáñez, J.A., and Davies, N.M. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. Curr Clin Pharmacol *1*, 81–101.

Rouxel, M., Mestre, P., Comont, G., Lehman, B.L., Schilder, A., and Delmotte, F. (2013). Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. New Phytol. *197*, 251–263.

Rouxel, M., Mestre, P., Baudoin, A., Carisse, O., Delière, L., Ellis, M.A., Gadoury, D., Lu, J., Nita, M., Richard-Cervera, S., et al. (2014). Geographic distribution of cryptic species of Plasmopara viticola causing downy mildew on wild and cultivated grape in eastern North America. Phytopathology *104*, 692–701.

Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). Plant J. *32*, 1067–1075.

Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L., and Caranta, C. (2005). The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. Mol. Genet. Genomics *274*, 346–353.

Sabater, B., and Martín, M. (2013). Hypothesis: increase of the ratio singlet oxygen plus superoxide radical to hydrogen peroxide changes stress defense response to programmed leaf death. Front Plant Sci 25. 479

Salvesen, G.S., Hempel, A., and Coll, N.S. (2016). Protease Signaling in Animal and Plant Regulated Cell Death. FEBS J *283*, 2577–2598.

Sansome, F.W. (1940). Breeding Disease-Resistant Plants. Nature *145*, 690–693.

Santos-Rosa, M., Poutaraud, A., Merdinoglu, D., and Mestre, P. (2008). Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. Plant Cell Reports *27*, 1053–1063.

Sapoukhina, N., Durel, C.-E., and Le Cam, B. (2009). Spatial deployment of gene-for-gene resistance governs evolution and spread of pathogen populations. Theor Ecol *2*, 229.

Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., et al. (2015). A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. Cell *161*, 1089–1100.

Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D.G., and Krasileva, K.V. (2016). Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. BMC Biol *14*. 8

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. The Plant Journal *62*, 840–851.

Schnee, S., Viret, O., and Gindro, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology *72*, 128–133.

Schornack, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., et al. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. Molecular Plant Pathology *10*, 795–803.

Schornack, S., Damme, M. van, Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. PNAS *107*, 17421–17426.

Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., and Staskawicz, B.J. (1996). Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. Science *274*, 2063–2065.

Sédillot, B., and Poullette, B. (2016). Pratiques culturales en viticulture 2013. Réduire la dose, une pratique répandue pour les traitements fongicides.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry *46*, 941–950.

Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A., and Kuchuk, N.V. (2007). Comparison of several Nicotiana species as hosts for high-scale Agrobacterium-mediated transient expression. Biotechnol. Bioeng. *96*, 608–614.

Shen, Q.-H., Zhou, F., Bieri, S., Haizel, T., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2003). Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley Mla disease resistance genes to the powdery mildew fungus. Plant Cell *15*, 732–744.

Shen, Q.-H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. Science *315*, 1098–1103.

Shibata, Y., Kawakita, K., and Takemoto, D. (2010). Age-related resistance of Nicotiana benthamiana against hemibiotrophic pathogen Phytophthora infestans requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. Mol. Plant Microbe Interact. *23*, 1130–1142.

Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y.F., Talbot, N.J., and Sharon, A. (2011). Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus Botrytis cinerea from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. PLoS Pathog. *7*, e1002185.

Siemann, E.H., and Creasy, L.L. (1992). Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. Am J Enol Vitic. *43*, 49–52.

Small, J.K., and Rydberg, P.A. (1913). Flora of the southeastern United States; being descriptions of the seed-plants, ferns and fern-allies growing naturally in North Carolina, South Carolina, Georgia, Florida, Tennessee, Alabama, Mississippi, Arkansas, Louisiana, and in Oklahoma and Texas east of the one hundredth meridian, 2nd ed. VII 1394p. NewYork

Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The Ubiquitin 26s Proteasome Proteolytic Pathway. Annual Review of Plant Biology *55*, 555–590.

