

FACTEURS QUI CONTRÔLENT LE POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ  
*BOTRYTIS CINEREA*

par

Mohamed El Oirdi

thèse présentée au Département de Biologie en  
vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 2009



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-52829-7*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-52829-7*

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 30 juin 2009

Le jury a accepté la thèse de M. Mohamed El Oirdi dans sa version finale

Membres de jury

Kamal Bouarab  
Directeur  
Département de biologie

Ryszard Brezinski  
Membre  
Département de biologie

Luc Varin  
Membre externe  
Department of biology Concordia University Montreal

Carole Beaulieu  
Présidente-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Les plantes sont constamment confrontées aux maladies, causées par différents types d'agent pathogènes tels que les champignons, virus et bactéries. Ces maladies constituent un lourd fardeau pour l'agriculture et l'industrie agroalimentaire. Pour lutter contre ces agents pathogènes, les plantes sont capables de reconnaître des signaux produits au moment où l'agent pathogène débute son action. Ces signaux activent le système immunitaire de la plante et lui permettent ainsi de se protéger contre ses agresseurs. Cependant, de plus en plus d'études montrent que certains agents pathogènes détournent le mécanisme immunitaire de la plante pour pouvoir l'envahir. Cette stratégie constitue un nouveau moyen de virulence. L'objectif de cette thèse consistait donc à étudier les facteurs qui contrôlent le pouvoir pathogène chez *Botrytis cinerea*. Tout d'abord, nous avons montré que *B. cinerea* manipule les voies de signalisation qui mènent à la mise en place de la réaction hypersensible pour installer sa maladie. En fait la pourriture grise causée par *B. cinerea* chez *Nicotiana benthamiana*, nécessite la présence des deux régulateurs de la réaction hypersensible chez la plante, EDS1 et SGT1. Pour résister à *B. cinerea*, la plante active la voie de l'acide jasmonique (AJ), incluant l'expression des inhibiteurs de protéinases PI I et II. Cependant, pour contourner cette immuno-réaction innée de la plante, *B. cinerea* a développé une stratégie sophistiquée qui lui permet de manipuler l'effet antagoniste qui existe entre les voies de l'acide salicylique (AS) et l'AJ et ainsi instaurer sa maladie. Enfin, nous avons montré que l'accumulation d'une phytoalexine : la scopolétine dans une espèce et un cultivar de tabac (*N. sylvestris* et *N. tabacum* cv Petit Havana) est corrélée avec la résistance contre *B. cinerea*. La scopolétine inhibe la germination des spores, mais elle n'a pas d'effet significatif sur la croissance du mycélium de *B. cinerea*. Le mycélium est plus virulent que les spores sur le cultivar résistant *N. tabacum* cv Petit Havana. En effet, à la différence des spores, le mycélium de *B. cinerea* est capable de détoxifier ou dégrader la scopolétine. En comparaison avec les spores, le mycélium est aussi capable d'empêcher l'accumulation des protéines PR. Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent l'interaction entre *B. cinerea* et ses plantes hôtes, pourrait aider à la découverte de moyens de lutte plus respectueux pour l'environnement.

## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Pr Kamal Bouarab à l'université de Sherbrooke. Je souhaite vous remercier ici pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein du laboratoire. Je tiens aussi à vous exprimer ma reconnaissance, pour avoir guidé mes réflexions scientifiques tout au long de ces années. Merci pour votre soutien, votre confiance, vos encouragements, votre disponibilité et pour toutes les discussions, très enrichissantes, tant sur le plan humain que scientifique. Vous m'avez beaucoup appris.

Un grand merci à mes conseillers les Pr Carole Beaulieu et Ryszard Brezinski, pour vos conseils et votre disponibilité. Un merci spécial à Carole Beaulieu pour avoir accepté d'être la présidente rapporteur pour ma thèse.

J'adresse mes sincères remerciements au Pr Luc Varin pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit et d'honorer mon Jury

Merci à Rocio Gonzalez-Lamothe et Madjid Djoumad pour votre amitié, vos conseils, vos idées pertinentes et pour la lecture de mes articles et de ma thèse, un grand merci à Taha Abd El Rahman pour ton aide et pour l'intérêt que tu as porté à ce projet. Merci à Raphaël Sansregret pour ta bonne humeur et ton enthousiasme. Un grand merci à Luciano, Vanessa, Babana, Hamed, Pablo et tous les stagiaires pour votre aide précieuse.

Je tiens à remercier mes parents, mon frère Aziz et mes Sœurs Fatiha, Bouchra et Siham au Maroc qui ont toujours été à mes côtés. Qu'ils sachent combien je les aime.

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans Samira, ma belle femme, ma confidente, ma partenaire. Merci pour tout cela, ton soutien, ton amour et j'insiste sur ta patience et tes encouragements. Merci aussi de m'avoir donné deux merveilleux garçons, Oussama et Akram qui ont illuminé ma vie. Je vous aime beaucoup et je vous demande tous les trois de me pardonner d'avoir été souvent absent et préoccupé par la recherche.

*A tous un grand merci...*

# TABLE DES MATIERES

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Interaction plante-agent pathogène .....</b>	<b>2</b>
1.1 Reconnaissance de l'agent pathogène par la plante .....	2
1.1.1 Les éliciteurs généraux .....	3
1.1.2 Les récepteurs d'éliciteurs généraux.....	3
1.1.3 Les éliciteurs spécifiques .....	4
1.1.4 Les récepteurs d'éliciteurs spécifiques .....	5
1.2 Mécanisme de reconnaissance de l'agent pathogène .....	9
1.3 Transduction du signal précoce induit par la reconnaissance de l'agent pathogène.....	11
1.3.1 Protéines G.....	12
1.3.2 Réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.....	12
1.3.3 Flux ioniques au travers de la membrane plasmique.....	14
1.3.4 Production d'espèces activées de l'oxygène et la flambée oxydative .....	16
1.4 Les messagers secondaires .....	17
1.4.1 L'acide salicylique .....	18
1.4.2 Acide jasmonique.....	21

1.4.3	L'éthylène (ET).....	22
1.4.4	Les interactions entre l'AS, l'AJ et l'ET.....	24
<b>2.</b>	<b>Caractérisation des mécanismes de défense induits chez les plantes.....</b>	<b>29</b>
2.1	Mise en place de réponse de défense.....	29
2.1.1	La réponse hypersensible.....	29
2.1.2	Renforcement de la paroi cellulaire.....	31
2.1.3	Les phytoalexines.....	32
2.1.4	Les protéines PR.....	33
2.2	L'ARN interférence (ARNi).....	36
<b>3.</b>	<b>Suppression des réactions de défense.....</b>	<b>40</b>
<b>4.</b>	<b>Les maladies cryptogamiques.....</b>	<b>42</b>
4.1	Mécanismes d'infection des plantes.....	44
4.2	Les forces mécaniques.....	44
4.3	Pénétration des champignons phytopathogènes par les stomates.....	45
4.4	Infection par action enzymatique ou phytotoxines.....	46
<b>5.</b>	<b>La pourriture grise.....</b>	<b>47</b>
5.1	Cycle de développement et de reproduction de <i>B. cinerea</i> .....	48
5.2	Objectifs du projet de recherche.....	50
 <b>CHAPITRE 1 : LES RÉGULATEURS EDS1 ET SGT1 AUGMENTENT LA SÉVÉRITÉ DE LA MALADIE CAUSÉE PAR LE CHAMPIGNON</b>		
<b>NÉCROTROPHE <i>BOTRYTIS</i>.....</b>		
1.1	Préambule.....	52
1.2	Article.....	53

	<b>CHAPITRE 2 : <i>B. CINEREA</i> MANIPULE LES EFFETS ANTAGONISTES ENTRE LES VOIES IMMUNITAIRES DE LA PLANTE POUR INSTAURER SA MALADIE .....</b>	<b>75</b>
2.1	Préambule.....	75
2.2	Article.....	77
	<b>CHAPITRE 3 : LA RÉSISTANCE DES PLANTES DE TABAC À <i>BOTRYTIS CINEREA</i> DÉPEND DES CULTIVARS ET DU STADE DE VIE DE L'AGENT PATHOGÈNE.....</b>	<b>104</b>
3.1	Préambule.....	104
3.2	Article.....	106
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>139</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>143</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ACC** : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid  
**ACO** : ACC oxydases  
**ACS** : ACC synthases  
**ADN** : acide désoxyribonucléique (DNA)  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ADP** : adénosine diphosphate  
**ADPRc** : ADP ribose cyclique  
**AJ** : acide jasmonique  
**ARF** : facteurs de transcriptions sensibles à l'auxine (auxin-response factor)  
**ARN** : acide ribonucléique (RNA)  
**ARNdb** : ARN double brin (dsRNA : double-stranded RNA)  
**ARNi** : interférence de l'ARN (RNAi : RNA interference)  
**ARNm** : ARN messenger (mRNA : messenger RNA)  
**ARNsb** : ARN simple brin (ssRNA : single-stranded RNA)  
**AS** : acide salicylique  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**AUX/IAA** : répresseur de la réponse à l'auxine (auxin-signaling repressor)  
**AuxRE** : régions promotrices sensibles à l'auxine (auxin-responsive elements)  
**Avr** : avirulence, pour un gène ou une protéine (gène Avr ou protéine Avr)  
**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium  
**CC** : domaine de dimérisation en torsade d'hélices (coiled coil domain)  
**Cl<sup>-</sup>** : ion chlorure  
**COI1** : protéine d'insensibilité à la coronatine (coronatine insensitive 1)  
**cpr5** : Constitutive expression of PR genes 5  
**DCL** : ARNase de type III homologue à Dicer (Dicer-like)  
**Dicer** : ribonucléase de la famille des ARNase III  
**dpi** : jour(s) post-infection/induction (day(s) post-infection/induction)  
**EAO** : espèce activée de l'oxygène (AOS : active oxygen species)  
**EDS1** : Enhanced disease susceptibility1

**EGPT** : extinction génique post-transcriptionnelle (PTGS: post-transcriptional gene silencing)

**EGTA**: ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

**ein2** : ethylene insensitive2

**EPS**: exopolysaccharide

**ERF1** : facteur de transcription sensible à l'éthylène 1

**ET** : éthylène

**ETI** : Effector Triggered Immunity

**ETS** : Effective-Triggered Susceptibility

**flg22**: flagelline

**GIP** : Glucanase Inhibitor Protein

**GMPc** : GMP cyclique

**GRXs** : glutaredoxines

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**hpi** : heure(s) post-infection/induction

**HRGP** : protéines riches en hydroxyproline

**HSP90**: Heat shock protein, 90 étant son poids moléculaire

**ICS**: isochorismate synthase

**IPL** : isochorismate pyruvate lyase

**JAZ** : Jasmonate ZIM domain protein

**JIN1** : facteur de transcription insensible au jasmonate (jasmonate insensitive 1)

**JIN1** : facteur de transcription insensible au jasmonate 1

**K<sup>+</sup>** : ion potassium

**LPS** : lipopolysaccharides

**LRR**: séquence répétée riche en leucine (leucine-rich repeat)

**LTP** : protéines de transfert de lipides (lipid transfer proteins)

**MAMP** : motif moléculaire associé au microorganisme (Microbial Associated Molecular Patterns)

**MAPK** : protéines MAP kinase (mitogen-activated protein kinase)

**MCP** : mort cellulaire programmée

**MeJA** : méthyl-jasmonate

**miARN** : micro ARN (microRNA)

**NB** : domaine de liaison a un nucléotide (nucleotide binding domain)

**NB-ARC** : domaine NB commun entre APAF-1 humain (apoptotic protease-activating factor 1), certaines protéines R et CED-4 (*Caenorhabditis elegans* dead protein 4)

**NIM1** : Non Immunity 1

**NO** : oxyde nitrique

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** : nitrate

**NPR1**: protéine non-expresser de protéine PR1 (nonexpressor of PR genes)

**Ntf4**: MAP kinase qui participe à la mise en place de la RH

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : anion superoxide

**C** : degré Celcius

**OH<sup>·</sup>** : radical hydroxyl

**Pad** : Phytoalexines-deficients

**PAL** : phénylalanine ammonialyase

**PAMP** : motif moléculaire associé à l'agent pathogène (pathogen-associated molecular pattern)

**PCR** : réaction en chaîne par la polymérase (polymerase chain reaction)

**PDA**: potato dextrose agar

**PDB**: potato dextrose broth

**PDF** : Defensine (Plant defensin )

**PP** : protéine phosphatase

**PR** : relié au pathogène (pathogen-related)

**PRR** : récepteur reconnaissant des motifs (pattern recognition receptor)

**PTGS** : Post-Transcriptional Gene Silencing

**PTI** : PAMP triggered immunity

**Pti** : Pto-interacting

**PVX** : virus X de la pomme de terre (potato virus X) *potexvirus*

**R** : résistance, pour un gène ou une protéine (gène R ou protéine R)

**RAR1**: required for Mla-dependent resistance 1

**RdRp**: ARN polymérase dépendante de l'ARN (RNA-dependant RNA polymerase)

**RH** : réaction hypersensible (HR : hypersensitive reaction)

**RISC** : complexe d'inactivation génique induit par l'ARN (RNA-induced silencing complex)

**RSA** : résistance systémique acquise

**RT-PCR** : réaction de transcription inverse suivi d'une PCR (reverse transcriptase PCR)

**SABP2** : SA-binding protein 2  
**SCF** : complexe protéique SKP1/CDC53p/CUL1 boîte F  
**SGT1**: suppressor of G2 allele of SKP1  
**siARN** : petit ARN d'interférence (small interfering RNA)  
**SIPK**: SA-induced protein kinase  
**SNI1** : Suppressor of NPR1, Inducible  
**ssi2** : suppressor of SA insensitivity2  
**TetraFA** : 2,2,2,2,-tetrafluoroacetophenone  
**TGA** : facteurs de transcription de type bZIP (basic leucine zipper)  
**TIR** : domaine homologue au récepteur Toll de *Drosophila* et au récepteur de l'interleukine-1 chez l'humain (Toll and interleukin-1 receptor)  
**TIR1** : protéine d'inhibition du transport 1 (transport inhibitor response 1)  
**TMV** : virus de la mosaïque du tabac (VMT)  
**TRV**: tobacco rattle virus  
**TRX** : thioredoxines  
**TTSS** : système de sécrétion de type III (type III secretion system)  
**UV** : ultraviolet  
**VIGS**: virus-induced gene silencing  
**VMT** : virus de la mosaïque du tabac  
**VSP**: Vegetative storage protein  
**WIPK**: Wound-induced protein kinase  
**Xcc** : *Xanthomonas campestris pv campestris*  
**ZIM** : Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristems

## LISTE DES TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tableau 1: Les familles reconnues de protéines reliées aux agents pathogènes..... 37

Tableau 2: Classification de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz ..... 48

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1: Les classes de protéines de résistance. Les protéines R sont classées en fonction de l'organisation de leurs domaines.. ..... 7

Figure 2: Modèles d'activation directe et indirecte des protéines R..... 8

Figure 3: Modèle Zigzag représentant le développement de la résistance ou la sensibilité dépendante de [PTI - ETS + ETI]..... 10

Figure 4: Les Voies de biosynthèse de l'acide salicylique dans la plante. (1) par l'isochorismate synthase (ICS)..... 20

Figure 5: Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique dans la plante par l'intermédiaire d'acide 12-oxophytodiénoïque. .... 23

Figure 6: Modèle simplifié de la transduction de signal et de la mise en place de la défense lors des interactions plante-agent pathogène..... 24

Figure 7: Modèle montrant le fonctionnement de *WRKY70* avec les autres régulateurs dans la modulation de l'interaction entre l'AJ et l'AS. .... 28

Figure 8: Représentation schématique des mécanismes montrant l'effet antagoniste de l'AS sur des gènes de défense dépendant de l'AJ.....	28
Figure 9: Mécanismes de l'extinction génique post-transcriptionnelle chez les plantes.....	39
Figure 10: La mise en place de la maladie due à la suppression de l'immunité des plantes.....	42
Figure 11: Processus d'infection de la feuille de riz par une spore de <i>Magnaporthe grisea</i> .....	45
Figure 12: Infection de la feuille via les stomates. ....	46
Figure 13: Symptômes de la pourriture grise causée par <i>B.cinerea</i> sur différents types de cultures (Tomate, Fraise, Pomme de terre, Melon, Aubergine, Chou, Tabac, Orchidé, et Vigne).....	49
Figure 14: Cycle biologique et d'infection de <i>B. cinerea</i> .....	50

## CHAPITRE 1

Fig. 1: <i>Botrytis cinerea</i> infects several solanaceous species.....	62
Fig. 2: Expression patterns of Nb <i>EDS1</i> and <i>SGT1</i> after <i>Botrytis cinerea</i> infection. ....	63
Fig. 3: Silencing of two plant signalling components, EDS1 and SGT1, enhances the resistance of <i>Nicotiana benthamiana</i> to <i>Botrytis cinerea</i> .....	65
Fig. 4: Baculovirus antiapoptotic protein p35 compromises the disease caused by <i>Botrytis cinerea</i> .. ....	67

Fig. 5: Model explaining the role of <i>EDS1</i> and <i>SGT1</i> in the disease induced by <i>Botrytis cinerea</i> in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	68
--	----

## CHAPITRE 2

Fig. 1: Pathogenicity test in tomato leaves with two <i>Botrytis cinerea</i> isolates.....	81
--	----

Fig. 2: <i>B. cinerea</i> secretes a $\beta$ -(1,3)(1,6) glucan (EPS).....	85
--	----

Fig. 3: $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induces susceptibility of tomato to <i>B. cinerea</i> by suppressing JA signalling.....	87
--	----

Fig. 4: $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induces the accumulation of SA which enhances susceptibility of tomato to <i>B. cinerea</i> . ....	91
---	----

Supplementary Fig. 1: Resistance of tomato to <i>B. cinerea</i> B8403 isolate requires jasmonic acid signalling.....	82
--	----

Supplementary Fig. 2: Systemin is involved in the interaction between tomato and <i>B. cinerea</i> . ....	83
---	----

Supplementary Fig. 3: Characterisation of susceptibility induced by <i>B. cinerea</i> EPS in tomato.....	89
--	----

Supplementary Fig. 4: JA accumulation in tomato in response to infection by <i>B. cinerea</i> .....	92
---	----

Supplementary Fig. 5: <i>B. cinerea</i> EPS confers resistance to <i>P. syringae</i> DC 3000 in tomato .....	93
--	----

Supplementary Fig. 6: Proposed model showing how <i>B. cinerea</i> manipulates the antagonistic effects between SA and JA to spread in its host, tomato.....	95
--	----

### CHAPITRE 3

Fig. 1: <i>B. cinerea</i> symptoms in tobacco cultivars.....	115
Fig. 2: Resistant tobacco cultivars to <i>B. cinerea</i> accumulate blue UV- autofluorescent compounds.....	116
Fig. 3: UV-fluorescent compounds induced by <i>B. cinerea</i> in tobacco correspond to free and conjugated-scopoletin .....	118
Fig. 4: The accumulation of scopoletin and PR proteins is correlated with resistance of tobacco to <i>B. cinerea</i> .....	120
Fig. 5: Scopoletin inhibits the germination of <i>B. cinerea</i> spores but not its mycelium growth .....	121
Fig. 6: <i>B. cinerea</i> mycelium grows more than spores on resistant tobacco cultivars .....	123
Fig. 7: PR protein accumulation after inoculation of <i>N. tabacum</i> cv Petit Havana leaves with spores or mycelium plugs of <i>B. cinerea</i> .....	125
Fig. 8: <i>B. cinerea</i> mycelium but not spores metabolizes the scopoletin.....	127
Fig. 9: Mycelium extracellular proteins of <i>B. cinerea</i> affects the resistance induced in the cultivar <i>N. tabacum</i> cv Petit Havana .....	129

## INTRODUCTION

Les plantes sont en permanence exposées à des infections par des agents pathogènes. Ces agresseurs sont de nature très variée. Il peut s'agir de champignons, de bactéries, de virus, de viroïdes, de nématodes, de protozoaires et même d'autres plantes parasites (Dreher et Callis, 2007). En contrepartie, les plantes sont équipées d'un arsenal de mécanismes de défense pour se protéger contre les agents pathogènes. Pendant leur vie, les plantes sont confrontées à de nombreux envahisseurs avec différents types d'infection. Néanmoins, elles ont élaboré au cours de leur évolution des moyens de défense qui leur permettent de s'adapter afin de contrer efficacement les agressions. Ainsi, suite à une infection dépendamment de l'agresseur, les plantes vont déclencher un remaniement rapide de l'expression des gènes afin de moduler certaines voies métaboliques et induire des réponses de défense appropriées (Phillips *et al.*, 2007), faisant que l'apparition d'une maladie est plus l'exception que la règle. Cependant, lorsque les mécanismes de résistance des plantes sont inefficaces contre un agent pathogène, celui-ci réussit à infecter son hôte et il en résulte le développement d'une maladie.

Les maladies causées par les agents phytopathogènes constituent un lourd fardeau pour l'agriculture et l'industrie agroalimentaire. Ces agresseurs sont à l'origine de pertes économiques considérables, près de 20 à 40% des récoltes sont perdues suite au développement d'agents microbiens (selon l'Organisation Mondiale de la Santé). Actuellement, l'épandage des pesticides de synthèse demeure la méthode privilégiée et la plus utilisée pour lutter contre ces agents ravageurs. Ces produits chimiques sont considérés comme l'arme la plus efficace pour faire face à ces problèmes.

À l'échelle mondiale, environ 600 pesticides sont utilisés couramment, mais plus de 1600 composés ont été commercialisés à un moment ou à un autre (Lebailly *et al.*, 2007). Cependant, ces substances ont des conséquences néfastes sur l'environnement comme l'accumulation de résidus de pesticide, la pollution des sols et le déséquilibre écologique, dû au fait que beaucoup de ces composés de synthèse ont un large spectre d'action,

détruisant non seulement les agents nuisibles, mais également les autres populations de l'écosystème (Thakore 2006). En outre, de nombreux problèmes de santé humaine seraient liés aux pesticides. En effet, de plus en plus d'études révèlent une très forte augmentation de certains cancers (prostate et pancréas) chez les personnes en contact chronique avec des pesticides (Clary et Ritz 2003 ; Settimi, 2003; Bassil *et al.*, 2007). De plus, il semble que les pesticides sont de moins en moins efficaces pour traiter les infections causées par des agents pathogènes chez les plantes en raison de l'apparition de mécanismes de résistance chez ces agresseurs. Ceci se traduit par des coûts élevés pour traiter les plantes et pour amortir les pertes financières occasionnées par les maladies, en plus de représenter un danger pour l'environnement et la santé.

Depuis quelques années, la connaissance des mécanismes de défense des plantes a nettement progressé. Ce qui a conduit les chercheurs à étudier la mise au point de nouveaux outils de lutte notamment le développement des mécanismes naturels de résistance des plantes vis-à-vis de leurs ravageurs. Ceci ouvrira la voie à de nouvelles stratégies de lutte moins nocives pour l'environnement et la santé humaine.

## **1. Interaction plante-agent pathogène**

### **1.1 Reconnaissance de l'agent pathogène par la plante**

Les plantes ne disposent pas de cellules défensives mobiles comme c'est le cas chez le règne animal. Leur défense est plutôt basée sur l'immunité innée de chaque cellule et les signaux systémiques émanant des sites d'infection.

La reconnaissance du micro-organisme pathogène par la plante et l'induction des mécanismes de défense sont initiées par la perception de molécules appelées éliciteurs. Les éliciteurs peuvent être attribués à une large gamme de microorganismes (les éliciteurs généraux) ou être spécifiques à un agent pathogène (les éliciteurs race-spécifiques).