Song, J., and Bent, A.F. (2014). Microbial Pathogens Trigger Host DNA Double-Strand Breaks Whose Abundance Is Reduced by Plant Defense Responses. PLoS Pathog *10*. e1004030

Song, T., Ma, Z., Shen, D., Li, Q., Li, W., Su, L., Ye, T., Zhang, M., Wang, Y., and Dou, D. (2015). An Oomycete CRN Effector Reprograms Expression of Plant HSP Genes by Targeting their Promoters. PLOS Pathogens *11*, e1005348.

Soppe, W.J.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., and Fransz, P.F. (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. EMBO J *21*, 6549–6559.

Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. Nat Protoc *1*, 2019–2025.

St Clair, D.A. (2010). Quantitative disease resistance and quantitative resistance Loci in breeding. Annu Rev Phytopathol *48*, 247–268.

Stagg, S.M., Gürkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T.R., Potter, C.S., Carragher, B., and Balch, W.E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. Nature *439*, 234–238.

Stam, R., Jupe, J., Howden, A.J.M., Morris, J.A., Boevink, P.C., Hedley, P.E., and Huitema, E. (2013). Identification and Characterisation CRN Effectors in Phytophthora capsici Shows Modularity and Functional Diversity. PLoS ONE *8*, e59517.

Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., and Keen, N.T. (1984). Cloned avirulence gene of Pseudomonas syringae pv. glycinea determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *81*, 6024–6028.

Stassen, J.H.., and Van den Ackerveken, G. (2011). How do oomycete effectors interfere with plant life? Curr Opin Plant Biol *14*, 407:414.

Stassen, J.H.M., Boer, E. den, Vergeer, P.W.J., Andel, A., Ellendorff, U., Pelgrom, K., Pel, M., Schut, J., Zonneveld, O., Jeuken, M.J.W., et al. (2013). Specific In Planta Recognition of Two GKLR Proteins of the Downy Mildew Bremia lactucae Revealed in a Large Effector Screen in Lettuce. MPMI *26*, 1259–1270.

Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F., and Graner, A. (2005). The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in Hordeum vulgare (L.). Plant J. *42*, 912–922.

Steinbrenner, A.D., Goritschnig, S., and Staskawicz, B.J. (2015). Recognition and activation domains contribute to allele-specific responses of an Arabidopsis NLR receptor to an oomycete effector protein. PLoS Pathog. *11*, e1004665.

Su, H., Jiao, Y.-T., Wang, F.-F., Liu, Y.-E., Niu, W.-L., Liu, G.-T., and Xu, Y. (2018). Overexpression of VpPR10.1 by an efficient transformation method enhances downy mildew resistance in V. vinifera. Plant Cell Rep *37*, 819–832.

Sun, F., Kale, S.D., Azurmendi, H.F., Li, D., Tyler, B.M., and Capelluto, D.G.S. (2013). Structural basis for interactions of the Phytophthora sojae RxLR effector Avh5 with phosphatidylinositol 3-phosphate and for host cell entry. Mol. Plant Microbe Interact. *26*, 330–344.

Tack, A.J.M., Thrall, P.H., Barrett, L.G., Burdon, J.J., and Laine, A.-L. (2012). Variation in infectivity and aggressiveness in space and time in wild host–pathogen systems: causes and consequences. Journal of Evolutionary Biology *25*, 1918–1936.

Takemoto, D., Jones, D.A., and Hardham, A.R. (2003). GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of Arabidopsis by oomycete pathogens. The Plant Journal *33*, 775–792.

This, P., Lacombe, T., and Thomas, M. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in Genetics *22*, 511–519.

Thomma, B.P., Nürnberger, T., and Joosten, M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. The Plant Cell Online *23*, 4–15.

Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F., and Day, B. (2011). 454 Genome sequencing of Pseudoperonospora cubensis reveals effector proteins with a QXLR translocation motif. Mol. Plant Microbe Interact. *24*, 543–553.

Tisserant, L.-P., Aziz, A., Jullian, N., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., and Boitel-Conti, M. (2016). Enhanced Stilbene Production and Excretion in Vitis vinifera cv Pinot Noir Hairy Root Cultures. Molecules *21*, 1703.