Les travaux récents de plusieurs groupes de recherche ont montré que les éliciteurs généraux déclencheraient un premier type de réponse de défense basale qui serait

insuffisant pour stopper la progression de la maladie tandis que les éliciteurs spécifiques seraient responsables de la mise en place rapide d'une deuxième série de réponses de défense solides plus efficace contre la prolifération des agents pathogènes (Jones et Dangl, 2006). Ces deux mécanismes inductibles de défense sont distincts mais probablement interconnectés (Chisholm *et al.*, 2006, Jones et Dangl 2006)

### **1.1.1 Les éliciteurs généraux**

Les éliciteurs généraux ou PAMPs (pour Pathogen-Associated Molecular Patterns) sont des motifs moléculaires endogènes ou exogènes qui peuvent s'exprimer de manière conservée dans le cadre d'interactions plante-agent pathogène et sont capables au moins d'induire une résistance basale chez la plante (Bent et Mackey, 2007; Dangl et Jones, 2001; Mackey et McFall, 2006; van Ooijen *et al.*, 2007). Parmi les PAMPs, les lipopolysaccharides (LPS) font partie des constituants majeurs des bactéries à Gram négatif. Ces molécules peuvent être reconnues par la plante et engendrent l'activation des voies de signalisation permettant la mise en place de défense (Zeidler *et al.*, 2004). Les oligosaccharides, les peptides et les glycoprotéines font partie aussi des PAMPs (Montesano *et al.*, 2003). Les oligosaccharides sont subdivisés en trois catégories : les  $\beta$ -glucanes et les oligochitines, qui composent la paroi cellulaire des champignons, ainsi que les oligogalacturonides, issus de la paroi cellulaire des plantes lors de la dégradation enzymatique par l'agent pathogène (Parker, 2003; Shibuya et Minami, 2001). La flagelline (peptide flg22), composante majeure de l'organe permettant le déplacement des bactéries mobiles, est l'exemple de PAMPs le plus documenté. L'acide arachidonique, la glycoprotéine Pep-13, le peptide inf1 de *Phytophthora infestans* ou encore l'ergostérol retrouvé chez les champignons sont d'autres exemples de PAMPs (Huckelhoven, 2007).

### **1.1.2 Les récepteurs d'éliciteurs généraux**

La reconnaissance de ces PAMPs se fait via des récepteurs transmembranaires (PRR) (Jones et Dangl 2006). Seulement trois PRRs ont été identifiés : FLS2, EFR et LeEix, qui reconnaissent respectivement le motif flg22 de la flagelline bactérienne, le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) bactérien et un dérivé d'une xylanase fongique.

### 1.1.3 Les éliciteurs spécifiques

De nombreux gènes codant pour des effecteurs d'agents pathogènes ont été clonés et leurs produits ont été caractérisés chez les champignons, les virus et les bactéries. (Birch *et al.*, 2006 ; De Wit, 1997, Ellis *et al.*, 2000 ; Ellis *et al.*, 2007 ; Ridout *et al.*, 2006). Contrairement aux protéines R, ces effecteurs sont de nature très variée et ne semblent pas posséder de similarité entre eux. Pour un nombre croissant d'entre eux, une fonction de virulence a pu être mise en évidence (Ridout *et al.*, 2006 ; Rosebrock *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2007).

Chez les champignons, la plupart des protéines Avr comportent un peptide signal qui permet leur excrétion dans l'apoplaste ou un motif RxLR qui permet leur importation dans la cellule végétale par endocytose. Certaines protéines Avr ne possèdent ni peptide signal ni motif RxLR (Bent et Mackey, 2007; Grant *et al.*, 2006). Les mécanismes par lesquels ces protéines sont introduites à l'intérieur des cellules végétales sont peu connus (Jones et Dangl, 2006). À ce jour, 16 gènes Avr eucaryotes ont été clonés. Ces gènes proviennent principalement de *Cladosporium fulvum*, *Magnaporthe griseae*, *Melampsora lini* et *Phytophthora infestans*.

Chez les bactéries, les protéines Avr sont généralement injectées dans le cytoplasme de la cellule végétale via le système de sécrétion de type III bactérien (TTSS). Les protéines Avr clonées, plus d'une trentaine à ce jour, proviennent surtout de *Pseudomonas syringae* et de *Xanthomonas campestris* (Chisholm *et al.*, 2006; Jones et Dangl, 2006). Lorsqu'ils sont exprimés dans des hôtes susceptibles, ces effecteurs suppriment les défenses ou modulent le métabolisme de leur hôte à leur avantage. Par exemple, AvrPto et AvrE1 suppriment la déposition de la callose impliqué dans le renforcement de la paroi cellulaire. AvrRpm1, AvrRpt2 et AvrPtoB suppriment la réaction hypersensible (RH). D'autres effecteurs modulent les réponses liées à l'AJ et à l'éthylène, ou encore suppriment la résistance basale (Grant *et al.*, 2006).

Chez les virus, le système le mieux connu est l'interaction entre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) et le tabac, *Nicotiana sylvestris*. Dans cette interaction, la protéine de la

coque du VMT induit une RH chez *N. sylvestris* possédant le gène de résistance N' (Knorr et Dawson, 1988). Le deuxième gène d'avirulence virale identifié code pour une protéine de la capsid. La protéine de la capsid du virus X de la pomme de terre (PVX) est quant à elle reconnue par la protéine de résistance Rx de la pomme de terre (De Wit, 1997; Jones et Dangl, 2006). Tous ces gènes d'avirulence, bactériens, fongiques ou viraux, codent en général pour des protéines à activité élicitrice de réponses de défense et inductrice d'une réaction hypersensible chez les plantes portant le gène de résistance correspondant.

Ces protéines n'ont pour la plupart pas de fonction connue, à l'exception de quelques-unes d'entre elles possédant une activité enzymatique (Chisholm *et al.*, 2006). Par exemple, certains effecteurs fongiques relâchés dans l'apoplaste servent à contrer l'effet des composés antimicrobiens excrétés par la cellule végétale lors de la résistance basale (Robatzek, 2007). De leur côté, les protéines Avr virales peuvent jouer un rôle dans la réplication, la synthèse de la capsid et le mouvement viral ou être des effecteurs qui suppriment le PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) (Bent et Mackey, 2007; Chisholm *et al.*, 2006 Ellis *et al.*, 2000)

Dans certains cas, une réduction de la virulence de l'agent pathogène a été observée lorsque le gène d'avirulence est muté (Vera Cruz *et al.*, 2000; Van der Hoorn *et al.*, 2002; Ritter et Dangl, 1995).

### **1.1.4 Les récepteurs d'éliciteurs spécifiques**

Un grand nombre de protéines de résistance (protéines R) ont été identifiées chez différentes plantes, en particulier chez plusieurs Solanacées (tomate, pomme de terre, poivron et le tabac), le lin et les céréales (riz, blé, orge) ainsi que chez *Arabidopsis thaliana*. Ces Protéines R se divisent en plusieurs classes mais la majeure partie d'entre elles sont intracellulaires et représentent les protéines de la classe I responsables de la perception des effecteurs comme les protéines Avr des champignons, virus et bactéries. Elles possèdent un domaine NB (Nucleotide Binding) capable de lier et d'hydrolyser l'ATP ainsi qu'un large domaine C-terminal constitué de motifs répétés riches en leucine

(LRR). Elles possèdent d'autre part en N terminal un domaine homologue au récepteur Toll de la *Drosophila* et au récepteur de l'interleukine-1 chez l'humain (TIR) ou d'un domaine de dimérisation en torsade d'hélices hydrophobes (CC). La deuxième classe regroupe des protéines R constituées d'un domaine LRR extracellulaire (eLRR) et d'une ancre membranaire. La portion C terminale peut être une courte queue cytoplasmique (RLP) ou une protéine sérine thréonine kinase (RLK) (figure 1). Les protéines les mieux caractérisées de cette classe sont les protéines Cf de la tomate, qui perçoivent les protéines Avr du champignon *C. fulvum* (Chisholm *et al.*, 2006; De Young and Innes, 2006; van Ooijen *et al.*, 2007).

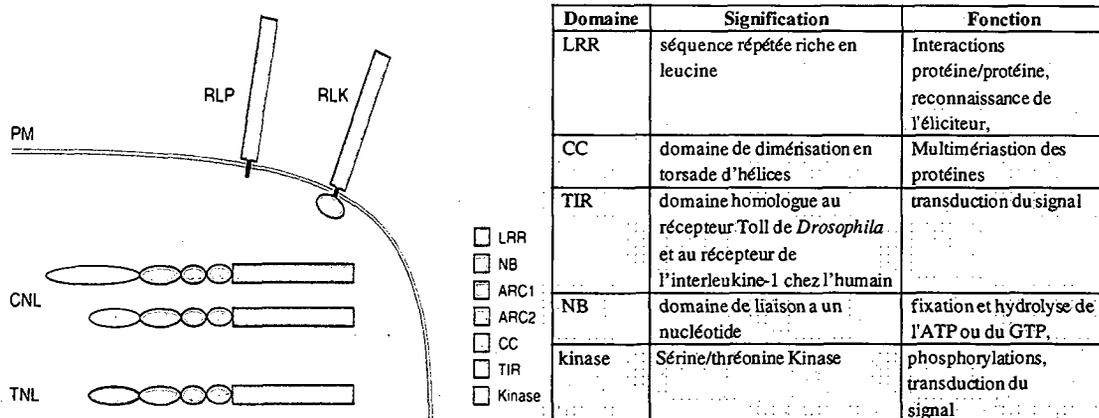
Dans la troisième classe de protéines R, on retrouve la protéine *Pto* de la tomate qui présente un domaine sérine-thréonine kinase cytoplasmique. La protéine *Pto* interagit directement avec son partenaire issu de *Pseudomonas syringae*, AvrPto, mais son activité nécessite Prf, une protéine NB-LRR (Salmeron *et al.*, 1996). Pour finir, la dernière classe provient de l'identification du gène de la résistance du mildiou poudreux 8 (*RPW8*) d'*Arabidopsis*, qui code pour un domaine d'ancrage membranaire et un CC cytoplasmique (Xiao *et al.*, 2001).

Les mécanismes d'activation des NB-LRR sont encore mal connus. Les LRR agissent probablement comme des régulateurs négatifs qui interfèrent avec l'inactivation inappropriée de NB dans une conformation de la molécule maintenue à l'aide de chaperonnes (Holt *et al.*, 2005). Cependant la fonction des différents domaines des protéines NB-LRR, leurs interactions intramoléculaires et leur rôle dans le contrôle de l'activité de la protéine R font l'objet de nombreux travaux de recherche (Moffett *et al.*, 2002; Leister *et al.*, 2005; Rairdan et Moffett, 2006; Sacco *et al.*, 2007). De nombreuses protéines comme RAR1, SGT1 et HSP90 peuvent interagir physiquement avec plusieurs protéines NB-LRR et sont nécessaires pour leur bon fonctionnement. Ces régulateurs semblent être en grande partie exigés pour la stabilité de ces protéines (Bieri *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2003;).

L'identification des effecteurs et des protéines R correspondantes a permis de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance et de détection de ces effecteurs par les

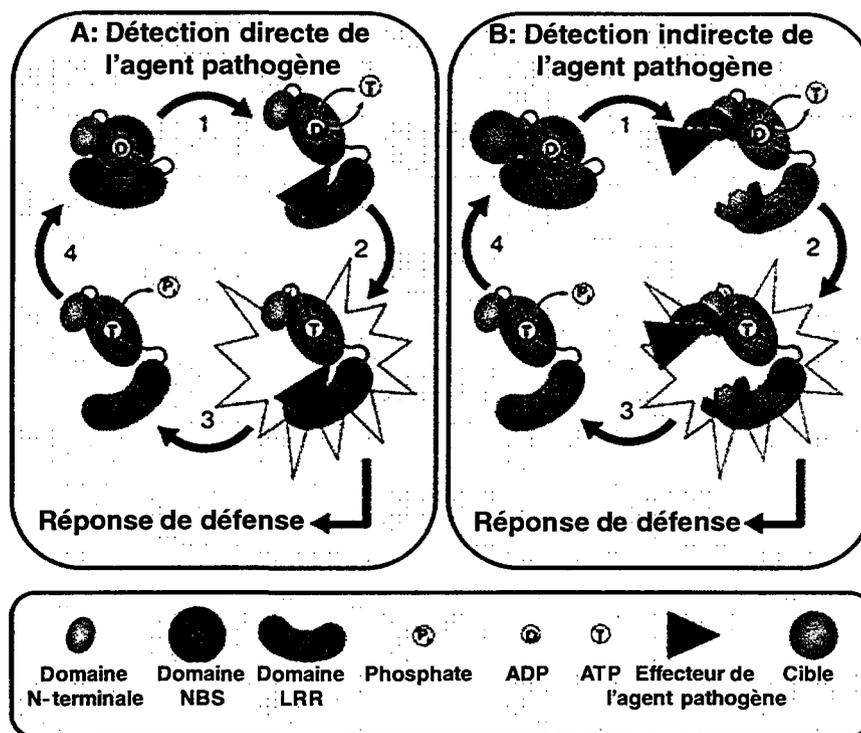
protéines R. Deux types de mécanismes de reconnaissance sont proposés. Le premier est basé sur une interaction directe entre les protéines R et les protéines d'avirulence Avr correspondante (figure 2A). Ce mode d'interaction a été démontré expérimentalement (Keen, 1990; Staskawicz *et al.*, 1995; Cook, 1998; Dodds *et al.*, 2006).

Cependant, il semble que dans la majorité des cas, les protéines R ne se lient pas directement à l'effecteur mais qu'elles le détectent de façon indirecte. Un modèle est proposé où les protéines R fonctionnent en tant que garde des protéines hôtes qui sont ciblées par les effecteurs selon l'hypothèse de garde, laquelle est bien acceptée et soutenue par un nombre croissant d'évidences dans la littérature (figure 2B) (Dangl et Jones, 2001 ; DeYoung et Innes, 2006).



**Figure 1: Les classes de protéines de résistance.** Les protéines R sont classées en fonction de l'organisation de leurs domaines. La vaste majorité des protéines R sont des protéines de type NB-LRR cytosoliques contenant un domaine N-terminal de type TIR ou CC (TNL ou CNL). En deuxième ordre d'importance, on retrouve des protéines R contenant un domaine de type LRR extracellulaire (eLRR) ancré à la membrane (RLP et RLK). (Tiré de van Ooijen *et al.*, 2007). À droite, un tableau récapitulatif de la fonction de chaque domaine constituant les protéines de résistance.

La protéine Avr est à priori un effecteur impliqué dans la virulence et possède donc une cible cellulaire. En manipulant cette cible cellulaire, l'effecteur contribue au succès de l'infection chez les hôtes susceptibles. Or, chez les hôtes résistants, la cible cellulaire est surveillée (par une protéine R) et sa modification par l'effecteur de l'agent pathogène entraîne l'activation de la protéine R qui active à son tour la résistance. Ainsi, la protéine R ne reconnaît pas directement la protéine Avr de l'agent pathogène, mais plutôt son effet sur la cellule (la protéine ciblée), ce qui implique qu'elle est associée à la cible cellulaire de la protéine Avr (Mackey *et al.*, 2002; Nimchuk *et al.*, 2003; Jones et Dangl, 2006).



**Figure 2: Modèles d'activation directe et indirecte des protéines R.** A : interaction directe entre la protéine R et l'effecteur de l'agent pathogène. B : hypothèse de garde : interaction indirecte entre la protéine R et l'effecteur de l'agent pathogène. Dans les deux cas, la perception de l'effecteur ou de la cible cellulaire altère la structure de la protéine R, ce qui permet l'échange de l'ADP pour un ATP. La liaison de l'ATP au domaine NB favorise la création de site de liaison pour les protéines de signalisation situées en aval. La dissociation de l'effecteur ou de la cible et l'hydrolyse de l'ATP permet à la protéine R de retourner à son état inactif initial. (Tiré de DeYoung et Innes, 2006)

### **1.2 Mécanisme de reconnaissance de l'agent pathogène**

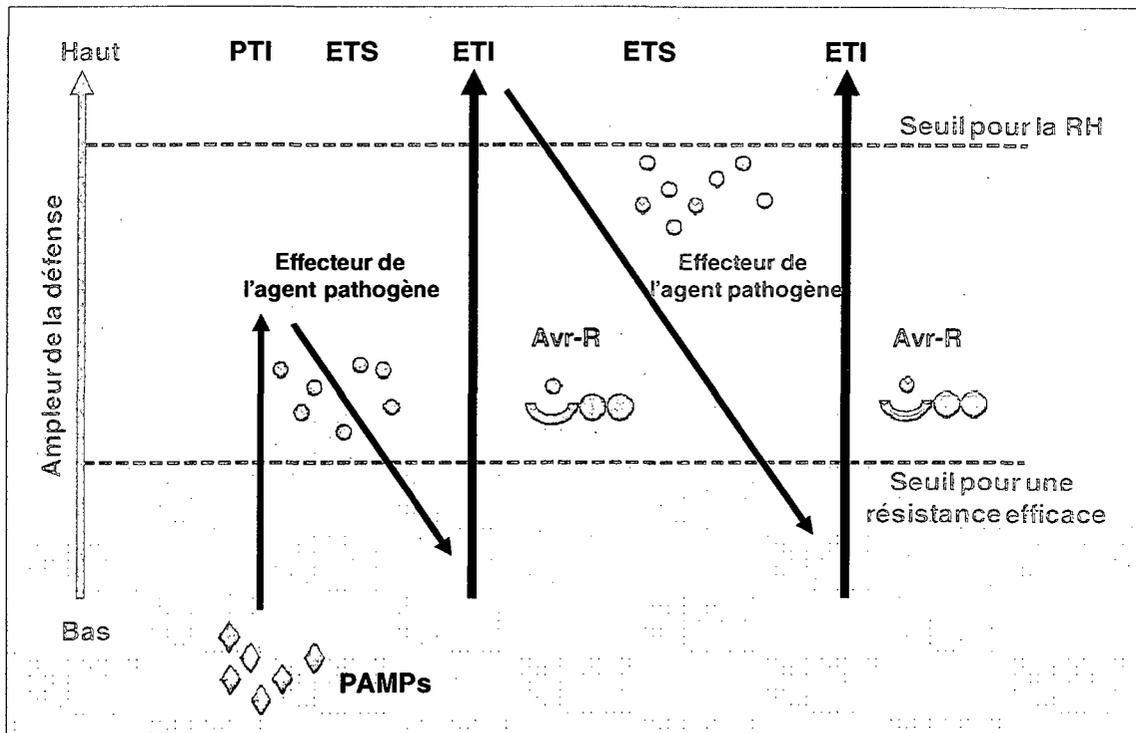
Selon Chisholm *et al.* (2006) la perception de micro-organismes à la surface de la cellule végétale par des récepteurs extracellulaires qui sont en réalité des molécules conservées chez un grand nombre d'agent pathogène baptisé PAMPs, déclenche un premier type de réaction immunitaire appelée: PTI (immunité induite par le motif moléculaire associé à l'agent pathogène «PAMP triggered immunity», aussi connue sous le nom d'éliciteurs généraux). La reconnaissance de ces motifs (figure 3) se fait via des récepteurs transmembranaires (PRR) (Jones et Dangl 2006). En effet la PTI suffit souvent à bloquer l'infection, mais les agents pathogènes ont développé des moyens d'échapper ou de supprimer cette résistance basale, par exemple, en sécrétant des protéines effectrices qui sont capables de pénétrer dans les cellules hôtes, d'altérer la signalisation et de provoquer la susceptibilité (Grant *et al.*, 2006 ; Fujikawa *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006; Melotto *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2006; de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

Cette capacité de délivrer des protéines dans la plante est une caractéristique générale des agents phytopathogènes, qui vont interférer avec les PTI pour mener à l'ETS (Sensibilité induite efficace «effective-triggered susceptibility») établissant ainsi une relation de virulence (figure 3).

D'autre part les plantes ont développé une deuxième série de défense nommée ETI (Immunité induite par l'effecteur «effector triggered immunity») pour détecter ces effecteurs (figure 3). Ces ETI sont des protéines de résistance (protéines R) spécifique à des plantes particulières (De Young et Innes, 2006).

La résistance ETI est étudiée depuis plusieurs années grâce à l'identification des gènes R. Ces gènes R ont été définis par Flor qui a étudié les interactions entre le lin et l'agent pathogène fongique *Melampsora lini*. Il est le premier à avoir développé le concept de reconnaissance gène pour gène (Flor, 1971), où le produit d'un gène R va spécifiquement reconnaître un effecteur particulier, qui dès sa détection n'aura plus de fonction de virulence et correspond donc à une protéine dite d'avirulence. Cette reconnaissance induit ainsi une seconde vague de réponse de défense ou immunité secondaire (Liu *et al.*, 2004).

Divers mécanismes de défense peuvent être initiés par l'interaction gène-pour-gène, tel que le renforcement de la paroi cellulaire, l'accumulation de protéines liées aux agents pathogènes (protéines PR), la production de phytoalexines et l'apparition d'un type de mort cellulaire programmée (MCP) appelée réaction hypersensible (RH) (Dangl et Jones, 2001; Greenberg, 1997).



**Figure 3: Modèle Zigzag représentant le développement de la résistance ou la sensibilité dépendante de [PTI - ETS + ETI].** La reconnaissance des PAMPs par les récepteurs transmembranaires (PRR) induit un premier type de réaction immunitaire PTI (PAMP triggered immunity). Dans la phase 2, les agents pathogènes produisent des effecteurs capables de supprimer ou de contourner l'immunité basale PTI pour mener à l'ETS (Effective-Trigged Susceptibility) établissant ainsi une relation de virulence entraînant la susceptibilité de la plante à l'agent pathogène. Dans la phase 3, les plantes ont développé une deuxième série de défense nommée ETI (Effector Triggered Immunity) pour détecter les effecteurs. Dans la phase 4, l'agent pathogène modifie ou élimine le gène Avr, de sorte que le produit du gène R ne reconnaît plus le produit du gène Avr qui lui est spécifique. La plante est à nouveau susceptible à l'agent pathogène et

il en résulte l'établissement de la maladie. Éventuellement, le cycle reprend, lorsqu'un nouveau gène R est produit pour reconnaître un nouvel effecteur entraînant ainsi une deuxième ETI (Tiré de Jones et Dangl 2006).

Ces défenses tardives constituent les principales responsables de la résistance efficace de la plante à l'agent pathogène et sont donc indispensables pour empêcher la mise en place de la maladie.

Ces premières et deuxièmes vagues de réponses dépendent respectivement des éliciteurs généraux PAMPs et spécifiques. Mais, il est difficile de réunir les connaissances sur la transduction de signal menant à l'activation des réponses de défense avec le modèle actuel de résistance, car les distinctions entre les cascades de transduction induites lors de la résistance basale et secondaire n'ont pas été délimitées (Bent et Mackey, 2007). Les cascades de transduction de signaux enclenchées par les deux types d'éliciteurs semblent se chevaucher et impliquer certaines réponses cellulaires communes, mais celles-ci ne sont pas encore bien élucidées. Il a été suggéré que la nature de la résistance basale et de la résistance secondaire diffèrent principalement par la robustesse de leurs réponses et le moment de leur apparition lors de l'interaction hôte-agent pathogène (He *et al.*, 2007).

### **1.3 Transduction du signal précoce induit par la reconnaissance de l'agent pathogène**

Les différents événements de transduction de signaux impliqués dans les réponses de défense aux agents pathogènes font intervenir de nombreux interacteurs. Le dialogue entre ces événements est prépondérant tout au long de la mise en place de la résistance : les cascades de signalisation se chevauchent, agissent en synergie ou en antagonismes et se modulent entre elles. Les réponses cellulaires précoces les plus fréquentes sont des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation, des modifications de flux ioniques et la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO). Ces réponses cellulaires peuvent varier en fonction du modèle étudié.

### **1.3.1 Protéines G**

Dans les systèmes animaux et végétaux, les protéines G hétérotrimériques (GTP-binding protein) sont généralement associées à des récepteurs membranaires dont la stimulation induit une augmentation de l'activité des protéines G. Chez les plantes, de nombreux groupes de recherche ont montré une implication directe ou indirecte des protéines G dans la transduction du signal et l'induction des réactions de défense (Assmann, 2002; Park *et al.*, 2000; Scheel, 1998; Zhang *et al.*, 2008). En effet, le mastoparan, un activateur de protéines G, induit une accumulation du peroxyde d'hydrogène dans des cellules de soja (Legendre *et al.* 1992). Cette molécule induit également une entrée massive des ions calcium dans les cellules de tabac (Chandra *et al.*, 1997). De même, lors de l'interaction entre le champignon *Cladosporium fulvum* et la tomate, les événements précoces comme l'activation de l'ATPase membranaire, de la NADPH oxydase, des canaux calciques et d'une peroxydase dépendent tous des protéines G (Vera-Estralla *et al.*, 1994 ; Gelli *et al.*, 1997).

Des études génétiques et biochimiques ont montré que les protéines G sont impliquées dans le flux des cations et anions aussi que dans la flambée oxydative (Wang *et al.*, 2001; Assmann, 2002)

Récemment, il a été montré chez des mutants négatifs pour le récepteur de flg22, *FLS2*, que la flg22 inhibe la régulation de l'entrée ou la sortie des ions K<sup>+</sup>. De même la flg22 est incapable d'éliciter ce mécanisme chez les mutants négatifs de la protéine G, *GPA1* (Zhang *et al.*, 2008)

### **1.3.2 Réactions de phosphorylation et de déphosphorylation**

Il est admis que les kinases et les phosphatases jouent un rôle important dans le lien entre différents composants de signalisation et l'interaction entre les différentes voies de signalisation (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Lecourieux *et al.*, 2000). Dès les premières étapes de la perception de l'éliciteur, des protéines kinases et phosphatases contribueraient, avec les protéines G et les adénylates cyclases, à l'influx initial de

cations et à la flambée oxydative (Scheel, 1998). Elles permettent aussi une amplification efficace du signal initial. La phosphorylation et la déphosphorylation sont importantes pour l'activation ou l'inactivation d'un grand nombre de protéines kinases ou enzymes essentiels à la vie de la cellule (Zhao *et al.*, 2005 ; Ptacek et Snyder, 2006 ; Dahan *et al.*, 2009).

La cryptogéine est une protéine élicitrice de 10 kD sécrétée par *Phytophthora cryptogea*, un agent pathogène avirulent de *Nicotiana tabacum*. Elle induit dans un délai de 5 minutes la phosphorylation d'environ 20 polypeptides, ce processus étant en partie sous l'effet d'un afflux primaire des ions de calcium à travers la membrane plasmique (Lecourieux *et al.*, 2000; Wendehenne *et al.*, 2002). La cryptogéine induit également l'activation de MAPK (Mitogen-activated protein kinase), y compris les SIPK (SA-induced protein kinase), les WIPK (Wound-induced protein kinase) et les Ntf4 (une autre MAP kinase qui participe à la mise en place de la RH) (Ren *et al.*, 2006). De même Wendehenne *et al.* (2002) ont montré que la cryptogéine active une protéine kinase de 42kD fonctionnant en aval des flux ioniques. Par conséquent, les inhibiteurs de la protéine kinase suppriment l'ensemble des réponses cellulaires classiquement observées suite au traitement par la cryptogéine (Droillard *et al.*, 1997; Garcia-Brugger, *et al.*, 2006). Dans ce sens, des études pharmacologiques avec ces inhibiteurs ont montré que ces produits entraînent des modifications d'autres événements impliqués dans les réactions de défense, incluant l'inhibition de l'accumulation des espèces activées de l'oxygène, l'activation de certaines protéines kinases, la réaction hypersensible, l'accumulation de l'éthylène, l'activité phénylalanine ammonia-lyase, l'activation de certains gènes de défense et l'accumulation des phytoalexines (Felix *et al.*, 1991; Jabs *et al.*, 1997; Allwood *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2001). A l'opposé, les inhibiteurs de protéine phosphatase (PP) induisent certaines réactions de défense en absence d'éliciteur. La calyculine induit une alcalinisation du milieu extracellulaire avec une hyperphosphorylation de protéines sur des cellules de tomate (Felix *et al.*, 1994) ou une alcalinisation du milieu extracellulaire et un stress oxydatif sur des suspensions cellulaires de tabac (Mathieu *et al.*, 1996) alors que l'acide okadaïque initie un stress

oxydatif (Chandra et Low, 1995) et une accumulation de phytoalexines sur des suspensions cellulaires de soja (MacKintosh *et al.*, 1994).

Un des événements principaux des voies de transduction du signal éliciteur est la transcription de nombreux gènes, qui vont coder entre autres pour des produits à activité antimicrobienne. L'activation de facteurs de transcription est un niveau de régulation supplémentaire où la phosphorylation de protéines intervient. L'exemple le plus démonstratif est fourni après l'interaction de l'éliciteur AvrPto de *Pseudomonas syringae* et le récepteur cytoplasmique kinase Pto (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996). Cette interaction stimule la phosphorylation de ses substrats dont les facteurs de transcription Pti4, 5 et 6 et la sérine/thréonine kinase Pti1 (Gu *et al.*, 2000), ce qui correspond certainement au début d'une cascade de phosphorylation conduisant au stress oxydatif et à la réaction hypersensible (Bogdanove et Martin, 2000).

De même, en aval du complexe AvrPto–Pto, l'activation de la cascade des MAPKs est également initiée rapidement chez les plantes résistantes (Pedley et Martin 2004)

### **1.3.3 Flux ioniques au travers de la membrane plasmique**

En réponse à la détection d'un agent pathogène, l'un des premiers changements métaboliques impliqués dans la transduction de signal est la modification des influx et des efflux ioniques. Ces flux ioniques sont dûs à l'activation de canaux ioniques comme le montre différentes expériences réalisées en utilisant des antagonistes de canaux ioniques animaux sur des cellules végétales (Boller, 1995 ; Zimmermann *et al.*, 1997). Après la reconnaissance de l'éliciteur, les canaux ioniques s'ouvrent et permettent l'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{K}^+$ , de même que la sortie d'ion  $\text{Cl}^-$  (Jabs *et al.*, 1997). Les anions relâchés dans l'apoplaste contribuent à l'alcalinisation du milieu extracellulaire et favorisent ainsi la production du  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la cellule végétale.

Les ions calcium, en particulier, ont un rôle essentiel dans la cascade de signalisation puisqu'ils interviennent à titre de second messager et sont impliqués dans la majorité des événements de transduction de signal menant à l'immunité de la plante contre les agents

pathogènes (Ali *et al.*, 2007). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de canaux calciques ou de chélateurs comme l'EGTA (ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) ou encore l'appauvrissement du milieu en calcium inhibe les réponses spécifiques de l'interaction Cellule/PAMP dans de nombreux cas (Chandra *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Nürnberger et Scheel, 2001). Les ions calcium contribuent aussi à l'activation des cascades de MAPKs, participent à la modulation de la flambée oxydative, à la génération de l'oxyde nitrique (NO), à la RH, à la production de métabolites antimicrobiens et à la production des protéines PRs (Ali *et al.*, 2007; Bouché *et al.*, 2005; Ma et Berkowitz, 2007). Les flux de protons semblent également jouer un rôle important dans l'induction et la régulation des réactions de défense chez le tabac et la tomate (Mittler et Lam.1995 ; Schaller et Oecking, 1999).

Un efflux de potassium et de chlore est également observé lorsque des cellules de persil et de tabac sont respectivement traitées par pep13 ou une élicitrine, la cryptogéine (Kroj *et al.*, 2003, Blume *et al.*, 2000; Viard *et al.*, 1994).

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule gazeuse qui diffuse à travers les membranes biologiques et qui réagit avec d'autres radicaux, des métaux complexés, l'ADN, les lipides et les protéines (Bethke *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2007; Wendehenne *et al.*, 2004). Chez les plantes le NO agit comme messenger dans la transduction des signaux modulant l'expression des gènes de défense (Wang et Wu, 2005). Il peut contribuer à l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  cytosolique (Lamotte *et al.*, 2004). La GMP cyclique (GMPc) et l'ADP ribose cyclique (ADPRc) semblent impliqués dans cette cascade (Delledonne *et al.*, 1998; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Les gènes régulés par le NO peuvent encoder des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans la transduction du signal, des protéines PR ou des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse et d'élimination des espèces activées de l'oxygène (EAOs) (Delledonne *et al.*, 2001; Huckelhoven, 2007; Polverari *et al.*, 2003; Wendehenne *et al.*, 2004). Le NO intervient d'ailleurs dans la production d'AS, avec lequel il agit en synergie, en stimulant la production de la phénylalanine ammonialyase (PAL) (Durner *et al.*, 1998; Delledonne 2001; Romero-Puertas et Delledonne, 2003). De même l'oxyde nitrique participe dans

l'induction de la RH. Pour ce faire, il interagit avec d'autres EAOs, tel que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (De Pinto *et al.*, 2002; Greenberg et Yao, 2004). D'ailleurs, une étude récente sur des plantes de tabac affectées dans la synthèse de la catalase, a montré un nombre restreint de gènes spécifiquement réglés par le NO ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zago *et al.*, 2006). Étonnamment, la plupart de ces gènes ont été modulés par les deux molécules.

### **1.3.4 Production d'espèces activées de l'oxygène et la flambée oxydative**

L'une des premières réponses de la défense des plantes est la génération des espèces activées de l'oxygène (EAOs, flambée oxydative), qui peuvent être détectées quelques minutes après l'élicitation des cellules en culture. La flambée oxydative résulte de la production rapide d'EAOs : l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le OH<sup>•</sup> et en particulier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chacune de ces molécules démontre une réactivité, une durée de vie et une capacité de diffusion différente.

La flambée oxydative peut avoir un effet toxique sur l'agent pathogène envahissant, mais elle agit également de façon indirecte en renforçant la paroi végétale par pontages oxydatifs de protéines ou de polysaccharides (Brisson *et al.*, 1994 ; Lamb et Dixon, 1997) et en augmentant la lignification (Kawasaki *et al.*, 2006). Les EAOs interviennent également dans certains modèles en amont de la production de phytoalexines, dans l'expression de gènes de défense et sur l'initiation de la RH (Low et Merida, 1996). Ils peuvent également agir comme des molécules de signalisation déclenchant une modification de flux ioniques ou la production de second messagers tel l'acide salicylique (Pontier *et al.*, 1998 ; Apel et Hirt 2004 ; Laloi *et al.*, 2004). De même l'état redox permet la régulation de NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related Genes1) une protéine nécessaire pour l'activation de défense dépendant de l'acide salicylique. NPR1 se trouve dans le cytoplasme sous forme d'oligomères inactifs maintenus par des ponts disulfures; après élicitation, sa réduction libère les unités monomériques qui migrent au noyau, où elles interagissent avec des facteurs de transcription de la classe des TGA pour activer l'expression de protéines liées à la défense, notamment la protéine PR1 (Després *et al.*, 2003 ; Glazebrook, 2005).

La réponse par la flambée oxydative doit donc être bien régulée par la cellule pour éviter une toxicité non désirée. En général, la réponse qui suit la reconnaissance de l'agent pathogène est de type biphasique, le second pic de production étant plus spécifique lors de la résistance secondaire (Yoshioka *et al.*, 2003), et implique un certain nombre de protéines dont une oxydase NADPH-dépendante localisée sur la membrane plasmique, une peroxydase située dans la paroi cellulaire et des enzymes de type amine, diamine et polyamine-oxydases apoplastiques (Grant et Loake, 2000).

Des événements de phosphorylation et de déphosphorylation de protéines régulent l'activation de la flambée oxydative. Ce système de régulation est intéressant pour sa rapidité de mise en œuvre et pour le contrôle de son amplitude et de sa durée.

### **1.4 Les messagers secondaires**

Les messagers secondaires sont des petites molécules qui transmettent et modulent les signaux induits par la reconnaissance des PAMPs ou des éliciteurs spécifiques. Cependant, ces événements de reconnaissance individuelle dictent des voies de signalisation spécifiques, utilisant un ensemble distinct de messagers secondaires et activant une chaîne de régulateurs menant à l'expression des gènes de défense de la plante. Le type d'interaction considéré, mènera ainsi à un type de résistance ou à la maladie de la plante (Maleck *et al.*, 2000). Il va sans dire que les réponses de défense de la plante dépendent du mode de vie de l'agent pathogène qui l'infecte. Si elle est confrontée à un agent pathogène biotrophe ayant besoin de cellules vivantes pour proliférer, la plante induira la mise en place des réponses de défense médiées par l'acide salicylique (AS). Dans le cas d'un agent pathogène nécrotrophe, qui tire profit des cellules mortes, la plante induira la mise en place des réponses de défense liées à l'acide jasmonique (AJ) et à l'éthylène (El Oirdi et Bouarab 2007; Glazebrook, 2005). Leur niveau de production dépend de l'agent pathogène impliqué. Outre les molécules mentionnées précédemment, le  $\text{Ca}^{2+}$ , les EAOs et NO sont aussi des messagers secondaires (Hann et Rathjen 2007, Nemchinov, *et al.*, 2008). Ces messagers secondaires

sont essentiels, tant pour l'activation de gènes liés à la défense que pour la mise en place de la mort cellulaire programmée.

### **1.4.1 L'acide salicylique (AS)**

Chez les plantes, on pensait que la biosynthèse de l'AS était précédée par la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Verberne *et al.*, 1999). Après la biosynthèse, la majorité de l'AS est conjuguée au glucose pour former le SA2-*O*- $\beta$ -D-glucoside (SAG) (Malamy *et al.*, 1992). En revanche, certaines évidences suggèrent de plus en plus qu'il serait aussi produit à partir du chorismate qui est converti par l'isochorismate synthase (ICS) en isochorismate et catalysé par l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) en AS et pyruvate (Figure 4) (Wildermuth *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005, Verberne *et al.*, 2000).

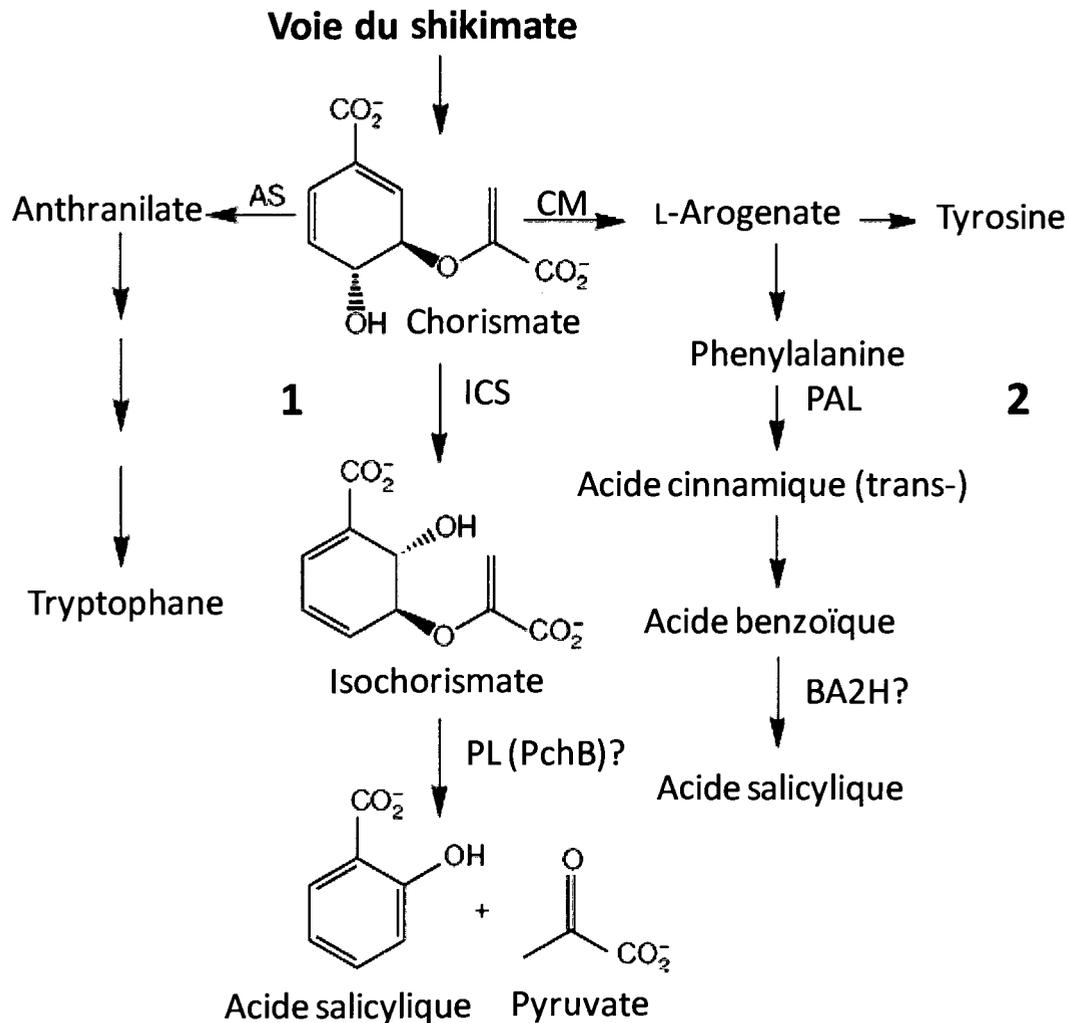
L'acide salicylique joue un rôle très important dans les mécanismes de défense des plantes. En effet, ce composé phénolique, est impliqué à la fois dans la mise en place de la résistance locale et la résistance systémique acquise (RSA) (Durrant et Dong, 2004). De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre AS et RSA. Généralement, ce type de résistance est accompagné de l'accumulation d'AS et de protéines PR (Pathogenesis-Related Proteins). Il peut être induit après une RH locale, peut être associé à la production d'EA0 et parfois à la synthèse de phytoalexines (Sticher *et al.*, 1997; Durrant et Dong 2004; Desender *et al.*, 2007). De même, un traitement exogène d'acide salicylique permet d'induire la RSA (Ward *et al.*, 1991 ; Vernooij *et al.*, 1995). Des plantes de tabac transgéniques *nahG* exprimant l'enzyme salicylate hydroxylase bactérienne NahG, qui catalyse la conversion de l'acide salicylique en catéchol, ne sont plus capables de mettre en place une RSA en réponse à différents agents pathogènes fongiques, bactériens et viraux. L'AS est donc nécessaire à l'induction de la RSA.

Cependant, chez le concombre, des feuilles infiltrées par *Pseudomonas syringae*, excisées 6 heures après l'inoculation (c'est à dire avant que l'acide salicylique ne s'accumule dans le phloème), présentent quand même une induction de RSA contredisant alors les premiers résultats (Rasmussen *et al.*, 1991; Molders *et al.*, 1996). Présentement les

hypothèses sont dirigées vers l'existence d'un composé de nature lipidique qui serait la molécule signal diffusant à travers la plante. Des expériences menées sur des plants mutés au niveau du gène DIR1 (defective in induced resistance 1) montrent que celle-ci développent une résistance locale mais sont cependant incapables d'exprimer la SAR. Ce gène, dont la séquence est proche de celles codant pour des protéines LTPs (lipid transfer proteins), pourrait donc être impliqué dans la synthèse et la transmission du signal lipidique circulant. La signalisation semble néanmoins requérir l'intervention d'une protéine se liant à l'AS, SABP2 (SA-binding protein 2) (Forouhar *et al.*, 2004; Forouhar *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2008), nécessaire à l'activation d'un facteur protéique, NPR1 aussi connu sous le nom NIM1 (Non Immunity 1) qui joue un rôle crucial. Il est considéré comme un régulateur positif central de la cascade de signalisation du phénomène qui mène à l'expression des gènes de défense tels que ceux codant pour les protéines PR (Durrant et Dong 2004; Pieterse et Van Loon 2004). La fixation de l'AS sur SABP2 provoquerait un changement du potentiel redox dans le milieu intracellulaire. Des oligomères de NPR1 seraient alors convertis en monomères capables de migrer vers le noyau et d'interagir avec des facteurs de transcription, de la famille TGA. Ces facteurs TGA activés se lient au promoteur de certains gènes PRs et induisent leur transcription (Fobert et Després, 2005; Pieterse et Van Loon 2004). Des plantes d'*A. thaliana* mutées pour le gène *npr1*, ne répondent plus à l'AS, ne peuvent pas déclencher l'expression de protéines PR et sont rendus fortement susceptibles à divers agents pathogènes (Cao *et al.*, 1998). En plus du régulateur positif NPR1, un régulateur négatif SNI1 (Suppressor of NPR1, Inducible) de la SAR a été découvert récemment chez *A. thaliana* qui est nécessaire pour amortir l'expression basale des gènes PRs (Mosher *et al.* 2006). Cette protéine SNI1 s'accumule dans le noyau et ensuite provoque une répression des gènes stimulés par NPR1 (Mosher *et al.*, 2006).

Récemment le groupe de Klessig a montré que l'activité de méthyl salicylate (MeSA) estérase du SABP2, qui permet la conversion du MeSA en AS est requise pour la perception du signal de la SAR dans les plantes de tabac (Park *et al.*, 2007). Les mêmes résultats ont été confirmés par le même groupe, en utilisant un analogue à l'AS, le 2,2,2,2,-tetrafluoroacetophenone (tetraFA) qui, inhibe compétitivement l'activité de

l'estérase (SABP2) qui prend le MeSA comme substrat, ce qui a pour conséquence d'inhiber la SAR (Park *et al.*, 2009).



**Figure 4: Les Voies de biosynthèse de l'acide salicylique dans la plante.** (1) par l'isochorismate synthase (ICS). Chez les bactéries, cette voie exige la pyruvate lyase (PL; PchB dans *P. aeruginosa*). (2) la voie de biosynthèse de l'AS passant par la PAL et l'acide-2 benzoïque hydroxylase (BA2H) est également montrée. (Wildermuth *et al.*, 2001)

### **1.4.2 Acide jasmonique (AJ)**

L'acide jasmonique et son dérivé volatil le méthyljasmonate (MeJA), communément appelés les jasmonates sont des produits de la voie des octadécanoïdes. Les précurseurs de l'AJ sont l'acide linoléique (C18 :3) et l'acide hexadécatriénoïque (C16 :3) (Schaller *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2006) (figure 5).

Les jasmonates sont des hormones agissant comme régulateurs des réponses de stress biotiques et abiotiques incluant les blessures et les insectes ainsi que la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes comme *Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea* (Wasternack et Hause, 2002; Penninckx *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998).