Toffolatti, S.L., De Lorenzis, G., Costa, A., Maddalena, G., Passera, A., Bonza, M.C., Pindo, M., Stefani, E., Cestaro, A., Casati, P., et al. (2018). Unique resistance traits against downy mildew from the center of origin of grapevine (Vitis vinifera). Scientific Reports *8*. 12523

Torto, T.A., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N.A., van West, P., and Kamoun, S. (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen Phytophthora. Genome Research *13*, 1675–1685.

Toruño, T.Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. (2016). Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. Annu Rev Phytopathol *54*, 419–441.

Tourvieille de Labrouhe, D., Mestries, E., and Walser, P. (2005). Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? Oléagineux, Corps gras, Lipides *12*, 85–93.

Trouvelot, S., Varnier, A.-L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., et al. (2008). A β-1, 3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against Plasmopara viticola through priming of defense responses, including HR-like cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions *21*, 232–243.

Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., van Tuinen, D., Adrian, M., and Wipf, D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. Agron. Sustain. Dev. *35*, 1449–1467.

Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A., and Gingeras, T.R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastoris. Nucleic Acids Res. *15*, 3859–3876.

Tyler, B.M. (2002). Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. Annual Review in Phytopathology *40*, 137–167.

Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., et al. (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. Science *313*, 1261–1266.

Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., et al. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. Cell Death & Differentiation *18*, 1241–1246.

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.

Velásquez, A.C., Chakravarthy, S., and Martin, G.B. (2009). Virus-induced gene silencing (VIGS) in Nicotiana benthamiana and tomato. Journal of Visualized Experiments: JoVE. *28*, 1292

Vijayapalani, P., Hewezi, T., Pontvianne, F., and Baum, T.J. (2018). An Effector from the Cyst Nematode Heterodera schachtii Derepresses Host rRNA Genes by Altering Histone Acetylation. Plant Cell. *30*, 2795-2812

Vleeshouwers, V.G.A.A., and Oliver, R.P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. Mol. Plant Microbe Interact. *27*, 196–206.

Vleeshouwers, V.G.A.A., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.-K., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G.F., et al. (2008). Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and Phytophthora Infestans Avirulence Genes. PLoS ONE *3*, e2875.

Volle, M.-J., BOYER, G., and REYNE, J. (2007). Les inventeurs d'hybrides au secours du vignoble.

Völz, R., Kim, S.-K., Mi, J., Mariappan, K.G., Guo, X., Bigeard, J., Alejandro, S., Pflieger, D., Rayapuram, N., Al-Babili, S., et al. (2018). The Trihelix transcription factor GT2-like 1 (GTL1) promotes salicylic acid metabolism, and regulates bacterial-triggered immunity. PLOS Genetics *14*, e1007708.

van der Vossen, E.A., van der Voort, J.N., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D.C., Bakker, J., Stiekema, W.J., and Klein-Lankhorst, R.M. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. Plant J. *23*, 567–576.

Wang, C., Wu, J., Zhang, Y., and Lu, J. (2018a). Muscadinia rotundifolia 'Noble' defense response to Plasmopara viticola inoculation by inducing phytohormone-mediated stilbene accumulation. Protoplasma *255*, 95–107.

Wang, F., Shang, Y., Fan, B., Yu, J.-Q., and Chen, Z. (2014). Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. PLoS Pathog *10*. :e1004243

Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y., Zhou, X., Song, Z., and Cai, M. (2017a). Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in Pichia pastoris. Sci Rep *7*.

Wang, Q.-Y., Zhou, D.-M., and Cang, L. (2009). Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. Soil Biology and Biochemistry *41*, 1504–1509.

Wang, S., Boevink, P.C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S.C., and Birch, P.R.J. (2017b). Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from Phytophthora infestans haustoria by distinct secretion pathways. New Phytol. *216*, 205–215.

Wang, S., McLellan, H., Bukharova, T., He, Q., Murphy, F., Shi, J., Sun, S., van Weymers, P., Ren, Y., Thilliez, G., et al. (2018b). Phytophthora infestans RXLR effectors act in concert at diverse subcellular localisations to enhance host colonisation. J. Exp. Bot. *70*, 343 -356.