L'accumulation des jasmonates permet la transcription de gènes encodant des protéines de défense, telles que des défensines végétales et des thionines, ainsi que des gènes régulant leurs propre synthèse (Glazebrook *et al.*, 2003). Ils sont aussi impliqués dans la flambée oxydative. L'AJ (et le méthyle jasmonate) interagit avec la protéine d'insensibilité à la coronatine (COI1) (Xie *et al.*, 1998). COI1 est une protéine E3 ubiquitine ligase contenant un motif de boîte F en N-terminal et un domaine LRR en C-terminal. La protéine COI1 fait partie d'un complexe protéique SCF (SKP1/CDC53p/CUL1 boîte F). COI1 ubiquitine spécifiquement certaines protéines, qui sont ensuite dirigées par SCF<sup>COI1</sup> afin d'être dégradées par le protéasome 26S (Xu *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2002; Devoto et Turner, 2003; Lorenzo et Solano, 2005; Xiao-Yi *et al.*, 2007). Il a été montré que le complexe SCF<sup>COI1</sup> est responsable de la dégradation de répresseurs de gènes liés à la défense. Une fois le répresseur dégradé, les facteurs de transcription induits par l'AJ peuvent se lier aux régions promotrices afin de permettre la transcription des gènes de défense. Parmi ces facteurs, on compte le facteur de transcription sensible à l'éthylène 1 (ERF1) et le facteur de transcription JIN1 (insensible au jasmonate 1), qui modulent l'expression de groupes de gènes distincts.

Récemment, des protéines nommées JAZ (Jasmonate ZIM (Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristems)-domain protein) ont été identifiées en tant que répresseurs de

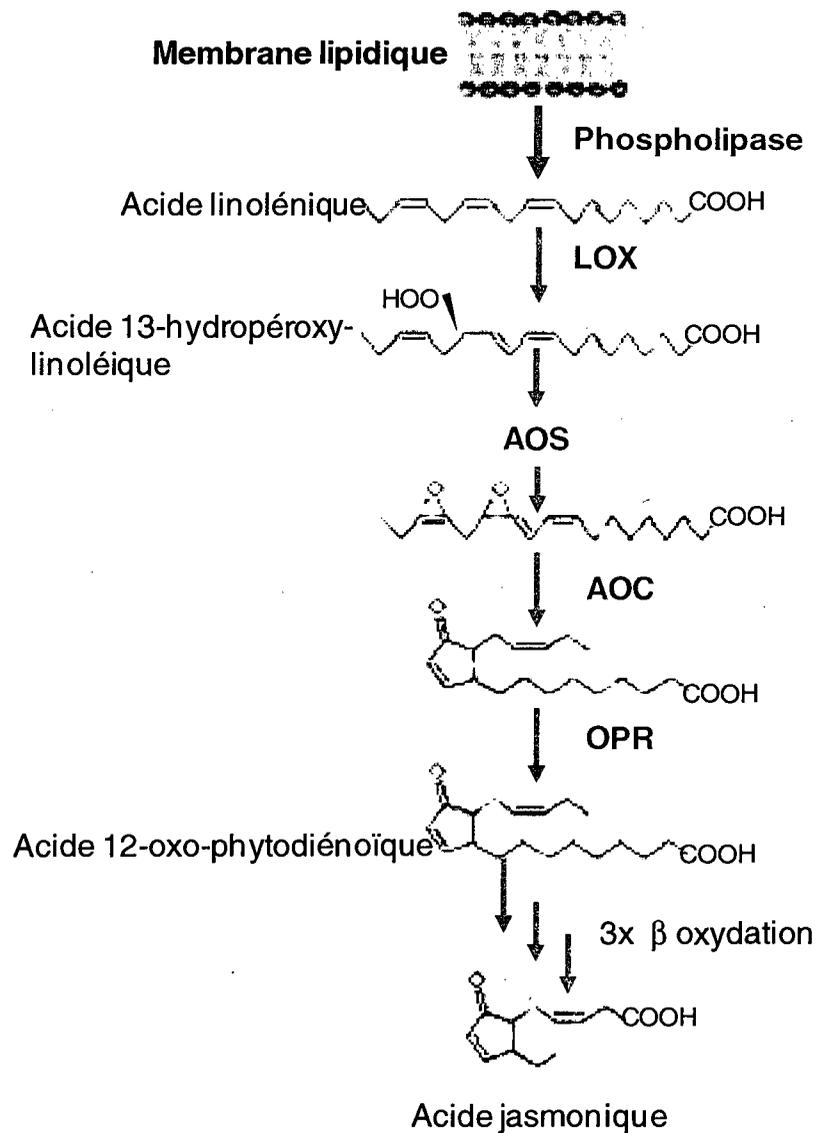
la transcription des gènes dépendant de l'AJ. Ces répresseurs sont les cibles directes du complexe SCF<sup>COI1</sup> E3 ubiquitine ligase (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007).

En fait les protéines JAZ répriment l'expression de gènes dépendant de l'AJ en supprimant activement les facteurs de transcription de ces gènes tel que MYC2 (Chini *et al.*, 2007; Staswick, 2008). Pour confirmer cette hypothèse, l'utilisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* qui expriment une forme mutée dominante de JAZ1 (JAZ1Δ3A) a montré que JAZ1Δ3A n'est pas ubiquitinée par le complexe SCF<sup>COI1</sup> ce qui confère à la plante une insensibilité à l'AJ similaire à celle observée pour le mutant *coi1* (Thines *et al.*, 2007).

### **1.4.3 L'éthylène (ET)**

L'ET est une petite hormone diffusible, synthétisée à partir des précurseurs S-adenosyl-méthionine et 1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid (ACC). Plusieurs enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de l'ET: il s'agit des ACC synthases (ACS) et ACC oxydases (ACO) (Wang *et al.*, 2002). L'ET est connu pour réguler de multiples processus physiologiques et développementaux, comme la germination, la sénescence des fleurs et des feuilles, la maturation des fruits ou encore l'abscission. L'ET est également impliqué dans la réponse des plantes à des stress biotiques et abiotiques, ainsi que dans les interactions plante-agent pathogène. Cette hormone mène, d'une part, à l'expression de gènes liés à la mise en place des barrières physiques, à la production d'enzymes nécessaires à la production de métabolites secondaires antimicrobiens et de protéines PR (Broekaert *et al.*, 2006; Huckelhoven, 2007). D'autre part des plantes affectées dans la biosynthèse de l'ET peuvent montrer une sensibilité accrue ou, au contraire, une résistance plus élevée aux agents pathogènes. Les connaissances actuelles étant limitées, les rôles de l'éthylène au niveau des interactions plante-agent pathogène demeurent obscurs (Bouchez *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, le mutant *ein2* (ethylene insensitive2) présente une sensibilité accrue aux agents pathogènes nécrotrophes *Erwinia carotovora* et *Botrytis cinerea* (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 1999), alors que le même mutant infecté par

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ou *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* n'a pas montré de différence de résistance, voir même une diminution des symptômes est observée (Lawton *et al.*, 1994).



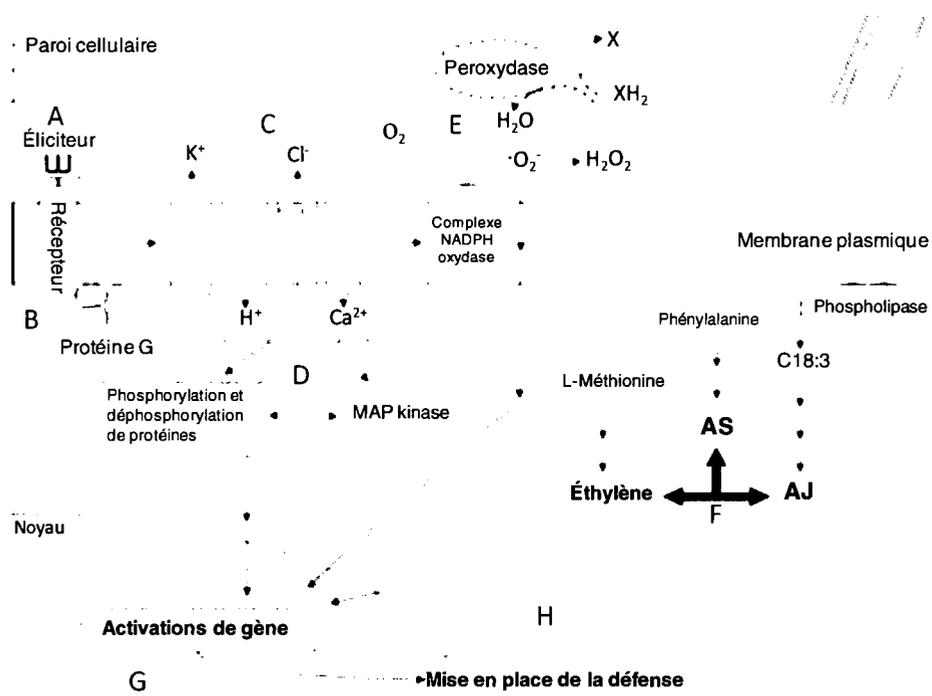
**Figure 5: Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique dans la plante par l'intermédiaire d'acide 12-oxophytyldiène.** (AOS allène synthase; AOC : allène oxyde cyclase; LOX : lipoxygénase; OPR : 12-oxo-phytyldiène oxyde réductase)

Ces résultats semblent indiquer que l'ET serait plus particulièrement impliqué dans la régulation de la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes. Cependant, de nombreuses données ont été obtenues, parfois contradictoires, et démontrent la complexité de la régulation de la résistance par l'ET (Broekaert *et al.*, 2006).

En résumé, un modèle simplifié de la transduction de signal et de la mise en place des réponses de défense est illustré à la figure 6. Il permet de montrer les étapes importantes de la transduction de signal.

#### 1.4.4 Les interactions entre l'AS, l'AJ et l'ET

Le rôle de l'AS, l'AJ, et l'ET dans la régulation des défenses induites chez les plantes est bien établi. Ces phytohormones sont identifiées comme les principales clés impliquées dans la régulation des voies de signalisation (Lorenzo et Solano, 2005; Pozo *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006; Von Dahl et Baldwin, 2007).



**Figure 6: Modèle simplifié de la transduction de signal et de la mise en place de la défense lors des interactions plante-agent pathogène.** La rencontre d'un éliciteur et de

son récepteur approprié (A) enclenche une transduction précoce (B, C, D, E). Le tout sera suivi d'une induction tardive dans les cellules infectées ainsi que dans les cellules avoisinantes (F). Toutes les transductions se traduisent par une activation de plusieurs gènes (G) qui à leur tour mèneront à la défense de la plante (H). (Adapté de Somssich et Hahlbrock, 1998)

Bien que la majorité des recherches indiquent des interactions antagonistes entre ces différentes voies de signalisation, des interactions synergiques ont été aussi décrites (Schenk *et al.*, 2000 ; Van Wees *et al.*, 2000 ; Mur *et al.*, 2006). Ces voies agiraient aussi avec d'autres mécanismes pour former un réseau de régulation modulable permettant à la plante d'initier une réponse défensive spécifique en fonction de la nature de l'agent pathogène, qu'il soit champignon, bactérie, virus, insecte ou nématode (De Vos *et al.*, 2005). Dépendamment aussi de la classe des agents pathogènes qui interagissent avec la plante, généralement deux grandes voies peuvent être définies, ainsi les agents pathogènes biotrophes sont plus sensibles aux défenses induites par l'AS, tandis que la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes est médiée par l'AJ/ET (El Oirdi et Bouarab 2007; Kessler et Baldwin, 2002; Glazebrook, 2005). Le plus souvent, deux grandes voies peuvent être définies: la voie de l'AS et la voie regroupant l'ET et l'AJ. Les événements moléculaires associés à l'existence d'interactions entre les voies AS, AJ et ET sont mieux connus. Il a été montré que la plupart des interactions entre AS et AJ consistent en des répressions mutuelles, mais quelques gènes peuvent être induits par une application exogène de l'AS mais également par une application exogène de l'AJ (Glazebrook *et al.*, 2003 ; Kunkel et Brooks, 2002 ; Schenk *et al.*, 2000). Les mutants *sid1* et *sid2* (Salicylic acid Induction Deficient) affectés dans la voie de l'AS, ont montré une augmentation de la production de l'AJ après infection avec *P. syringae*. Ce qui indique une interaction antagoniste entre l'AS et l'AJ (Heck *et al.*, 2003).

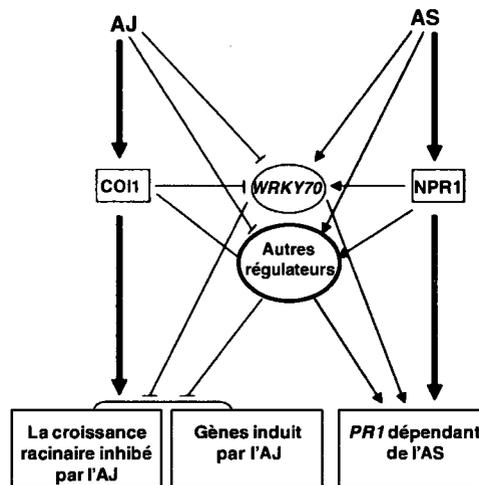
Les facteurs de transcription de type WRKY sont des régulateurs importants des réponses de défense dépendant de l'AS (Wang *et al.*, 2006). Certains d'entre eux sont impliqués dans l'interaction entre les différentes voies de signalisation (Koornneef et Pieterse 2008), Notamment le facteur de transcription WRKY70 qui joue un rôle important dans

l'interaction entre ces voies de signalisation. En fait la surexpression de ce gène active de façon constitutive la voie de l'AS alors que sa suppression favorise l'expression des gènes de défense dépendant de la voie de l'AJ (*COI1*) (Li *et al.*, 2004., Li *et al.*, 2006). Ces chercheurs ont noté que la production de ces deux phytohormones n'a pas été affectée, ce qui indique que *WRKY70* interagit avec les gènes en aval de la biosynthèse de l'AS et l'AJ.(figure 7). D'autres facteurs de transcription de type *WRKY* comme *WRKY62*, *WRKY 11* et *WRKY 17* ont plusieurs rôles dans la régulation de l'interaction entre les voies de signalisation de l'AS et de l'AJ (Koornneef et Pieterse, 2008). Cependant les mécanismes qui gèrent ces interactions par les *WRKY* restent obscurs. Très récemment, il a été reporté que *WRKY70* est important mais n'est pas indispensable pour les voies de signalisation de l'AS et l'AJ (Ren *et al.*, 2008). En fait, l'inactivation du gène *WRKY70* dans le mutant *wrky70-1* n'altère pas les réponses de l'AS et l'AJ. Cependant, la surexpression de *WRKY70* réduit l'expression des gènes dépendant de l'AJ et active l'expression de la protéine *PR1* dépendant de l'AS (Ren *et al.*, 2008). D'autre part, un autre gène *NPR1* qui code pour une protéine contenant des domaines « ankyrin repeat » et possède des homologies avec des facteurs de transcription animaux (Aravind and Koonin, 1999., Cao *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1997; Després *et al.*, 2000; Ryals *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 2003 ; Rochon *et al.*, 2006), interagit physiquement avec des facteurs de transcription de type TGA qui régulent l'expression des gènes *PR* (Després *et al.*, 2000; Després *et al.*, 2003). Le complexe *NPR1*-TGA semble être important pour régler l'expression des gènes de défense dépendant de la voie de signalisation de l'AS notamment la *PR1* (Durrant et Dong, 2004). La localisation nucléaire de *NPR1* n'est pas nécessaire pour la suppression de la voie de signalisation de l'AJ. En revanche, *NPR1* présent dans le cytoplasme régule la voie de l'AJ (Spoel *et al.*, 2003). Kachroo *et al.*, (2003) ont démontré par l'utilisation des mutants *ssi2* et *fab2* d'*A. thaliana*, «affectés dans des steryl ACP desaturases» qui présentent une activation constitutive de la voie de l'AS, que l'expression de *PDF1.2* induite normalement par l'AJ est affectée. Ces deux enzymes pourraient être à l'origine d'un signal lipidique qui régule les interactions entre les deux voies de l'AS et l'AJ.

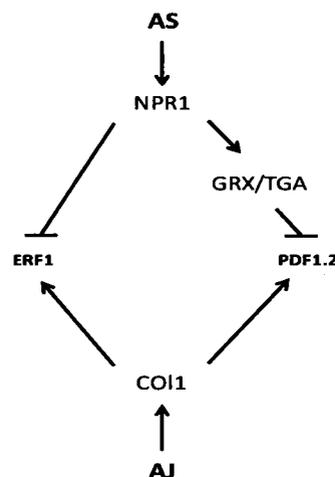
L'ET est capable d'interagir avec la voie de l'AS. Les mutants *cpr5* et *cpr6* expriment tous les deux les marqueurs de défense *PR1* qui dépend de l'AS et *PDF1.2* dépendant de l'AJ/ET en absence de tout agent pathogène. Le mutant *cpr5* exprime plus fortement la *PR1* que le mutant *cpr6* alors que l'expression de *PDF1.2* est plus faible. De même, l'expression de *PR-1* chez ces mutants est partiellement dépendante de NPR1, indiquant l'existence d'une voie d'activation de *PR1* indépendante de NPR1 (Bowling, *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998; 2000). L'analyse des doubles mutants a révélé que *cpr5/npr1*, *cpr5/ein2* et *cpr5/jar1* sont résistants au *Peronospora parasitica*, alors que les triples mutants *cpr5/npr1/ein2* et *cpr5/npr1/jar1* ne le sont pas, suggérant que les deux voies l'AS et l'AJ/ET sont suffisantes pour établir la résistance contre cet agent pathogène. D'autre part, dans le cas de *cpr6*, le double mutant *cpr6/npr1* maintient la résistance contre *P. Parasitica* alors que *cpr6/ein2* et *cpr6/jar1* ne le sont pas ce qui montre que dans ce cas la résistance dépend de l'activation de la voie de signalisation de l'AJ/ET. Ces résultats devraient être interprétés avec prudence, puisque la présence d'*ein2* augmente la production de l'AS dans le mutant *cpr5* et le diminue dans le mutant *cpr6*, suggérant que l'interaction est beaucoup plus complexe entre la voie de signalisation de l'AS et celle de l'ET (Clarke *et al.*, 2000).

Comme cela a été décrit auparavant, le changement du potentiel redox dans le milieu intracellulaire induit par l'AS active *NPR1* qui à son tour induit l'expression du gène *PR1* (Pieterse et Van Loon 2004; Mou *et al.*, 2003; Fobert et Després, 2005). En plus, *NPR1* est requise pour l'antagonisme entre les voies de l'AS et l'AJ (Spoel *et al.*, 2003). D'un autre côté, plusieurs équipes de recherche ont montré que les glutaredoxines (GRXs) qui sont de petites protéines redox de la superfamille des thioredoxines (TRX), sont impliqués dans les réactions qui réduisent les ponts disulfides par l'intermédiaire d'un mécanisme de monothiol ou de dithiol. La réaction implique des domaines conservés qui contiennent deux cystéines (CXXC) dans le mécanisme de dithiol, ou une cystéine (CXXS) dans le mécanisme de monothiol (Hoog *et al.*, 1983; Koornneef et Pieterse 2008; Lemaire, 2004; Rouhier *et al.*, 2004). Ainsi, les glutaredoxines peuvent fonctionner comme transducteurs du changement redox induit par l'AS. Très récemment, il a été montré que la glutaredoxine 480 (GRX480) est impliquée dans la régulation de

l'interaction entre les voies de signalisation de l'AS et de l'AJ et que la GRX480 interagit avec le facteur de transcription TGA qui se trouve lié au promoteur du gène *PDF1.2*, ce qui supprime son expression (Ndamukong *et al.*, 2007). De même, il a été démontré que l'expression de *GRX480* est induite par l'accumulation de l'AS et dépend de NPR1. Alors que la surexpression de *GRX480* chez *A. thaliana* inhibe l'expression de *PDF1.2* dépendant de la voie de l'AJ (figure 8).



**Figure 7: Modèle montrant le fonctionnement de *WRKY70* avec les autres régulateurs dans la modulation de l'interaction entre l'AJ et l'AS (Ren *et al.*, 2008)**



**Figure 8: Représentation schématique des mécanismes montrant l'effet antagoniste de l'AS sur des gènes de défense dépendant de l'AJ. (modifié d'après Ndamukong *et al.*, 2007)**

## **2. Caractérisation des mécanismes de défense induits chez les plantes**

### **2.1 Mise en place de réponse de défense**

Les plantes ont élaboré au cours de leur évolution des moyens de défense efficaces notamment par le développement des défenses induites, en passant par la reconnaissance, la signalisation, l'expression des gènes de résistance et la RH. En parallèle, les plantes ont développé des défenses constitutives, constituées de barrières physiques, telles les parois ou le cytosquelette de la cellule végétale, mais aussi des barrières chimiques, regroupant différentes classes de composés antimicrobiens

#### **2.1.1 La réaction hypersensible**

La réaction hypersensible (RH) est un mécanisme complexe de défense induit par une plante suite à l'infection par des agents pathogènes de nature variée (Morel et Dangl, 1999 ; Heath, 2000). Elle est un type de mort cellulaire programmée (MCP), à l'instar de l'apoptose chez les cellules animales. Cette RH se caractérise par la mort des cellules végétales au site d'infection par l'agent pathogène et ceci en quelques heures seulement (Goodman et Novacky, 1994). Phénotypiquement la mort des cellules (nécrose) peut être localisée ou au contraire très étendue. Il est admis que la nécrose circonscrit l'agent pathogène et entrave sa dissémination dans la plante (Lam *et al.*, 2001; Lam 2004). La RH constitue le point culminant de la résistance dans le cadre de plusieurs interactions plante-agent pathogène (Greenberg et Yao, 2004). En outre, il faut noter que les cellules subissant la mort cellulaire programmée permettent la génération de signaux qui seront transmis dans les cellules adjacentes et par la suite à l'ensemble de la plante, activant ainsi des réponses de défense préventives (Durrant et Dong 2004).

Comme je l'ai décrit précédemment l'AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, et les cascades de MAPKs constituent les principaux acteurs dans l'induction de la RH, bien qu'elle semble également régulée en partie par des voies indépendamment de ces facteurs. La

reprogrammation métabolique menant à la RH débute en moins d'une heure et les signes visibles de la MCP apparaissent aussi peu que six heures après l'infection par l'agent pathogène (Huckelhoven, 2007). En revanche, la RH nécessite une surveillance métabolique étroite pour que cette réponse reste confinée à la cellule infectée et ne soit pas nuisible aux cellules avoisinantes. Cette régulation s'effectue entre autre via le renforcement des parois cellulaires et la détoxification des EAOs médiées par le NO, de même que la production d'enzymes et d'antioxydants (Greenberg et Yao, 2004; Lamb et Dixon, 1997). Cependant, même si la RH est efficace contre un grand nombre d'agents pathogènes, elle peut dans certains cas être néfaste pour la plante. En effet, la RH n'est pas souhaitable lors d'une agression par un agent pathogène nécrotrophe, lequel bénéficierait de la mort des cellules pour sa progression (Govrin et Levine, 2000; Kiraly *et al.*, 2007). Govrin et Levine (2000) ont proposé que la mort cellulaire induite par *B. cinerea*, un champignon nécrotrophe, est une forme de RH, et que l'induction de cette mort de cellules constitue une composante importante dans sa virulence. De plus, d'autres travaux ont supporté d'avantage cette proposition. L'induction de la mort cellulaire par une pré-infection avec un agent pathogène virulent favorise la prolifération de *B. cinerea*. Par contre, l'expression d'un gène animal antiapoptotique mène à l'augmentation de la résistance au même agent pathogène (Dickman *et al.*, 2001).

*EDSI* (sensibilité à la maladie accrue «enhanced disease susceptibility») code pour une protéine qui présente une homologie avec les lipases et qui est nécessaire pour la résistance, y compris la RH, médiée par les protéines R présentant le domaine TIR (Falk *et al.*, 1999; Peart *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). D'autres régulateurs essentiels pour le fonctionnement des gènes R ont été récemment identifiés. Notamment SGT1 (suppresseur de l'allèle G2 de Skp1 «suppressor of the G2 allele of Skp1»), dont le rôle est de réguler la dégradation de certaines protéines en adressant celles-ci vers le protéasome. En effet SGT1 interagit avec une « ubiquitine ligase E3 » faisant partie du complexe SCF (pour Skp1-Culline-F-box), impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines (Catlett et Kaplan, 2006). De même SGT1 contrôle la RH induite par plusieurs systèmes d'interaction gène pour gène ainsi que les mécanismes de

défense non hôte (Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002; Tör *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2005).

J'ai montré récemment que *B. cinerea* active l'expression des gènes *EDS1* et *SGT1*. Par ailleurs, le silencing de ces deux gènes réduit la mise en place de la maladie chez *N. benthamiana*. De même des plantes de tabac qui sur-expriment la p35 (baculovirus antiapoptotic protein, une protéine antiapoptotique) sont plus résistantes à *B. cinerea* que les plantes de type sauvage. Ceci suggère que *B. cinerea* utilise la voie qui mène à la mise en place de la RH pour instaurer sa maladie (El Oirdi et Bouarab, 2007).

### **2.1.2 Renforcement de la paroi cellulaire**

Il est évident que la réponse des plantes à l'agent pathogène pendant les minutes qui suivent l'élicitation, est corrélée avec le remodelage et le renforcement de la paroi cellulaire, impliquant une réorganisation du cytosquelette couplée à l'apposition de la paroi cellulaire (formation de papilles), le dépôt de barrières nouvellement formées comme la callose, un polymère de glucose ( $\beta$ -1,3-glucose) et la lignification des parois cellulaires (Huckelhoven, 2007; Soyly 2006). Les papilles sont des dépôts de matériel cellulaires formant une barrière plus épaisse au point d'infection. Elles sont constituées de callose, de composés antimicrobiens, de composés phénoliques et de silicone, en plus des constituants normaux de la paroi (Hardham *et al.*, 2007). Ainsi, une grande quantité de callose et de composés phénoliques (lignification) est rapidement accumulé au site d'infection chez les plantes traitées par des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et dans certains pathosystèmes tels que concombre/*Colletotrichum orbiculare* par traitement avec *Serratia marcescens* (Jeun *et al.*, 2004). Récemment il a été montré que le xanthane produit par *Xanthomonas campestris pv campestris* supprime l'accumulation de la callose dans *N. benthamiana*, rendant ces plantes plus sensibles, tandis que, des plantes de *N. benthamiana* infectées avec des mutants de *X. campestris pv campestris*, affectés dans la biosynthèse du xanthane, accumulent la callose et sont ainsi résistantes à cette bactérie (Yun *et al.*, 2006).

Les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) interviennent aussi dans le renforcement de la paroi. Elles s'accumulent lors de l'infection, parallèlement à l'augmentation de la résistance (Benhamou, 1996; Ribeiro *et al.*, 2006). Ces protéines forment un réseau serré, empêchant ainsi la pénétration de l'agent pathogène, et possèdent aussi la propriété d'agglutiner les bactéries réduisant ainsi leur mobilité.

D'autres molécules s'accumulent pendant l'élicitation, notamment la lignine. La lignine est un composé phénolique imperméable et plus résistant à la pression mécanique, donc moins accessible aux enzymes de dégradation de la paroi. La production d'EAOs est observée aux sites d'appositions de la paroi et favorise la réticulation des composés de la paroi et la lignification (Huckelhoven, 2007)

### **2.1.3 Les phytoalexines**

Dès les premières heures suivant la reconnaissance de l'agent pathogène, les cellules des plantes subissent de profonds changements métaboliques. Les plantes produisent et accumulent un large éventail de métabolites secondaires, dont certains possèdent une activité antimicrobienne. Certains de ces métabolites, les phytoanticipines, se retrouvent constitutivement sous une forme active dans les cellules végétales (Morrissey et Osbourn 1999; Osbourn, 1996). D'autres, appelées phytoalexines, sont activés suite à l'élicitation par un agent pathogène (De Wit, 1997). Les phytoalexines sont des composés de petits poids moléculaires, lipophiles et antimicrobiens qui s'accumulent rapidement autour des sites de nécrose. Leur production est localisée et non systémique et est également fortement induite lors des interactions plantes-agents pathogènes ou lors du traitement de plantes par des éliciteurs (Rustérucci *et al.*, 1996 ; Hammerschmidt, 1999). Ces composés sont regroupés en plusieurs familles, les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les polycétides. Les composés phénoliques comprennent aussi les dérivés des phénylpropanoïdes, dont font partie les flavonoïdes, les isoflavonoïdes et la lignine. Certains de ces composés, la scopolétine produite chez le tabac par exemple, sont auto-fluorescents après excitation aux rayonnements UV (Hahlbrock *et al.*, 2003). Ces métabolites autofluorescents permettent de bloquer la propagation de l'agresseur et confèrent ainsi une résistance à la plante vis-à-vis de son

agent pathogène. Plusieurs mutants sont utilisés pour prouver l'importance de la phytoalexine dans la protection des plantes contre la progression des agents pathogènes, notamment le mutant *pad3-1* (Phytoalexines-deficient) d'*A. thaliana* a montré une sensibilité accrue à *Alternaria brassicicola*, alors que les plantes de type sauvage sont résistantes et produisent même une réaction hypersensible typique après l'inoculation par ce champignon (Kirankumar *et al.*, 2004). PAD3 est requis pour la biosynthèse de camalexine (une phytoalexine) chez *A. thaliana* et code pour une monooxygénase cytochrome P450 putative.

### **2.1.4 Les protéines PR**

Des études plus récentes ont permis de caractériser de nombreux marqueurs moléculaires corrélés à l'apparition de RSA. C'est le cas d'une famille de protéines reliées à la pathogénèse (PR). Ces protéines de défense peuvent être induites par un stress biotique ou abiotique ou encore lors de certains stades de développement de la plante. Les protéines PR ont été caractérisées pour la première fois chez le tabac réagissant de façon hypersensible à l'infection par le V.M.T. (virus de la mosaïque du tabac), (Gianinazzi *et al.*, 1970; Van Loon et Van Kammen, 1970). Ces protéines ont des propriétés physico-chimiques communes: elles sont très stables en milieu acide et résistent à l'action des protéases produites par la plante ou l'agent pathogène pendant l'interaction. Ces caractéristiques leur confèrent une grande stabilité dans la vacuole, et dans les espaces intercellulaires occupés par les agents pathogènes.

Les protéines PR peuvent agir dans la signalisation liée à la défense, notamment par la participation dans le renforcement de la paroi cellulaire, leur activité antimicrobienne ou la stimulation de la production d'autres protéines PR. Certaines protéines PR dégradent la paroi des champignons et les fragments libérés sont reconnus en tant qu'éliciteurs généraux ou PAMPs (Govrin et Levine, 2000; Kiraly *et al.*, 2007). Au moins dix-sept familles de protéines PR ont été identifiées chez les plantes, en plus d'une dix-huitième famille putative. Cependant leurs rôles et fonctions enzymatiques n'ont pas tous été élucidés. La classification dans le tableau 1 présente toutes les formes de protéines PR

isolées à ce jour, mais toutes ne sont pas forcément présentes en même temps dans une plante donnée (van Loon et Van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

Le premier groupe de protéines PR mis en évidence est la famille des protéines PR-1. Ce sont les protéines les plus abondantes qui comprennent différents membres (PR-1a, PR-1b, PR-1c). Leur activité biologique n'est pas encore connue (Conrath *et al.*, 2002). Cependant, certaines protéines PR-1 sont capables d'inhiber la germination de zoospores de *Phytophthora infestans* (Niderman *et al.*, 1995 ; van Loon *et al.*, 2006). De plus, la surexpression de *PR-1a* par transgénèse chez le tabac montre une augmentation de la résistance à des agents pathogènes comme *Phytophthora parasitica* (Alexander *et al.*, 1993). Les PR-1 sont souvent utilisées comme marqueurs de la résistance puisqu'elles sont omniprésentes lors de la mise en place des réponses de défense contre divers agents pathogènes.

Le rôle de certaines protéines PR a pu être déterminé, notamment, les PR-2 une famille d'endo- $\beta$ 1,3-glucanases qui ont une spécificité pour les  $\beta$ -1-3 glucanes. Elles comprennent différents membres PR-2a, PR-2b et PR-2c. De même la classe des chitinases représentée par les PR-3 (PR-3a et PR-3b aussi appelée PR-Q'), PR-4 (PR-4a et PR-4b), PR-8 et PR-11. Ces enzymes s'attaquent à la chitine qui avec les  $\beta$ -1-3 glucanes sont les constituants majeurs de la paroi de certains champignons (Thevissen *et al.*, 1996). Les chitinases ont également une autre activité, l'activité lysozyme qui permet l'hydrolyse des peptidoglycanes des bactéries.

La famille des protéines PR-5, souvent appelées protéines de type thaumatine du fait de leur homologie de séquence avec des thaumatines humaines. Elles comprennent l'osmotine, PR-5a et PR-5b. Elles ont aussi une activité antifongique (Abad *et al.*, 1996 ; Morohashi et Matsushima, 2000; Ribeiro *et al.*, 2006; van Loon *et al.*, 2006).

Les protéines PR-6 sont des inhibiteurs de protéases impliquées dans la défense contre les insectes et aux herbivores (Koiwa *et al.*, 1997). D'autres sont des endoprotéases, nommées, les protéines PR-7. Elles ont été mises en évidence seulement chez la tomate.

Les protéines PR-9 sont des peroxydases dont la fonction est de renforcer les parois cellulaires suite à une élicitation. Les protéines PR-10 sont apparentées aux ribonucléases (Moiseyev *et al.*, 1997). Ces protéines possèdent aussi des propriétés antifongiques. Les défensines et les thionines font partie des familles de protéines PR-12 et 13 respectivement. Ce sont de petites protéines de 3 à 5 kDa riches en cystéines possédant des propriétés antimicrobiennes (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Les protéines de transfert de lipides (LTP) appartiennent à la famille des protéines PR-14. Ce sont de petites protéines riches en cystéine. L'expression de certaines de ces protéines est stimulée lors d'interaction plante-agent pathogène (Garcia-Olmedo *et al.*, 1995; Jung et Hwang, 2000; Park *et al.*, 2002). Les LTP partagent avec les thionines et les défensines, la capacité d'inhiber la croissance bactérienne et fongique (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001).

Les oxalate oxydases et les oxalate oxydases-like d'orge représentent les classes de protéines PR-15 et PR-16 respectivement. Une augmentation de l'activité de ces enzymes est observée dans les extraits de feuilles de blé et d'orge inoculées par *Erysiphe graminis* (Dumas *et al.*, 1995 ; Zhou *et al.*, 1998).

La dernière classe de protéines PR, les PR-17, est représentée par une protéine du tabac NtPRp27 de nature et de fonction inconnue dont l'expression est induite lors de l'interaction incompatible tabac/VMT (Okushima *et al.*, 2000).

Des protéines présentant des homologies avec les protéines PR ont été identifiées, mais ne peuvent être classifiées selon les critères de ces familles. Parmi celles-ci, on compte une amylase produite par le tabac, des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs) et des protéines riches en glycine, la protéine DRR206 du pois, des protéines inhibitrices de polygalacturonase, des lipoxygénases et des produits de gènes homologues aux lipases (Sachetto-Martins *et al.*, 2000; van Loon *et al.*, 2006). L'expression de tous ces gènes peut-être induite par différents agents pathogènes chez différentes plantes. Mais la nature des gènes induits et leur intensité est différente suivant les plantes.

### **2.2 L'ARN interférence (ARNi)**

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme naturel, qui a d'abord été identifié sous le nom de PTGS chez les plantes pour « *Post-Transcriptional Gene Silencing* » (EGPT, l'extinction génique post-transcriptionnelle) dans les années 1990 (Fire *et al.*, 1998; van der Krol *et al.*, 1990; Romano et Macino, 1992). Il s'agit d'un processus qui consiste à réduire drastiquement si non à inhiber l'expression de gènes cibles en dégradant leur ARN messenger (ARNm) de manière séquence-spécifique. Par la suite, ce phénomène s'est avéré présent chez de nombreux organismes notamment, les champignons (Segers *et al.*, 2007; Romano et Macino, 1992), les insectes (Kennerdell et Carthew 1988) et les mammifères dont la souris et l'humain (Svoboda *et al.*, 2000, Chiu et Rana 2002).

De nombreuses recherches ont montré que le PTGS constituait un mode de résistance antiviral répandu chez les plantes (Lindbo *et al.*, 1993; Ratcliff *et al.*, 1999; waterhouse *et al.*, 2001). Désormais, l'idée que le PTGS est un moyen de défense antiviral est renforcé par l'interaction naturelle entre plante et virus.

Les plantes peuvent se rétablir de certaines infections virales et devenir ensuite résistantes à une réinfection par le virus initial et les virus du même groupe. Ceci est dû à l'ARN interférence, dont l'efficacité repose sur l'amplification du signal et sur sa propagation locale et systémique. L'amplification du PTGS antiviral vise à assurer une réponse plus robuste et plus durable (Wassenegger et Krczal, 2006). D'autre part, un ensemble de virus code pour des protéines qui supprime le PTGS, suggérant ainsi une coévolution entre le virus et l'hôte (Voinnet *et al.*, 1999; Voinnet, 2005). En plus de son rôle dans la résistance antivirale chez les plantes, le PTGS contrôle aussi le développement et la différenciation cellulaire ainsi que la dégradation des ARNm transcrits en quantité trop importante ou montrant des aberrations. Le PTGS est, par exemple, impliqué dans la floraison, le développement des feuilles et la réponse à l'auxine (Mallory et Vaucheret, 2006). Le PTGS modulerait les réponses aux facteurs de stress abiotiques (Phillips *et al.*, 2007; Sunkar *et al.*, 2007). Enfin, Le PTGS protège également l'intégrité du génome par le contrôle de l'activité des transposons (Tang, 2005). En effet, les transposons peuvent

se déplacer dans le génome, ce qui peut altérer la fonction et la structure d'un gène (Llave *et al.*, 2002).

**Tableau 1: Les familles reconnues de protéines reliées aux agents pathogènes**

Famille	Type de membre	Propriété	Référence
PR-1	PR-1a chez le tabac	Antifongique	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	PR-2 chez le tabac	$\beta$ -1,3-glucanase chitinase type I, II, IV, V, VI,	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	Tabac P, Q	VII	Van Loon, 1982
PR-4	Tabac 'R'	chitinase type I, II	Van Loon, 1982
PR-5	Tabac S	homologue à une thaumatine	Van Loon, 1982
PR-6	Inhibiteur I chez la tomate	inhibiteur de protéinase	Green and Ryan, 1972 Vera and Conejero, 1988
PR-7	P69 chez la tomate	Endoprotéinase	1988
PR-8	Chitinase chez le Concombre peroxydase formant de la	chitinase type III	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	lignine chez le tabac	Peroxydase	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	PR1 chez le Persil Chitinase « classe V » chez le	homologue à une ribonucléase	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	tabac	chitinase, type I	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rs-AFP3 chez le radis	Défensine	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	THI2.1 chez arabidopsis	Thionine	Epple <i>et al.</i> , 1995 García-Olmedo
PR-14	LTP4 chez l'orge	protéines de transfert de lipide	<i>et al.</i> , 1995
PR-15	OxOa (germine) chez l'orge	oxalate oxydase homologue à un oxalate	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	OxOLP chez l'orge	oxydase	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	PRp27 chez le tabac	Inconnue	Okushima <i>et al.</i> , 2000

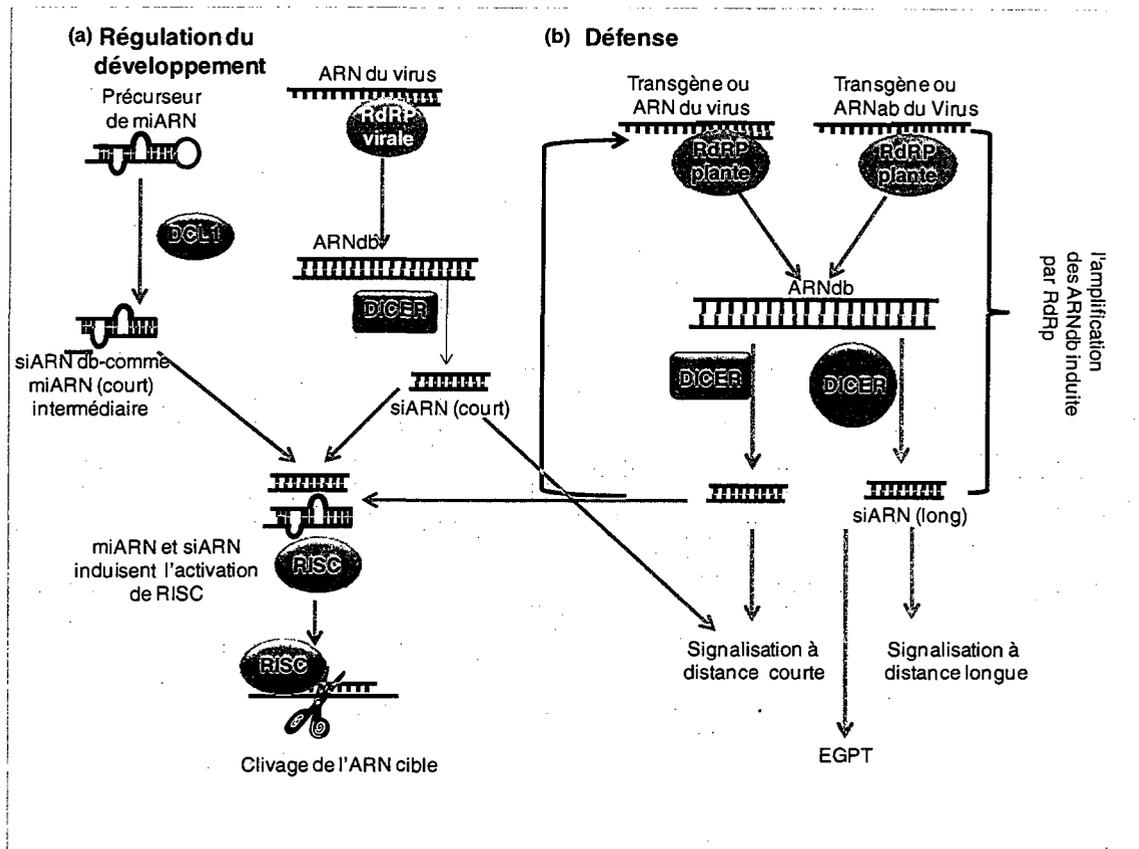
(tiré de van Loon *et al.*, 2006)

Il existe plusieurs systèmes de PTGS, chacun étant dédié à la régulation de phénomènes physiologiques distincts (antiviral, développement, etc.). Les molécules d'ARN qui initient le PTGS, de même que les protéines et les complexes protéiques clés de ces systèmes montrent des spécificités différentes et les ARNm ciblés ne sont pas apparentés (Baulcombe, 2004; Brodersen et Voinnet, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2004). Malgré ces différences, les systèmes de PTGS peuvent être interchangeables ou avoir des fonctions similaires dans certaines situations (Mallory et Vaucheret, 2006). Il subsiste encore des interrogations quant aux différents gènes impliqués. Malgré les disparités existantes, le mode d'action et les mécanismes biochimiques généraux de PTGS sont bien établis (figure 9).

Chez les plantes, l'élément déclencheur de tout le processus du PTGS est un ARN double brin (ARNdb) qui est reconnu et pris en charge par une endonucléase de la famille des RNAses de type III, appelée Dicer, ou par des protéines homologues à Dicer (DCL) (Bernstein *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000). L'ARNdb reconnu peut provenir de plusieurs sources. Ils peuvent être formés par le repliement de séquences répétées inversées d'ARN, par l'hybridation de fragments d'ARN sens et antisens complémentaires, par exemple lors de la réplication d'un virus à ARN ou par l'action d'une ARN polymérase ARN-dépendante d'origine virale ou endogène (Akbergenov *et al.*, 2006; Wassenegger et Krczal, 2006). La protéine Dicer (ou DCL) clive ces ARNdb en petits ARNdb de 21 à 23 nucléotides (siRNAs) (Dunoyer et Voinnet, 2005; Bartel, 2004). Cette étape de coupure est ATP-dépendante.

Les siARNs générés sont ensuite incorporés dans un complexe multiprotéique connu sous le nom de RISC (RNA-induced silencing complex). Ce complexe s'active après la dissociation des deux brins de petit siARN par une hélicase composant RISC, le complexe RISC activé utilise les siARN simple brins comme guide pour identifier spécifiquement les ARN transcrits complémentaires (Tang, 2005) L'ARNm sera alors clivé par la protéine Argonaute du complexe RISC, ce qui abolira l'expression du gène en question (Baulcombe, 2004; Baumberger et Baulcombe, 2005; Lee, *et al.*, 2004).

L'ARNm étant détruit, la protéine normalement codée par cet ARN ne peut plus être synthétisée.



**Figure 9: Mécanismes de l'extinction génique post-transcriptionnelle chez les plantes.** Chez les plantes, l'EGPT est consacrée a) à la régulation du développement et b) à la suppression des acides nucléiques parasites (virus, transgène). L'EGPT est initiée lorsqu'un ARNdb aberrant, endogène ou exogène, est reconnu par une ribonucléase, Dicer ou DCL, et clivé en miARNs ou en siARNs double brins. Ces miARNs et siARNs sont ensuite incorporés au complexe RISC pour cibler la suppression ou la répression de l'ARNsb complémentaire. Dans le cadre de la résistance antivirale, les siARNs modulent en outre l'amplification et la propagation locale et systémique de l'EGPT. (Adapté de Silhavy and Burgyán, 2004).

Récemment, il a été mis en évidence que la défense induite par la reconnaissance de la flagelline (flg22), un PAMP majeur de *P. syringae*, induit l'augmentation de la

transcription du miARN miR393 qui cible les ARNm codant pour le F-box récepteur d'auxine notamment la protéine d'inhibition du transport 1 (TIR1). TIR1 fait partie du complexe SCF<sup>TIR1</sup> qui interagit et dégrade, par le protéasome, le répresseur de la réponse à l'auxine (AUX/IAA). Donc l'induction de miR393 par PAMP, augmente la disponibilité cellulaire d'Aux/IAA pour inhiber la liaison des facteurs de transcriptions sensibles à l'auxine (ARFs) aux régions promotrices sensible à l'auxine (AuxRE). Ce qui mène à l'inhibition de l'expression des gènes dépendant de la voie de signalisation de l'auxine. En conséquence, flg22 empêche l'expression de gènes liés à la réponse à l'auxine grâce à l'EGPT (Navarro *et al.*, 2006; Voinnet, 2008). Une autre équipe de recherche a identifié le PTGS déclenché chez des plantes d'*A. thaliana* inoculées avec une souche de *P. syringae* (DC3000hrcC), mutée dans le système de sécrétion de type III requis pour la virulence. Remarquablement, ils ont observé une augmentation du niveau d'induction des miR160 et miR167, qui visent les ARNm de la famille des ARFs (Fahlgren *et al.*, 2007).

Il a été aussi montré récemment que le PTGS est impliqué dans la résistance contre les nématodes (Baldwin *et al.*, 2002). Il serait alors important de voir si ce phénomène du RNA silencing est également requis pour la résistance contre les champignons.