Waters, E.J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K.F., Colby, C., O'neill, B.K., Høj, P.B., and Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. Australian Journal of Grape and Wine Research *11*, 215–225.

Watson, P., and Stephens, D.J. (2005). ER-to-Golgi transport: Form and formation of vesicular and tubular carriers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1744*, 304–315.

Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., Apostolakis, K., Linne, U., Zhukov, I., Stanek, J., Koźmiński, W., Davidson, I., Secombes, C.J., et al. (2017). The RxLR Motif of the Host Targeting Effector AVR3a of Phytophthora infestans Is Cleaved Before Secretion. Plant Cell tpc.*29*, 1184-1195.

Weigele, B.A., Orchard, R.C., Jimenez, A., Cox, G.W., and Alto, N.M. (2017). A systematic exploration of the interactions between bacterial effector proteins and host cell membranes. Nat Commun *8, 532*.

Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. Nature *450*, 115–118.

Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S., and Menzies, N. (2010). Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems. Fungicides. Odile Carisse, IntechOpen.

Wightwick, A.M., Mollah, M.R., Partington, D.L., and Allinson, G. (2008). Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. J. Agric. Food Chem. *56*, 2457–2464.

Wildermuth, M.C., Steinwand, M.A., McRae, A.G., Jaenisch, J., and Chandran, D. (2017). Adapted Biotroph Manipulation of Plant Cell Ploidy. Annu Rev Phytopathol *55*, 537–564.

Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., and Kamoun, S. (2007a). Adaptive Evolution Has Targeted the C-Terminal Domain of the RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. Plant Cell *19*, 2349–2369.

Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., and Kamoun, S. (2007b). Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. Plant Cell *19*, 2349–2369.

Wong, F.P., Burr, H.N., and Wilcox, W.F. (2001). Heterothallism in Plasmopara viticola. Plant Pathology *50*, 427–432.

Wu, C.-H., Derevnina, L., and Kamoun, S. (2018). Receptor networks underpin plant immunity. Science *360*, 1300–1301.

Xiang, J., Li, X., Wu, J., Yin, L., Zhang, Y., and Lu, J. (2016). Studying the Mechanism of Plasmopara viticola RxLR Effectors on Suppressing Plant Immunity. Front Microbiol *7,* 709.

Xiang, J., Li, X., Yin, L., Liu, Y., Zhang, Y., Qu, J., and Lu, J. (2017). A candidate RxLR effector from Plasmopara viticola can elicit immune responses in Nicotiana benthamiana. BMC Plant Biology *17,* 75.

Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C., and Liu, Y. (2012). Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. The Plant Journal *72*, 57–69.

Xu, Y.-P., Zheng, L.-P., Xu, Q.-F., Wang, C.-C., Zhou, X.-P., Wu, Z.-J., and Cai, X.-Z. (2007). Efficiency for Gene Silencing Induction in Nicotiana Species by a Viral Satellite DNA Vector. Journal of Integrative Plant Biology *49*, 1726–1733.

Yin, L., Li, X., Xiang, J., Qu, J., Zhang, Y., Dry, I.B., and Lu, J. (2015). Characterization of the secretome of Plasmopara viticola by de novo transcriptome analysis. Physiological and Molecular Plant Pathology *91*, 1–10.

Yin, L., An, Y., Qu, J., Li, X., Zhang, Y., Dry, I., Wu, H., and Lu, J. (2017). Genome sequence of Plasmopara viticola and insight into the pathogenic mechanism. Scientific Reports *7*, 46553.

Yoo, C.Y., Pence, H.E., Jin, J.B., Miura, K., Gosney, M.J., Hasegawa, P.M., and Mickelbart, M.V. (2010). The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. Plant Cell *22*, 4128–4141.

Yu, X., Tang, J., Wang, Q., Ye, W., Tao, K., Duan, S., Lu, C., Yang, X., Dong, S., Zheng, X., et al. (2012). The RxLR effector Avh241 from Phytophthora sojae requires plasma membrane localization to induce plant cell death. New Phytologist *196*, 247–260.