### **3. Suppression des réactions de défense**

Plusieurs agents pathogènes utilisent des stratégies qui leurs permettent de contourner les défenses de la plante hôte. Doke (1975) a été le premier à décrire la présence d'un suppresseur de réaction de défense chez *Phytophthora infestans*. En effet, cet agent pathogène de la pomme de terre, possède un glucane qui supprime le burst oxydatif et la RH chez son hôte (Doke 1975). Les spores en germination de *Mycosphaerella pinodes* (agent pathogène du pois) produisent un glycopeptide de faible poids moléculaire qui permet la suppression de la défense de la plante et la mise en place de la maladie en présence de *M. pinodes* et *Alternaria alternata* (Yoshioka *et al.*, 1990). Dans les deux cas, la présence du suppresseur des réactions de défense de la plante provoque la

suppression de la RH qui est cruciale pour la résistance contre l'infection précoce de la plante.

Plusieurs autres supprimeurs de réactions de défense ont été depuis découverts (Abramovitch *et al.*, 2003; Axtell et Staskawicz, 2003; Bouarab *et al.*, 2002 ; Mackey *et al.*, 2003; Hauck *et al.*, 2003; Rigano *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2006).

Plusieurs protéines d'avirulence se sont révélées capables de contourner les mécanismes de résistance mis en place par la plante suite à la reconnaissance d'un éliciteur (Abramovitch et Martin, 2004).

Il a été montré que la coronatine, une toxine produite par *P. syringae*, induit une susceptibilité locale et systémique chez la plante hôte *Arabidopsis thaliana* (Cui *et al.*, 2005).

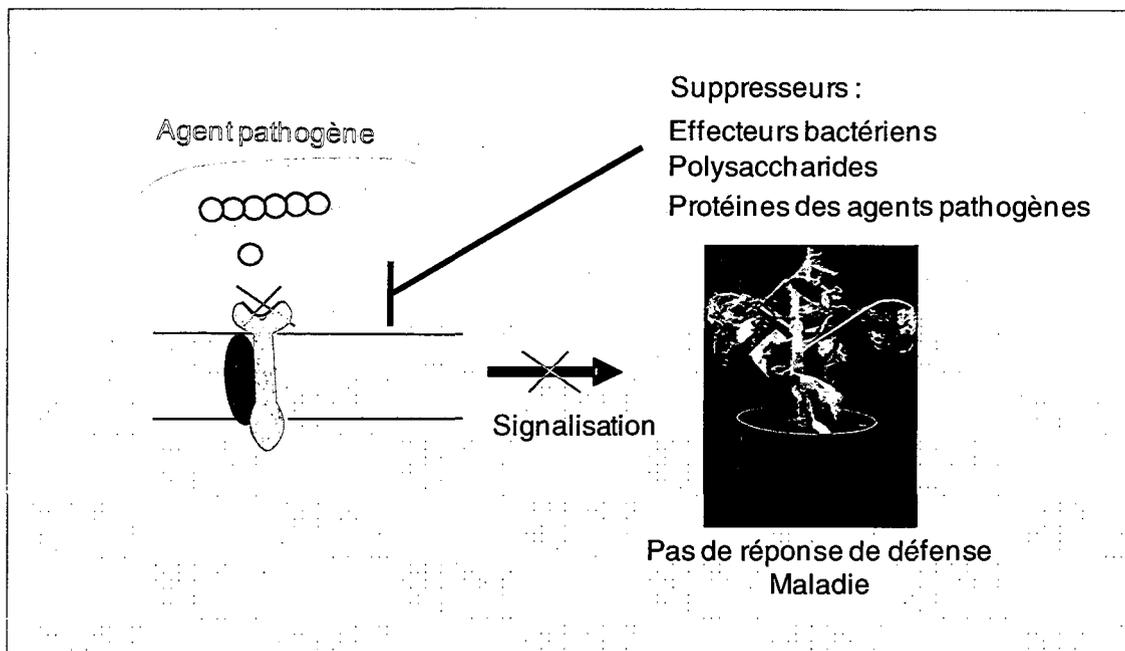
Au cours de l'interaction entre le soja et son agent pathogène *Phytophthora sojae*, la plante produit une glucanase qui dégrade la paroi du champignon et génère ainsi des oligoglucanes qui sont reconnus par la plante comme étant un éliciteur. Ce champignon sécrète une protéine inhibitrice de la glucanase (GIP, Glucanase Inhibitor Protein). La GIP réduit le nombre de molécules élicitrices des réponses de défense en contact avec la plante, affectant ainsi la mise en place d'une résistance efficace (Rose *et al.*, 2002).

Nous avons démontré que le xanthan, un exopolysaccharide produit par *Xanthomonas spp*, supprime spécifiquement la défense locale de la plante par l'inhibition de la déposition de la callose (yun *et al.*, 2006). De même nous avons montré en 2007 que le  $\beta$ -(1-2) glucane cyclique produit par *Xanthomonas campestris pv campestris* (*Xcc*) supprime l'immunité locale et systémique des plantes *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana*. (Rigano *et al.*, 2007)

Très récemment, le groupe de Cooper a montré que les exopolysaccharides (EPSs) bactériens suppriment l'induction du signal induit par les MAMP (motif moléculaire associé au microorganisme «Microbial Associated Molecular Patterns») dans les plantes.

Cette suppression engendrée par ces EPSs est due à leur pouvoir chélateur des ions calcium, un messager essentiel dans la signalisation et la mise en place de l'immunité de la plante (Aslam *et al.*, 2008). L'utilisation de mutants affectés dans la production de ces EPSs ou bien l'application directe des MAMPs, élicite l'influx du calcium et l'expression des gènes de défense ainsi que la résistance contre ces bactéries (Aslam *et al.*, 2008).

Les supresseurs semblent donc interférer avec la voie de signalisation des éliciteurs de défense, ce qui supprime la résistance de la plante aux agents pathogènes (figure 10).



**Figure 10: La mise en place de la maladie due à la suppression de l'immunité des plantes**

#### **4. Les maladies cryptogamiques**

Les champignons sont des organismes ne possédant ni chlorophylle ni tissus constructeurs. La plupart des 10000 espèces de mycètes classifiées sont saprophytes (organismes dont la nutrition est assurée directement à partir de matières organiques en décomposition), dont une partie est connue comme des agents pathogènes envers les

plantes. Certains champignons peuvent provoquer des nécroses locales ou complètes des tissus, une hypoplasie (retard dans le développement de la plante) ou une hyperplasie (croissance accrue d'une partie ou de la totalité de la plante). Ces maladies, dues souvent à l'absence de traitement efficace, détruisent partiellement les cultures et sont à l'origine de nombreux problèmes économiques (Poliart, 2000).

Le champignon pathogène peut se maintenir dans le sol, sur d'autres plantes, ou sur des débris végétaux, en attendant de se retrouver en contact avec la plante hôte. La contamination de celle-ci se fait le plus souvent par des spores transportées par le vent, l'eau ou les insectes. Le parasite peut aussi subsister, à l'état de spores, dans certains organes (graine, tubercule, bourgeon) de la plante hôte, en attendant les conditions favorables pour germer (en général, une température douce et une humidité importante). La plante répond à la pénétration du champignon dans ses cellules de diverses manières. Sa résistance à cette agression est une caractéristique génétique (et un critère important dans la sélection des variétés de plantes cultivées), mais dépend aussi de plusieurs autres facteurs (lumière, âge de la plante, nutrition, présence de blessures). Le développement du mycélium, qui détourne à son profit les substances élaborées par les cellules végétales, va se traduire par un certain nombre de symptômes, propres à chaque maladie : jaunissement, flétrissement, nécroses générales ou localisées, altération de la croissance des organes de la plante. La lutte contre les champignons phytopathogènes se fait par des pratiques culturales, mais surtout par des moyens chimiques.

Dépendamment de leur style de vie, les champignons peuvent être répertoriés parmi les biotrophes ou les nécrotrophes. Les champignons biotrophes ont besoin de cellules vivantes pour proliférer, alors que les champignons nécrotrophes tirent profit des cellules mortes. Dans le cas des biotrophes, il est facile de déduire que les agents pathogènes dérivent les nutriments des tissus vivants de l'hôte, contrairement aux agents pathogènes nécrotrophes qui puisent les nutriments des cellules mortes (Glazebrook, 2005). Cependant, certains agents pathogènes peuvent avoir les deux cycles de vie, notamment les hemi-biotrophes, qui présentent un stade biotrophe au début de l'infection (Bouarab, *et al.*, 2002)

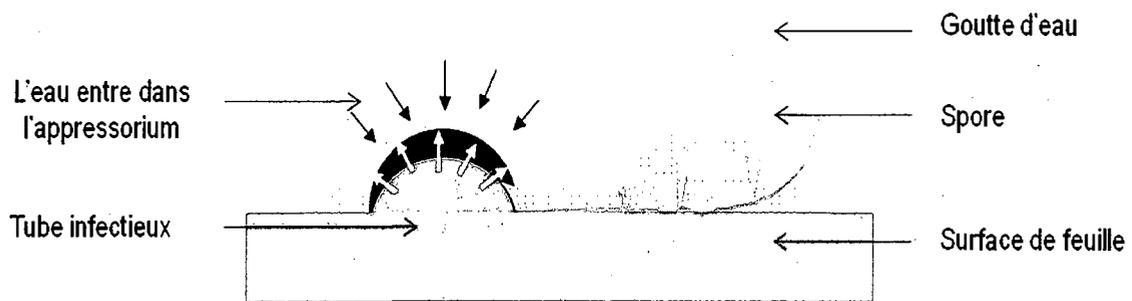
### **4.1 Mécanismes d'infection des plantes**

L'infection des structures végétales peut se faire de différentes façons. Les tubes de germination des conidies ou spores peuvent passer à travers la barrière cuticulaire et pariétale par force mécanique, par action enzymatique, par les stomates (ouverture microscopique dans l'épiderme d'une feuille, éventuellement d'une tige, assurant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère) ou par les blessures provoquées par des piqûres d'insectes. L'infection par du mycélium provenant de tissus morts de parties végétales infectées est aussi fréquente (Verhoeff, 1980).

### **4.2 Les forces mécaniques**

Chez certains champignons comme *Magnaporthe grisea*, les conidies, disséminées entre autres par l'eau de pluie ou par le vent, atterrissent sur la feuille de l'hôte et adhèrent à la cuticule (Ou *et al.*, 1985). L'adhésion des spores se fait grâce à la libération de mucilage contenu dans l'extrémité apicale de la spore. Cette libération est déclenchée par le contact avec la surface hydrophobe de la feuille et permet une adhésion forte de la spore à son support (Hamer *et al.*, 1988). Une fois attachée, la spore germe rapidement (2 heures après contact avec la feuille). En conditions inductrices de la virulence (rigidité du support, hydrophobicité, présence de monomères de cutine), le tube germinatif émergent cesse de croître, gonfle à son apex (2-4 heures) et se différencie (4-8 heures) en appressorium, une structure spécialisée dans la pénétration. Cette cellule hémisphérique s'individualise du tube germinatif par la formation d'un septum à parois épaisses (Bourett et Howard, 1990 ; Dean, 1997). La formation de l'appressorium fait intervenir un processus complexe sous le contrôle de signaux externes, tels que la dureté, l'hydrophobicité de la surface et la présence de cires de la cuticule foliaire. Une fois différencié, l'appressorium met en place différents programmes cellulaires pour pouvoir pénétrer dans la plante. Ainsi, les parois de l'appressorium se « mélanisent » (Howard et Valent, 1996). La production de mélanine est une caractéristique de la virulence de la plupart des champignons pathogènes (Talbot, 2003). De plus, elle permet une accumulation de glycérol intracellulaire en grandes quantités (jusqu'à 3M) (De Jong *et*

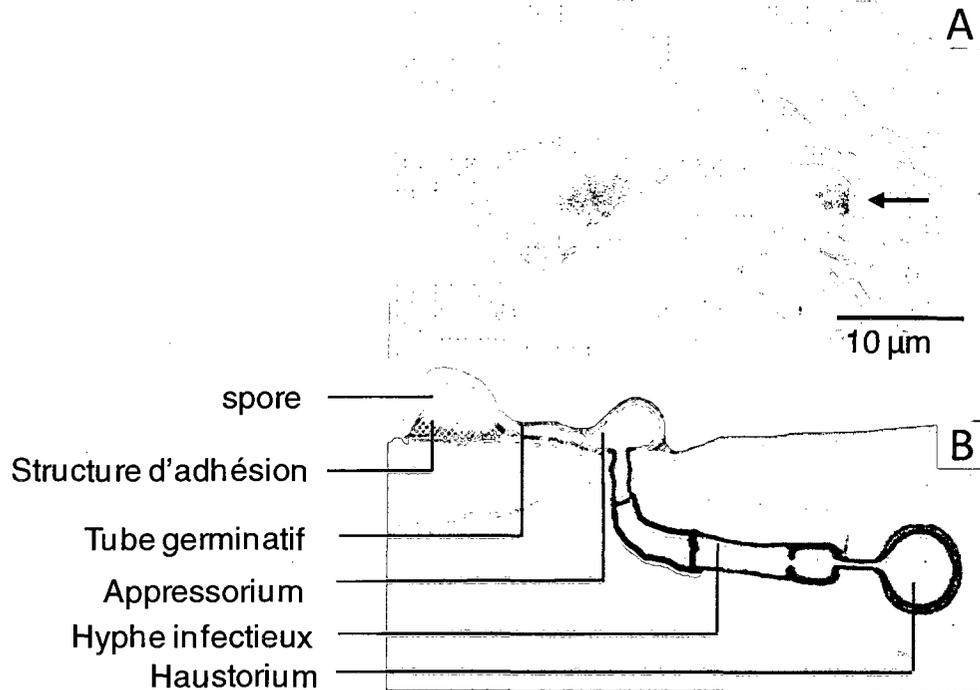
al., 1997). La forte pression osmotique ainsi générée (12-20 heures), équivalente à 80 bars, a pour conséquence une pression de turgescence convertie en force mécanique pour permettre à un hyphe étroit (aiguille d'infection) de pénétrer dans la plante hôte (20-24 heures). Après la cuticule, l'aiguille d'infection franchit la paroi des cellules épidermiques et se développe en hyphes infectieux bulbeux (Talbot, 1995) (figure 11).



**Figure 11: Processus d'infection de la feuille de riz par une spore de *Magnaporthe grisea***

### **4.3 Pénétration des champignons phytopathogènes par les stomates**

Certains champignons y compris *B. cinerea* utilisent les ouvertures naturelles (stomates, lenticelles) comme mode d'infection des parties aériennes des plantes hôtes (figure 12A) (El Oirdi et Bouarab, 2007). Les spores fongiques germent généralement à la surface des plantes et le tube germinatif se différencie en appressorium qui développe un hyphe hyalin mince. Ce dernier passe à travers le stomate et reprend sa forme normale à l'intérieur de la plante hôte. Une fois dans la cavité sous stomatique, le mycélium se développe en de nombreux petits hyphes et envahit les cellules et/ou l'espace intercellulaire de l'hôte où ils forment des haustoria (suçoir) dans les cellules de l'hôte (figure 12B)(Agrios, 2005 ; Mendgen, 1996).



**Figure 12: Infection de la feuille via les stomates, A)** Pénétration d'un stomate par le tube infectieux de l'appressorium d'une spore de *Botrytis cinerea* (El Oirdi et Bouarab, 2007) **B)** Présentation schématique des différentes composantes d'infection par un champignon pathogène (modifié d'après Mendgen, 1996)

#### 4.4 Infection par action enzymatique ou phytotoxines

Les conidies d'un certain nombre de champignons pathogènes, adhèrent à la plante par interactions hydrophobes entre leur paroi cellulaire et la cuticule. Lors de leur germination, une cutinase constitutive est sécrétée. Ce qui dégrade les molécules de cutine et libère des monomères composés d'acides gras. Ces monomères stimulent l'agent pathogène à produire massivement de la cutinase qui va entraîner la dissolution de la barrière cuticulaire de la plante et permettre à l'agent pathogène d'atteindre l'épiderme (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997; Kars et Van Kan 2004). À ce stade, certains agents pathogènes fongiques comme *B. cinerea* sécrètent d'autres enzymes, en particulier les pectinases qui dégradent la pectine, un polysaccharide majoritaire des parois primaires de la cellule végétale. L'agent pathogène s'infiltré ainsi à l'intérieur.

Les enzymes pectolytiques sont secrétées par l'agent pathogène lors du contact avec la paroi des cellules végétales. Ce n'est que lorsque la fraction pectique de la paroi est suffisamment dégradée que d'autres enzymes comme les cellulases, xylanases et protéases sont secrétées (Le Poivre, 2003).

Beaucoup d'enzymes sont aussi impliquées dans la pathogénicité de *B. cinerea* comme, les polygalacturonases, les pectates lyases, les pectines lyases et les pectine-méthylestérases. D'autres enzymes comme les protéases à aspartate, les laccases sont également impliquées dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (Kars et Van Kan, 2004; Valette-Collet, 2003)

*B. cinerea* secrète aussi des toxines non spécifiques pour tuer un large spectre de plantes. La toxine la plus connue est le sesquiterpène botrydial. Cette toxine produite pendant l'infection induit une chlorose et une fragilisation des cellules, ce qui facilite la pénétration et la colonisation de l'hôte (Mathias *et al.*, 2007). De même, *B. cinerea* est capable de produire des métabolites secondaires comme l'acide abscisique et l'acide botcinique qui jouent un certain rôle dans sa virulence (Collado *et al* 2007)

## **5. La pourriture grise**

La pourriture grise de la plante de tomate est l'une des maladies les plus dévastatrices de la tomate cultivée dans les serres. Elle est causée par le champignon pathogène *B. cinerea*. Son développement, rapide et insidieux, engendre chaque année la destruction de cultures pendant le stade de croissance ainsi que pendant le transport et le stockage des récoltes (Hammer *et al.*, 1990; Berrie, 1994; Brian *et al.*, 2007).

*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz est un champignon pathogène des plantes, souvent connu sous le nom de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Le nom de la phase asexuée ou anamorphe, *Botrytis cinerea*, est communément préféré au nom de l'étape sexuée ou téléomorphe, *Botryotinia fuckeliana* (Tableau 2).

**Tableau 2: Classification de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz**

	<b>Classification Asexuée</b>	<b>Classification Sexuée</b>
Division	Deuteromycota	Ascomycota
Classe	Hyphomycètes	Discomycètes
Ordre	Moniliales	Helotiales
Famille	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Genre	Botrytis	Botryotinia
Espèce	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

*B. cinerea*, est un champignon phytopathogène polyphage nécrotrophe (Morrissey et Osbourn, 1999) qui constitue un danger pour les cultures au champs (Hamada *et al.*, 1994) ou en serre (Raposo *et al.*, 2001). Ce champignon cause la pourriture grise des fleurs, des fruits, des feuilles et des tiges de la tomate, mais attaque aussi la vigne, la pomme de terre, la fraise et d'autres cultures (figure 13).

L'importance relative des différents symptômes dépend des conditions environnementales et des conditions culturales pratiquées dans les serres (Raposo *et al.*, 2001). Ils produisent un mycélium hyalin sur les tissus attaqués, qui deviendra gris pendant la sporulation. Cette dernière peut avoir lieu quelques jours après le début de l'infection (3 à 4 jours). *B. cinerea* peut être considéré comme un bon modèle d'étude de l'arsenal commun aux mécanismes d'infection de l'ensemble des champignons phytopathogènes.

### **5.1 Cycle de développement et de reproduction de *B. cinerea***

Comme tout être vivant, *B. cinerea* naît, se développe et se reproduit. La conidie (ou spore) est le point de départ de ce cycle. C'est une cellule unique, multinucléée, différenciée (qui a atteint son stade final de développement) et en dormance (qui maintient un niveau de métabolisme limité à sa survie). Sa viabilité est d'autant plus longue que la température et l'hygrométrie sont basses.

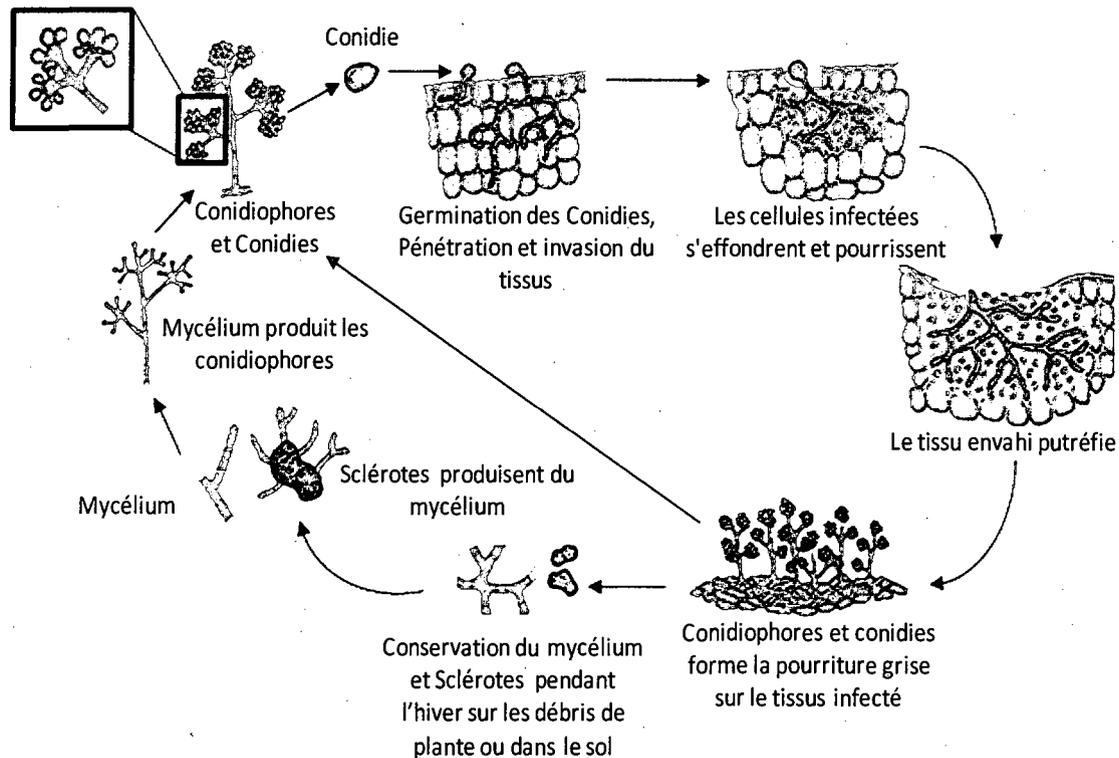


**Figure 13: Symptômes de la pourriture grise causée par *B.cinerea* sur différents types de cultures (Tomate, Fraise, Pomme de terre, Melon, Aubergine, Chou, Tabac, Orchidé, et Vigne)**

Dans de bonnes conditions d'humidité et de température, son métabolisme s'active et la spore se différencie, c'est-à-dire que sa dormance est levée et que le processus de division cellulaire est activé.

Elle va produire une première cellule fille, le tube germinatif qui, à son tour va se diviser et former un filament multicellulaire, l'hyphé (figure 14). Celui-ci va former des hyphes latéraux qui vont s'entrecroiser en un réseau de plus en plus important, le mycélium. Des facteurs, principalement nutritionnels et climatiques vont progressivement arrêter la

croissance mycélienne et induire la formation d'organes reproducteurs, les conidiophores, sur lesquels un grand nombre de conidies vont apparaître. Le mycélium donne également naissance à des amas mycéliens très denses, les sclérotes, considérés comme les organes de résistance du champignon durant les conditions défavorables. Lorsque ces dernières deviennent favorables, les sclérotes donnent naissance à de nombreux conidiophores produisant des conidies (Agrios, 2005) (figure 14).



**Figure 14:** Cycle biologique et d'infection de *B. cinerea* (modifié d'après Agrios, 2005)

## 5.2 Objectifs du projet de recherche

*Botrytis cinerea* est un champignon phytopathogène nécrotrophe responsable de la pourriture grise. Cette maladie engendre des dégâts très importants sur plus de 200 plantes hôtes. Plusieurs d'entre elles sont des cultures d'intérêt agronomique, notamment les solanacées (tomate, pomme de terre, tabac, etc...). Nos connaissances sur les moyens

utilisés par *B. cinerea* pour envahir la plante hôte restent encore limitées. Cependant, un ensemble de facteurs de virulence était proposé pour étudier l'interaction entre *B. cinerea* et ses hôtes, notamment, la production d'enzymes extracellulaires qui dégradent la paroi et la cuticule des plantes et favorisent ainsi la mise en place de la pourriture grise causée par ce champignon. Le fait que ce champignon ait une gamme d'hôtes très diversifié suggère qu'il possède différentes stratégies pour envahir ces hôtes. De plus en plus d'études montrent maintenant que les agents pathogènes détournent le mécanisme immunitaire de la plante pour l'envahir. Cette stratégie constitue alors un nouveau moyen de virulence. *B. cinerea* a besoin de tuer les cellules de son hôte pour pouvoir se développer. Des études ont montré que ce champignon induit une forme de RH chez la plante qui joue un rôle important dans son pouvoir de virulence. Il est donc essentiel de disséquer l'importance de cette RH dans la mise en place de la pourriture grise. Parmi les moyens utilisés par *P. syringae*, une bactérie biotrophe, la production d'une toxine (coronatine) qui mime la présence de l'AJ, ce qui inhibe la voie de l'AS qui est requise contre les agents pathogènes biotrophes. Aucune étude décrivant l'utilisation de cette stratégie par les agents pathogènes nécrotrophes n'a été publiée. Par conséquent il serait important de savoir si *B. cinerea* utilise cette stratégie pour infecter son hôte, la tomate. Par ailleurs, des agents pathogènes sont également capables de produire des enzymes de détoxification des métabolites secondaires. Ces enzymes compromettent l'activité antimicrobienne de ces métabolites et permettent également la suppression de certaines réponses de défense de la plante, ce qui favorise encore une fois la mise en place de la maladie. Toutes ces stratégies ne sont pas mises en évidence chez les agents pathogènes nécrotrophes. Par conséquent, mon objectif général était donc d'étudier les facteurs qui contrôlent le pouvoir pathogène chez *B. cinerea*. Le projet consistait d'abord à montrer l'importance de la RH dans la mise en place de la pourriture grise causée par *B. cinerea*. Une seconde étape consistait ensuite à savoir si *B. cinerea* manipule les effets antagonistes entre les voies immunitaires (AS et AJ) de la plante pour instaurer sa maladie. Finalement, il s'agissait de démontrer si *B. cinerea* est capable de produire une ou des enzymes qui compromettent l'activité antimicrobienne de la scopolétine, une phytoalexine produite par les tabacs, et qui permettent ainsi de favoriser l'infection induite par ce champignon chez le tabac.

## CHAPITRE 1

### LES RÉGULATEURS EDS1 ET SGT1 AUGMENTENT LA SÉVÉRITÉ DE LA MALADIE CAUSÉE PAR LE CHAMPIGNON NÉCROTROPHE *BOTRYTIS CINEREA*

#### Préambule

Les réponses de défense induite par l'AS sont largement contrôlées par des régulateurs comme EDS1 (Enhanced disease susceptibility) et SGT1 (suppressor of the G2 allele of Skp1). Ces deux acteurs contrôlent la mise en place de la réaction hypersensible, nécessaire pour détruire les agents pathogènes biotrophes. *B. cinerea* est un agent pathogène nécrotrophe ce qui signifie qu'il a besoin de tuer les cellules végétales pour les envahir.

L'objectif de cette partie de ma recherche était de déterminer si *B. cinerea* manipule les voies de signalisation qui mènent à la mise en place de la réaction hypersensible pour installer sa maladie.

Lors de ces travaux, nous avons montré que *B. cinerea* cause la pourriture grise chez *Nicotiana benthamiana*. Cette maladie nécessite la présence des deux régulateurs de la réaction hypersensible chez la plante, EDS1 et SGT1. En effet, *B. cinerea* active l'expression des gènes *EDS1* et *SGT1*. Par ailleurs, le silencing de ces deux gènes réduit la mise en place de la maladie chez *N. benthamiana*. Nous avons aussi montré que les plantes de tabac qui sur-expriment la p35 (baculovirus antiapoptotic protein, une protéine antiapoptotique) sont plus résistantes à *B. cinerea* que les plantes sauvages. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que *B. cinerea* utilise la voie qui mène à la mise en place de la réaction hypersensible pour instaurer sa maladie.

J'ai réalisé la totalité des expériences reliées aux travaux présentés dans ce manuscrit. J'ai également participé significativement à la rédaction de l'article. Le Dr Kamal Bouarab a participé activement à la conception des expériences et à la rédaction de l'article.

**Article**

Mohamed El Oirdi and Kamal Bouarab (2007) Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **175**: 131–139

**Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the  
necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea***

Mohamed El Oirdi and Kamal Bouarab

Centre de Recherche en Amélioration Végétale, Département de Biologie, Faculté des  
Sciences, Université de Sherbrooke, 2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke  
(Québec), J1K2R1, Canada

Author for correspondence: Kamal Bouarab Tel: +1 819 8217070 Fax: +1 819 8218049

Email: Kamal.Bouarab@USherbrooke.ca

Copyright © The Authors (2007). Journal compilation © New Phytologist (2007)

Keywords: antiapoptotic proteins • *Botrytis cinerea* • counter-defence strategies • EDS1 •  
plant defences • SGT1 • Solanaceae.

### **Summary**

*Botrytis cinerea* is a necrotrophic fungus that causes grey mould on a wide range of food plants, especially grapevine, tomato, soft fruits and vegetables. This disease brings about important economic losses in both pre- and postharvest crops. Successful protection of host plants against this pathogen is severely hampered by a lack of resistance genes in the hosts and the considerable phenotypic diversity of the fungus.

The aim of this study was to test whether *B. cinerea* manipulates the immunity-signalling pathways in plants to restore its disease.

We showed that *B. cinerea* caused disease in *Nicotiana benthamiana* through the activation of two plant signalling genes, *EDS1* and *SGT1*, which have been shown to be essential for resistance against biotrophic pathogens; and more interestingly, virus-induced gene silencing of these two plant signalling components enhanced *N. benthamiana* resistance to *B. cinerea*. Finally, plants expressing the baculovirus antiapoptotic protein p35 were more resistant to this necrotrophic pathogen than wild-type plants.

This work highlights a new strategy used by *B. cinerea* to establish disease. This information is important for the design of strategies to improve plant pathogen resistance.

### **Introduction**

Plants carry a surveillance system to recognize attacking microorganisms and to induce effective defence mechanisms. Resistance is often controlled by a gene-for-gene interaction between plant resistance (R) genes and pathogen avirulence (avr) genes (Hammond-Kosac & Jones, 1997; Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006). Avr recognition by the R-gene leads to activation of the hypersensitive response (HR), a type of programmed cell death (PCD) that occurs at or near the site of pathogen entry (Morel & Dangl, 1999; Heath, 2000). The HR is thought to confine the pathogen by stopping its spread from the site of attempted infection, and is likely to involve active plant

metabolism (Levine *et al.*, 1996). R-gene-mediated resistance is also associated with the activation of a salicylic acid (SA)-dependent signalling pathway that leads to the expression of certain pathogenesis-related (PR) proteins, which are thought to contribute to establishing resistance. Some other plant-defence responses are controlled by mechanisms dependent on ethylene (ET) and/or jasmonates (JA) (Kunkel & Brooks, 2002; Devoto & Turner, 2003; Lorenzo & Solano, 2005; Mur *et al.*, 2006). Several observations have led to the suggestion that plant-defence responses may be tailored to the attacking pathogen, with SA-dependent defences acting against biotrophs, and JA- and ET-dependent responses acting against necrotrophs (McDowell & Dangl, 2000; Kunkel & Brooks, 2002; Devoto & Turner, 2003; Lorenzo & Solano, 2005; Mur *et al.*, 2006). Salicylic acid and JA are mutually inhibitory for the expression of many genes (Kunkel & Brooks, 2002; Devoto & Turner, 2003; Lorenzo & Solano, 2005; Mur *et al.*, 2006). Thus several genes, such as lipoxygenase, *PDF1* and *VSP*, involved in various steps of JA signalling, are compromised by SA (Doares *et al.*, 1995; Harms *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2000; Spoel *et al.*, 2003). On the other hand, it has also been shown that JA can suppress the expression of acidic PR-genes that are SA-dependent (Niki *et al.*, 1998).

Mutational analyses in *Arabidopsis* led to the identification of signalling components downstream from R-protein function (Glazebrook, 2001). *EDS1* encodes a protein with homology to lipases, and is necessary for resistance (including HR) mediated by Toll/interleukin 1 receptor (TIR)-containing R-proteins (Falk *et al.*, 1999; Peart *et al.*, 2002a; Hu *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). Other components essential for R-gene function have been identified recently. SGT1, a highly conserved component needed for the function of certain Skp1/Cullin/F-box protein (SCF)-type E3 ubiquitin ligase complexes, is essential for the function of several R-genes and controls the HR induced by several gene-for-gene systems and also nonhost defence mechanisms (Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002; Tor *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2005). Two highly homologous *SGT1* genes exist in *Arabidopsis*, *SGT1a* and *SGT1b* (Azevedo *et al.*, 2002, 2006). *Nicotiana benthamiana* *SGT1* homologues are indispensable for N-dependent resistance to tobacco mosaic virus (TMV), Rx-dependent resistance to potato

virus X, and Pto-dependent resistance to *Pseudomonas syringae* carrying avrPto (Liu *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002b).

The fungus *Botrytis cinerea* is a plant necrotrophic pathogen that colonizes senescent or dead plant tissues and softening fruits, causing grey mould (Elad, 1997; Cristescu *et al.*, 2002). Fungal hyphae can penetrate through wounds or natural openings of the plant tissue and spread from previously colonized dead tissues into healthy ones. *Botrytis cinerea* attacks different plant tissues and has a broad host range (Mansfield, 1980; Elad, 1997; Ben-Shalom *et al.*, 2003). It is a major cause of postharvest rot of perishable plant products, including grape, tomato, potato, strawberry and tobacco. Because it is also able to infect at low temperatures, it can result in important economic losses in both pre- and postharvest crops (Mansfield, 1980). Several virulence factors required for its pathogenicity on different hosts have been described (Ferrari *et al.*, 2003). *Botrytis cinerea* synthesizes extracellular enzymes that degrade pectin, the major component and the most complex polysaccharide in the plant cell wall, which allows its growth inside the plant (Wubben *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 2001; ten Have *et al.*, 2001; Cabanne & Doneche, 2002; Poinssot *et al.*, 2003; Soulie *et al.*, 2003; Kars *et al.*, 2005). The successful protection of host plants against this pathogen is severely hampered by the lack of resistance genes in the hosts and the considerable phenotypic diversity of the fungus. Several studies show that resistance to *B. cinerea* requires JA signalling (Glazebrook, 2005). Govrin & Levine (2000) proposed that the cell death induced by *B. cinerea* is a form of the HR, and that this induction of cell death is an important component of virulence. Further support for the idea that *B. cinerea* actively promotes a form of HR cell death has been provided by observations that inhibition of HR cell death by expression of animal antiapoptotic genes as transgenes in tobacco leads to enhanced resistance to *B. cinerea* (Dickman *et al.*, 2001). These data led us to test whether *B. cinerea* activates the plant-signalling pathways required for establishment of the HR in order to restore disease. Our results show that *B. cinerea* activates the expression of the two plant signalling components *EDS1* and *SGT1*, which are required for HR-dependent resistance. Interestingly, virus-induced gene silencing (VIGS, Ratcliff *et al.*, 2001; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003) of these two signalling components enhances resistance to *B.*

*cinerea* in *N. benthamiana*. Using stable transgenic plants (del Pozo & Lam, 2003), we also show that expression of the baculovirus antiapoptotic protein p35, which compromises the establishment of HR, affects the disease caused by the necrotrophic pathogen.

### **Materials and Methods**

#### **Plants and fungal isolates**

*Nicotiana benthamiana* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi, *N. tabacum* L. cv. Samsun NN and *Solanum esculentum* L. cv. Moneymaker plants were grown on soil in a growth chamber (DiaMed Laboratory Supplies, Ontario, Canada) with 60% humidity and under a regime of 16 h light (photosynthetic photon flux density  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $23^\circ\text{C}/8 \text{ h dark}$ ,  $18^\circ\text{C}$ ).

The *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. isolate MEE B191 (B191) that was used for this study was provided by the Canadian Collection of Fungal Cultures (Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada). The fungus was grown on potato dextrose agar (PDA: potato starch  $4 \text{ g l}^{-1}$ , dextrose  $20 \text{ g l}^{-1}$ , agar  $17 \text{ g l}^{-1}$ ) and incubated for 3 d at  $22^\circ\text{C}$ . To induce sporulation, plates of *B. cinerea* were maintained for 3 d at  $22^\circ\text{C}$  with 14 h darkness and 10 h light. Conidia of *B. cinerea* were harvested from sporulating PDA plates by scraping them off with 10 ml sterile distilled  $\text{H}_2\text{O}$ , using a glass spatula. The conidia were filtered with Whatman miracloth paper (Calbiochem, Ontario, Canada) and washed three times with 10 ml water by centrifugation (3 min, 500 g), taking care to remove all liquid from the conidial pellets each time, and suspended into potato dextrose broth (PDB) medium. Spores were then diluted in PDB medium to the appropriate concentration ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) after counting (hemocytometer cell).

#### **Plant-inoculation assays**

All plant inoculations involved a minimum of three leaves from each of three plants, and each experiment was carried out at least three times.

For pathogenicity testing and statistical analysis, detached leaves of 4-wk-old plants were laid on Petri dishes containing two blotting filter papers (Whatman, Schleicher & Schuell, Ottawa, Canada) wetted with sterile water, then spotted with 10  $\mu$ l spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of PDB medium) or 5-mm-diameter agar plugs containing actively growing hyphae of *B. cinerea*. Petri dishes were then incubated at 22°C at high humidity in glass trays covered with polyethylene wrap.

For transcript analysis, 4-wk-old plants of *N. benthamiana* were sprayed with a spore suspension of *B. cinerea* ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  in Tween 0.01%). Control plants were sprayed with Tween 0.01%. Plants were then incubated in micropropagators at 22°C and high humidity, and a 16-h light/8-h dark cycle. Plant samples were harvested at 0, 6, 12 and 24h after infection for RNA extraction.

### **Disease assessment**

The disease caused by *Botrytis* was assessed in detached leaves 4 d postinoculation, by measuring the necrosis diameter induced by *B. cinerea* spores or mycelium plugs.

Microscope analysis was also carried out to assess the infection process of the fungus, as previously described (Bouarab *et al.*, 2002). Infected leaves were sampled 6 h and 4 d after inoculation before being boiled for 1 min in trypan blue/lactophenol (10 ml lactic acid, 10 g phenol, 10 ml glycerol, 10 ml water, 10 mg trypan blue, mixed 1 : 1 with ethanol) and destained for 2 d in several changes of 60% glycerol. The stained tissue was viewed with a Zeiss microscope under bright-field illumination (Carl Zeiss Axio Imager M1 Mot, Québec, Canada) and photographs were taken with a charge-coupled device camera (Carl Zeiss Axiocam MRC High Resolution Color Digital Camera, 1300  $\times$  1030 pixels).

### **Tobacco rattle virus-based VIGS in *N. benthamiana***

The bipartite tobacco rattle virus (TRV) vector and its application for silencing have been described previously (Ratcliff *et al.*, 2001). The TRV RNA1 clone is in pBINTRA6, and

the RNA2 clone for insertion of target sequences is in pTV00. The vectors were requested from the Sainsbury Laboratory (Norwich, UK). A cDNA fragment from *N. benthamiana* *SGT1* (419 bp) or from *N. benthamiana* *EDS1* (615 bp) was inserted in pTV00 (RNA2) and termed TRV:*SGT1* and TRV:*EDS1*, respectively (Ratcliff *et al.*, 2001; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b). TRV:00, without any insert, was used as a control.

Infection of plants with TRV derivatives was by agroinfiltration as described previously (Ratcliff *et al.*, 2001; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b). Cultures containing pTV00-derived constructs were mixed with those containing pBINTRA6 (RNA1) in a 3 : 1 ratio before infiltration. Two expanded leaves of 3-wk-old *N. benthamiana* plants were infiltrated with the mixture. The transcript levels of *EDS1* and *SGT1* were carried out by RT-PCR 3 wk postinfection.

### **RT-PCR**

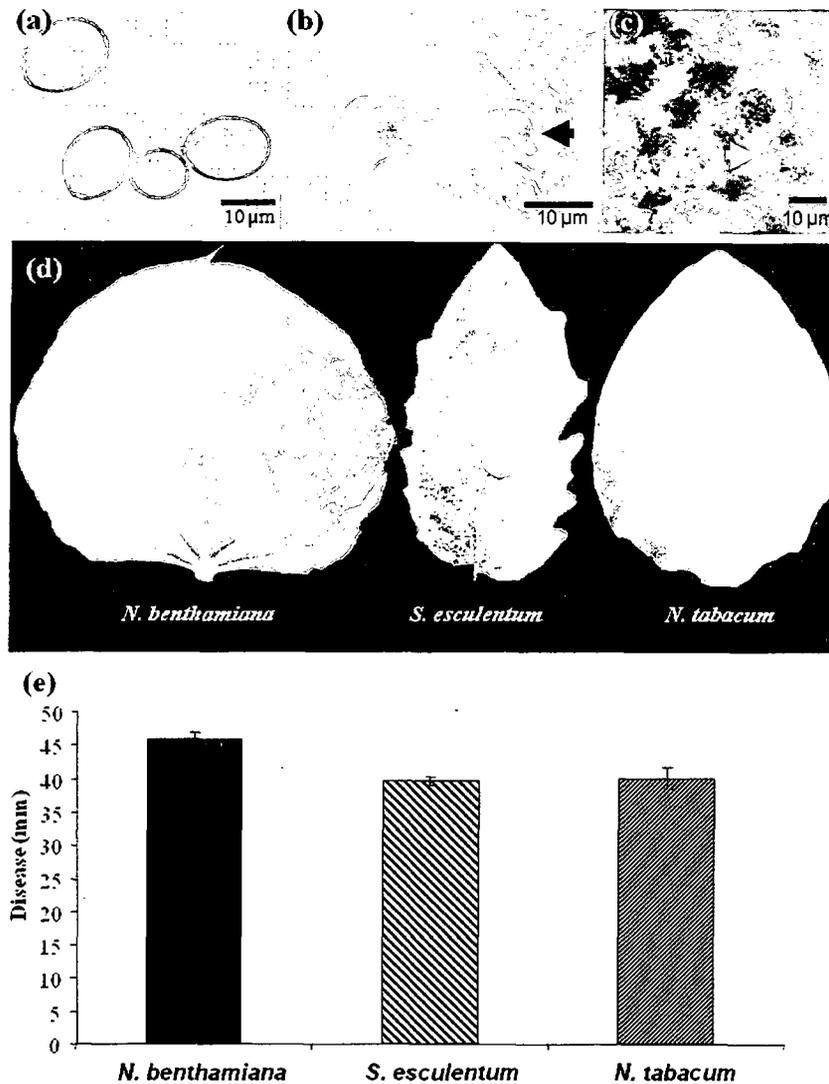
Total RNA from leaves was extracted using the Tri Reagent method according to the manufacturer's recommendation (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). First-strand cDNA was synthesized from 2 µg total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RT-PCR was performed using primers 1 (5'-ATGGCGTCCGATCTGGAGAC-3') and 2 (5'-CTAGATCTCCCATTTCTTCAGCT-3') for amplification of *SGT1*, and primers 3 (5'-ATGGTGAGAATTGAAGAGGG-3') and 4 (5'-GCTACCTCATCTGTGTGCCA-3') for amplification of *EDS1*. For actin control amplification primers, Actin1 (5'-ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA-3') and Actin2 (5'-TGCTTCAGTGAGTAGTACAGGGTGTTC-3') were used. Amplification was carried out with one cycle at 95°C for 3 min, 30 cycles of denaturation at 95°C and annealing at 58°C for 30 s each, and elongation at 72°C for 2 min. All RT-PCR reactions were extended for 10 min at 72°C and held at 4°C.

### **Results and Discussion**

We are interested in understanding the plant-defence mechanism against *B. cinerea*, a pathogen that induces disease in economically important solanaceae such as tomato and potato. *Nicotiana tabacum* and *N. benthamiana* have been used routinely to study plant disease-resistance mechanisms, and therefore are good models to analyse plant–pathogen interactions. This led us to investigate whether *B. cinerea* can infect and cause disease on these two solanaceous species. We inoculated *B. cinerea* (isolate B191) onto leaves of the hosts tomato, *N. benthamiana* and *N. tabacum*. As expected, spores of isolate B191 were able to infect tomato leaves through the stomata (Fig. 1a,b) and grew intercellularly in the mesophyll tissue before destroying the cells and establishing necrotic disease (Fig. 1c). The fungus caused spreading disease lesions and extensive tissue damage (Fig. 1d).

We observed that disease severity was similar among the three plant species (Fig. 1d,e). Virus-induced gene silencing methodology is well developed for *N. benthamiana*, which makes this species an attractive model for further analysis (Ratcliff *et al.*, 2001; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). Therefore we used *N. benthamiana* as a host to investigate the strategies used by *B. cinerea* to cause disease in solanaceous species.

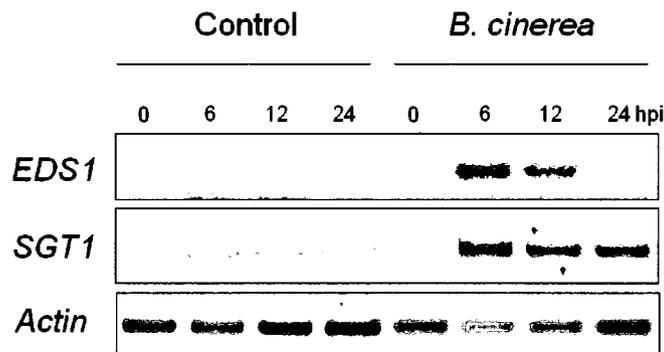
The proteins SGT1 and EDS1 are key components of the signal transduction pathway that leads to disease resistance in plants (Falk *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002, 2006; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b). Those two proteins control the HR established by the majority of known specific elicitors (McDowell & Dangl, 2000; da Cunha *et al.*, 2006). As it has been shown that *B. cinerea* induces an HR as an infection mechanism (Govrin & Levine, 2000), we investigated whether *B. cinerea* uses these HR-controlling genes to establish its disease. With this purpose, we first tested whether *B. cinerea* regulates the expression levels of *SGT1* and *EDS1*. Four-wk-old plants of *N. benthamiana* were sprayed with spores of *B. cinerea* isolate B191 ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  Tween 0.01%). The plants were then incubated in micropropagators at high humidity, and samples were harvested 0, 6, 12 and 24 h after infection. Control plants were sprayed with Tween 0.01%.