Zhang, H., and Liu, Y. (2014). VIGS Assays. BIO-PROTOCOL *4*.

Zhang, Z., and Thomma, B.P.H.J. (2014). Virus-induced gene silencing and Agrobacterium tumefaciens-mediated transient expression in Nicotiana tabacum. Methods Mol. Biol. *1127*, 173–181.

Zhang, W., Manawasinghe, I.S., Zhao, W., Xu, J., Brooks, S., Zhao, X., Hyde, K.D., Chethana, K.W.T., Liu, J., Li, X., et al. (2017a). Multiple gene genealogy reveals high genetic diversity and evidence for multiple origins of Chinese Plasmopara viticola population. Sci Rep *7,* 17304.

Zhang, X., Zhou, Y., Li, Y., Fu, X., and Wang, Q. (2017b). Screening and characterization of endophytic Bacillus for biocontrol of grapevine downy mildew. Crop Protection *96*, 173–179.

Zhang, Y., Dorey, S., Swiderski, M., and Jones, J.D.G. (2004). Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. Plant J. *40*, 213–224.

Zheng, D., Zhang, H., Carle, S., Hao, G., Holden, M.R., and Burr, T.J. (2003). A luxR homolog, aviR, in Agrobacterium vitis is associated with induction of necrosis on grape and a hypersensitive response on tobacco. Mol. Plant Microbe Interact. *16*, 650–658.

Zilberman, D. (2008). The evolving functions of DNA methylation. Curr. Opin. Plant Biol. *11*, 554–559.

Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F., and Lo Schiavo, F. (2008). Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant Cell Rep *27*, 845–853.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. Plant J. *23*, 11–28.

Maud Combier

Étude des effecteurs de type RXLR de *Plasmopara viticola* pour la recherche de résistances durables au mildiou de la vigne

Résumé

Le mildiou de la vigne est causé par l'oomycète *Plasmopara viticola*, qui s'attaque aux parties aériennes non-lignifiées affectant la production viticole. Une alternative à l'utilisation de pesticides est l'utilisation de variétés de vigne à la résistance durable, et un programme pour leur création par croisement entre espèces résistantes et la vigne cultivée, *Vitis vinifera*, est en cours. Ce programme nécessite l'identification de nouveaux gènes de résistance, ce que le projet vise à faire par (1) le criblage de vignes résistantes avec des effecteurs conservés chez *P. viticola*, (2) l'étude fonctionnelle d'effecteurs candidats. Le criblage de plantes résistantes n'a conduit à l'identification d'aucun nouveau facteur de résistance majeur. L'étude fonctionnelle d'effecteurs a permis la mise en évidence d'une nouvelle famille d'effecteurs chez *P. viticola* et a conduit à l'identification de deux effecteurs Pv33, nucléaire, et Pv47, associé au réticulum endoplasmique, qui induisent des défenses végétales.

Mot clef :
Plasmopara viticola, Effecteur RXLR, Effecteur WY-domain, résistance durable, Vigne

Abstract

Grapevine downy mildew is caused by the oomycete *Plasmopara viticola*, which attacks the aerial non-lignified tissues affecting wine production. An alternative to the use of pesticides is the use of vine varieties with sustainable resistances. A programme aiming to create such varieties by crossing resistant species with the cultivated grapevine, *Vitis vinifera*, is ongoing. Within this program requiring the indentification of new resistance genes, which the project aims to do by (1) screening resistant vines with effectors stored in *P. viticola*, (2) performing a functional study of candidate effectors. The screening of resistant plants did not lead to the identification of any new major resistance factors. The functional study of effectors revealed a new family of effectors in *P. viticola* and led to the identification of two effectors Pv33, nuclear, and Pv47, associated with the endoplasmic reticulum, which induce plant defences.

Keywords :
Plasmopara viticola, RXLR Effector, WY-pattern Effector, Durable resistance, Grapevine