**Fig. 1: *Botrytis cinerea* infects several solanaceous species.** (a) Spores from *B. cinerea* used to infect tomato (*Solanum esculentum*) leaves. (b,c) Trypan blue staining of tomato leaves infected by spores 6 h (b) and 4 d (c) postinoculation. After germination, spores penetrate the stomata (b, arrowhead) and the mycelium grows in the intercellular space (c, arrowhead) before destroying the cells. (d) Infection tests with plugs of *B. cinerea* mycelia on tomato and tobacco leaves (*Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*). (e) Disease severity measured as the diameter of the necrosis induced by *B. cinerea* on leaves shown in (d). Error bars, SD. Images and necrosis sizes were recorded 4 d postinoculation.

Transcript levels of both *SGT1* and *EDS1* were detected by RT-PCR. Interestingly *B. cinerea* induced expression levels of *EDS1* and *SGT1* transcripts (Fig. 2). Six h after infection, both genes showed high transcription levels, but while *EDS1* expression decreased to basal levels at 24 h postinfection, *SGT1* expression was still high at the same time point (Fig. 2).

To test whether *EDS1* and *SGT1* are required for the disease caused by the necrotrophic pathogen *B. cinerea*, VIGS experiments were carried out in which *N. benthamiana* plants were inoculated with a tobacco rattle virus (TRV) vector containing 419 bp of the cDNA of *N. benthamiana SGT1* (TRV:*SGT1*) or 615 bp of the cDNA of *N. benthamiana EDS1* (TRV:*EDS1*; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b). Control plants were inoculated with the TRV vector without cDNA insert (TRV:00). After 3 wk, plants were challenged with spores ( $10 \mu\text{l } 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) or plugs (5 mm diameter) of *B. cinerea* and the disease was scored by the diameter of the necrotic area 4 d postinoculation. TRV:00-inoculated plants that had subsequently been challenged with both spores and plugs of *B. cinerea* showed disease symptoms resembling those produced in wild-type plants (Fig. 3c-f).

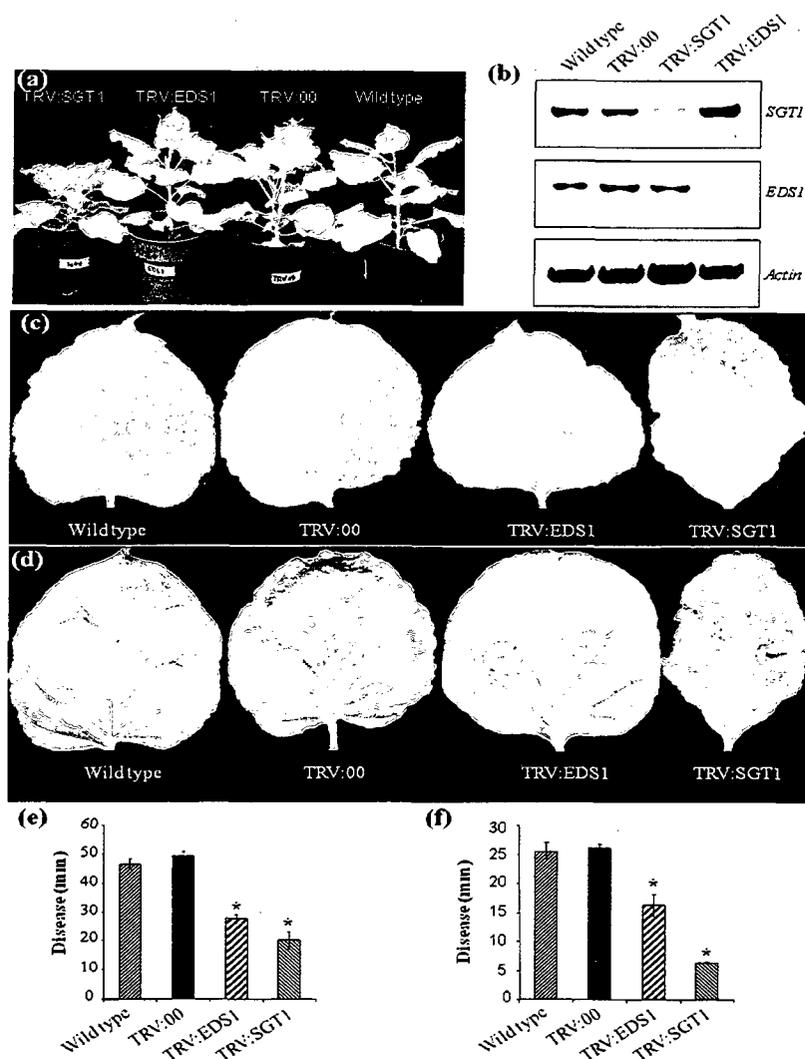


**Fig. 2: Expression patterns of Nb *EDS1* and *SGT1* after *Botrytis cinerea* infection.** Four-wk-old *Nicotiana benthamiana* plants were treated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  *B. cinerea* (in 0.01% Tween) or Tween 0.01% (control), and samples were harvested at the time points indicated. Total RNA was isolated and used for RT-PCR with specific primers for *N. benthamiana EDS1*, *SGT1* and *actin*. Equal amounts of cDNA were used as shown by the amplification with the constitutively expressed actin gene.

Interestingly, the necrosis disease induced by spores or plugs of *B. cinerea* was significantly reduced on leaves of *SGT1*- and *EDS1*-silenced plants (Fig. 3c–f). However, the resistance was higher in *SGT1*-rather than *EDS1*-silenced plants (Fig. 3c–f). We also confirmed that *SGT1* and *EDS1* transcript accumulation was reduced in the plants carrying TRV:*SGT1* and TRV:*EDS1* construct, respectively, compared with both controls (wild-type plants or TRV:00; Fig. 3b). These results suggest that *B. cinerea* uses *SGT1* and *EDS1*, two very important proteins in HR establishment, to cause disease in plants. Thus *SGT1* and *EDS1*, required for plant disease resistance against biotrophic pathogens, are also involved in symptom development during disease susceptibility to *B. cinerea*.

It is commonly known that animal pathogens often target and suppress PCD pathway components to manipulate their hosts. In contrast, plant pathogens often trigger PCD. Thus infection of p35-expressing tobacco plants (P35Q) with TMV disrupts N-mediated disease resistance, causing systemic spreading of the virus within a resistant background (del Pozo & Lam, 1998, 2003). To investigate further the involvement of HR in the establishment of *B. cinerea* disease, we tested whether this fungus is able to infect tobacco plants expressing p35 (P35Q).

As controls we used wild-type plants and tobacco plants expressing a nonfunctional p35 protein in which a single mutation abolishes the antiapoptotic activity of the protein (Mayer *et al.*, 2001). Detached leaves from 4-wk-old plants were infected with *B. cinerea* plugs and symptoms were observed 4 d after infection. The results showed that the disease is significantly reduced in P35Q plants (Fig. 4). However, plants expressing the mutant p35 protein (P35mH) were more susceptible to *B. cinerea* compared with plants expressing the wild-type protein, and showed the same severity of infection as wild-type plants (Fig. 4). These results suggest that *B. cinerea* needs cell death establishment to cause disease.



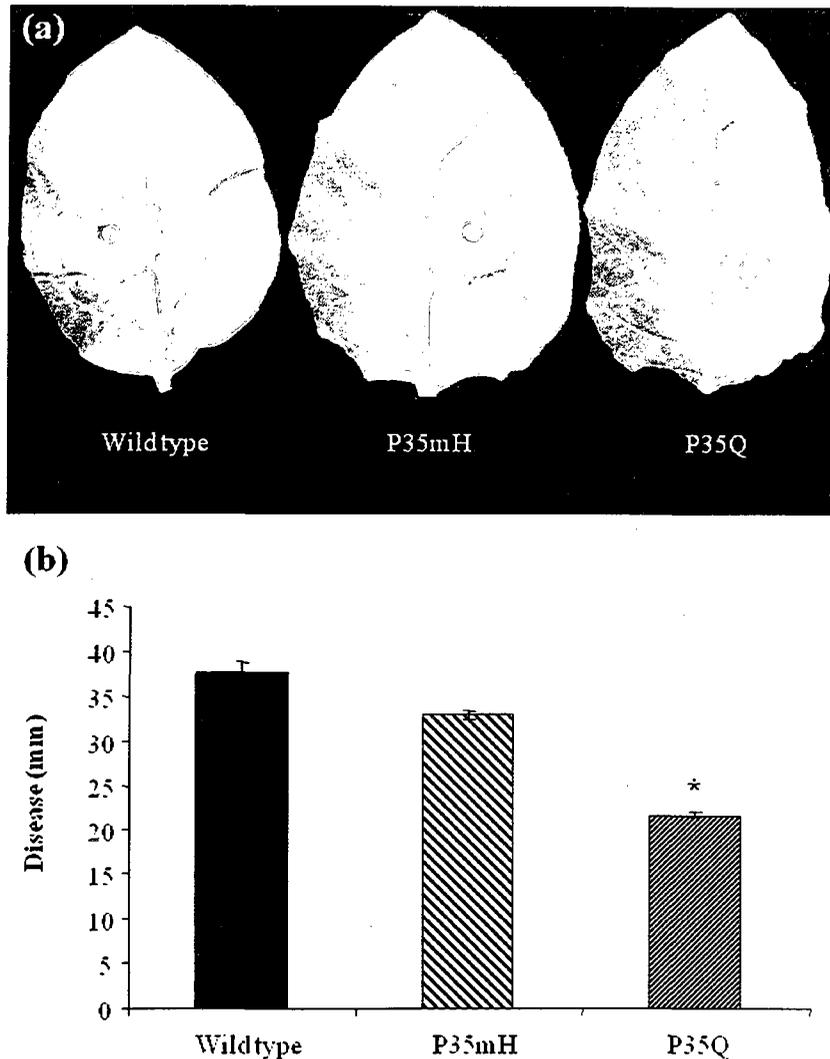
**Fig. 3: Silencing of two plant signalling components, *EDS1* and *SGT1*, enhances the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Botrytis cinerea*.** (a) Phenotype of silenced plants. (b) *SGT1* and *EDS1* transcript levels were analysed by RT-PCR. Total RNA was extracted from the silenced plants indicated and used for RT-PCR with *SGT1*, *EDS1* and *actin* primers. Equal amounts of cDNA were used as shown by amplification with the constitutively expressed *actin* gene. (c,d) Infection tests on leaves from silenced plants using plugs (c) and spores (d) of *B. cinerea*. Two 10- $\mu$ l drops of *B. cinerea* spores ( $10^6$  ml $^{-1}$ ) were deposited on each leaf half of *N. benthamiana* (d). (e,f) Disease severity measured as diameter of necrosis induced by plugs (e) and spores (f) of *B. cinerea*, on leaves shown in (c,d), respectively. Error bars, SD. Images and necrosis sizes were recorded 4 d postinoculation. Data sets marked with an asterisk are significantly different

from controls (wild-type and TRV:00-silenced plants) as assessed by Student's *t*-test: \*,  $P < 0.001$ .

Traditionally, *SGT1* and *EDS1* have been regarded as plant signalling genes that compromise disease (Austin *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2002, 2006; Bouarab *et al.*, 2002; Peart *et al.*, 2002a, 2002b). Here we show that *B. cinerea* uses those genes to enhance infection (Fig. 5). *SGT1* and *EDS1* control SA-dependent disease resistance against biotrophic pathogens (McDowell & Dangl, 2000; da Cunha *et al.*, 2006). On the other hand, resistance against necrotrophic pathogens (including *B. cinerea*) involves JA signalling (McDowell & Dangl, 2000; da Cunha *et al.*, 2006), and it is known that the SA and JA pathways are antagonistic (Kunkel & Brooks, 2002; Devoto & Turner, 2003; Lorenzo & Solano, 2005; Mur *et al.*, 2006). Interestingly, Brodersen *et al.* (2006) showed that *EDS1* acts as an activator of SA, but as a repressor of ET/JA defences. In this context, our results suggest that *B. cinerea* activates expression of *SGT1* and *EDS1* (SA signalling) in order to exploit this antagonistic effect between the two signalling pathways and then restore its disease.

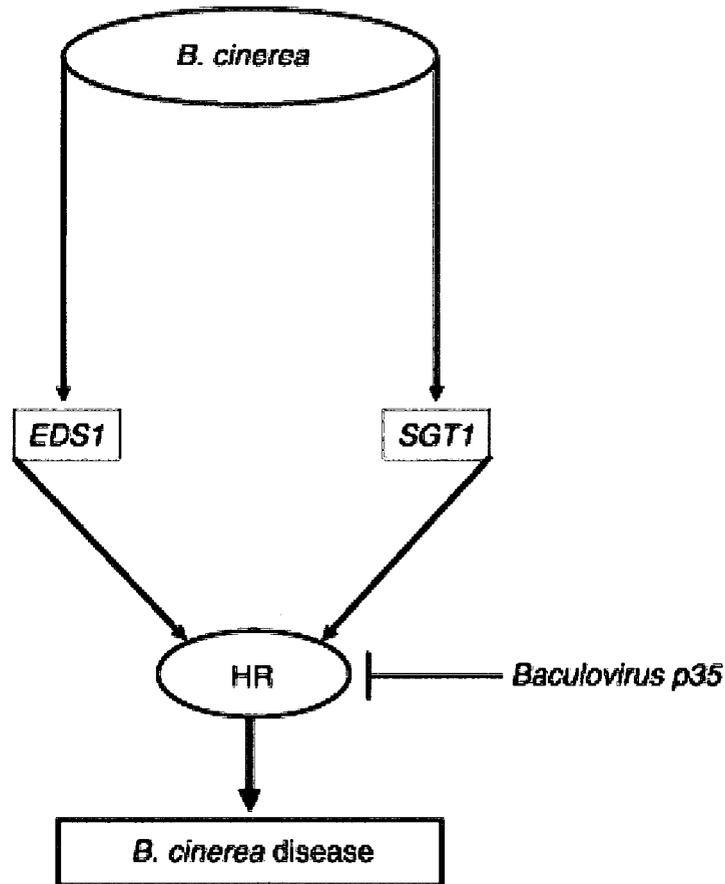
Several pathogens have been shown to counteract plant immunity in order to establish their diseases (Bouarab *et al.*, 2002; Abramovitch *et al.*, 2003, 2006a, 2006b; Hauck *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2005, 2006; Janjusevic *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Melotto *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2006). There appears to be considerable mechanistic diversity in these suppression responses, as different suppressors have different targets that include the HR, expression of defence-related genes, cell wall-based defences, JA signalling and, as recently shown, the plant proteasome system and stomatal closure (Abramovitch *et al.*, 2006a, 2006b; Janjusevic *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006; Melotto *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2006). Our work describes a new strategy used by *B. cinerea* to invade its host through the activation of *EDS1* and *SGT1* genes, which allow the establishment of HR and the fungus to spread (Fig. 5). In other words, the fungus exploits the plant's immune system that leads to the HR, in order to invade the host (Fig. 5). Govrin & Levine (2000) have shown that reductions in the HR or in production of reactive oxygen species stop the spread of the fungus. Our result indicates that the cell

death produced by *Botrytis* mimics the HR to a further extent, as the induction of the *SGT1* and *EDSI* genes (up to now considered to be involved in disease resistance) is essential for the fungus to infect its host.



**Fig. 4: Baculovirus antiapoptotic protein p35 compromises the disease caused by *Botrytis cinerea*.** (a) Infection tests on leaves from tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing the baculovirus antiapoptotic protein and corresponding control. (b) Disease severity measured as diameter of necrosis induced by *B. cinerea* on leaves shown in (a). Error bars, SD. Images and necrosis sizes were recorded 4 d postinoculation. Data sets marked with an asterisk are significantly different from control (wild type) as assessed by Student's *t*-test: \*,  $P < 0.001$ .

The data presented in this paper show clearly that *SGT1* and *EDS1*, required for plant disease resistance against biotrophic pathogens, are also involved in symptom development during disease susceptibility to *B. cinerea*. This work provides new data that will help understand the virulence process used by the necrotrophic pathogen *B. cinerea* in order to invade its hosts.



**Fig. 5: Model explaining the role of *EDS1* and *SGT1* in the disease induced by *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*.** The hypersensitive response (HR) is controlled by the two signalling components *SGT1* and *EDS1*. This HR is compromised by the antiapoptotic protein baculovirus p35. The HR is important for the virulence process of *B. cinerea*. *Botrytis cinerea* restores disease through activation of *EDS1* and *SGT1*, both controlling HR development.

## Acknowledgements

We thank Professor David Baulcombe and the Sainsbury Laboratory for providing the VIGS system, and Dr Lam for providing p35-expressing tobacco plants. We thank Dr Rocio Gonzalez-Lamothe for constructive criticism of the manuscript. This work is supported by the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada (CRSNG), Canadian Foundation of Innovation and the Université de Sherbrooke.

## References

**Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB. 2003.** *Pseudomonas* type III effector *AvrPtoB* induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO Journal* 22: 60–69.

**Abramovitch RB, Janjusevic R, Stebbins CE, Martin GB. 2006a.** Type III effector *AvrPtoB* requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 2851–2856.

**Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. 2006b.** Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 601–611.

**Austin MJ, Muskett P, Kahn K, Feys BJ, Jones JD, Parker JE. 2002.** Regulatory role of *SGT1* in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 295: 2077–2080.

**Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, Freialdenhoven A, Shirasu K, Schulze-Lefert P. 2002.** The *RAR1* interactor *SGT1*, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073–2076.

**Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker J, Shirasu K. 2006.** Role of *SGT1* in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO Journal* 25: 2007–2016.

**Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, Aki C, Fallik E. 2003.** Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285–290.

**Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A. 2002.** A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418: 889–892.

**Brodersen P, Petersen M, Bjorn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J. 2006.** Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and

jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal* 47: 532–546.

**Cabanne C, Doneche B. 2002.** Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiological Research* 157: 183–189.

**Cristescu SM, de Martinis D, te Lintel Hekkert S, Parker DH, Harren FJM. 2002.** Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5342–5350.

**Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, Pierce NE, Ausubel FM. 2005.** *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 1791–1796.

**da Cunha L, McFall AJ, Mackey D. 2006.** Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microbes and Infections* 8: 1372–1381.

**Dangl JL, Jones JDG. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.

**Devoto A, Turner JG. 2003.** Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* 92: 329–337.

**Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R. 2001.** Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 6957–6962.

**Dinesh-Kumar SP, Anandalakshmi R, Schiff M, Liu Y. 2003.** Virus-induced gene silencing. *Methods in Molecular Biology* 236: 287–294.

**Doares SH, Narváez-Vásquez J, Conconi A, Ryan CA. 1995.** Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology* 108: 1741–1746.

**Elad Y. 1997.** Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews* 72: 381–422.

**Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JDG, Daniels MJ, Parker JE. 1999.** EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis*, has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 3292–3297.

**Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G. 2003.** Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell* 15: 93–106.

**Glazebrook J. 2001.** Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis – 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 301–308.

**Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205–227.

**Govrin EM, Levine A. 2000.** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751–757.

**Gupta V, Willits MG, Glazebrook J. 2000.** Arabidopsis thaliana EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 13: 503–511.

**Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1997.** Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575–607.

**Harms K, Ramirez I, Peña-Cortés H. 1998.** Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiology* 118: 1057–1065.

**Hauck P, Thilmony R, He SYA. 2003.** A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 8577–8582.

**ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J, van Kan JA. 2001.** *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genetics and Biology* 33: 97–105.

**Heath MC. 2000.** Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321–334.

**Holt BF, III, Belkhadir Y, Dangl JL. 2005.** Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* 309: 929–932.

**Hu G, deHart AK, Li Y, Ustach C, Handley V, Navarre R, Hwang CF, Aegerter BJ, Williamson VM, Baker B. 2005.** EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *Plant Journal* 42: 376–391.

**Hubert DA, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K, Dangl JL. 2003.** Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO Journal* 22: 5679–5689.

**Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE. 2006.** A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222–226.

**Jones JD, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

**Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA, van Kan JA. 2005.** Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant Journal* 43: 213–225.

**Kunkel BN, Brooks DV. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325–331.

**Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C. 1996.** Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6: 427–437.

**Liu Y, Schiff M, Serino G, Deng XW, Dinesh-Kumar SP. 2002.** Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14: 1483–1496.

**Lorenzo O, Solano R. 2005.** Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 532–540.

**Mansfield JW. 1980.** The biology of *Botrytis*. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR, eds. *The biology of Botrytis*. London: Academic Press, 181–218.

**Mayer AM, Staples RC, Gil-ad NL. 2001.** Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58: 33–41.

**McDowell JM, Dangl JL. 2000.** Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science* 25: 79–82.

**Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006.** Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.

**Morel JB, Dangl JL. 1999.** Suppressors of the *Arabidopsis* *lsd5* cell death mutation identify genes involved in regulating disease resistance responses. *Genetics* 151: 305–319.

**Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006.** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140: 249–262.

**Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y. 1998.** Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* 39: 500–507.

**Nomura K, Melotto M, He SY. 2005.** Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 361–368.

**Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumpilin N, Jones J, He SY. 2006.** A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313: 220–223.

**Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC. 2002a.** An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 29: 569–579.

**Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DA, Xiao S, Coleman MJ, Dow M, Jones JD, Shirasu K, Baulcombe DC. 2002b.** Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 10865–10869.

**Poinssot B, Vandelle E, Bentejac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thevenot P, Pugin A. 2003.** The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16: 553–564.

**del Pozo O, Lam E. 1998.** Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* 8: 1129–1132.

**del Pozo O, Lam E. 2003.** Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16: 485–494.

**Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. 2001.** Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* 25: 237–245.

**Rha E, Park HJ, Kim MO, Chung YR, Lee CW, Kim JW. 2001.** Expression of exopolygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 201: 105–109.

**Soulie MC, Piffeteau A, Choquer M, Boccara M, Vidal-Cros A. 2003.** Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene Bcchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genetics and Biology* 40: 38–46.

**Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM. 2003.** NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760–770.

**Tor M, Gordon P, Cuzick A, Eulgem T, Sinapidou E, Mert-Turk F, Can C, Dangl JL, Holub EB. 2002.** Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 14: 993–1003.

**Wiermer M, Feys BJ, Parker JE. 2005.** Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 383–389.

**Wubben JP, Mulder W, ten Have A, van Kan JA, Visser J. 1999.** Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1596–1602.

**Yun MH, Torres PS, El Oirdi M, Rigano LA, Gonzalez-Lamothe R, Marano MR, Castagnaro AP, Dankert MA, Bouarab K, Vojnov AA. 2006.** Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology* 141: 178–187.

## CHAPITRE 2

### ***BOTRYTIS CINEREA* MANIPULE LES EFFETS ANTAGONISTES ENTRE LES VOIES IMMUNITAIRES DE LA PLANTE POUR INSTAURER SA MALADIE**

#### **Préambule**

Les plantes sont équipées d'un arsenal de mécanismes de défense pour se protéger contre les agents pathogènes. Leur défense est basée sur l'immunité innée de chaque cellule et les signaux systémiques émanant des sites d'infection. Il est admis que les plantes ont élaboré au cours de leur évolution des moyens de défense qui leur permettent de s'adapter afin de contrer efficacement les agressions. Il va sans dire que les réponses de défense de la plante dépendent du mode de vie de l'agent pathogène qui l'infecte. Si elle est confrontée à un agent pathogène biotrophe ayant besoin de cellules vivantes pour proliférer, la plante induira la mise en place des réponses de défense dépendantes de la voie de l'AS. Dans le cas d'un agent pathogène nécrotrophe, qui tire profit des cellules mortes, la plante induira la mise en place des réponses de défense liées à la voie de l'AJ. Ces deux voies (acide salicylique et acide jasmonique) peuvent être antagonistes.

L'article suivant montre que l'agent pathogène nécrotrophe *B. cinerea* induit l'expression de la systémine qui est impliquée dans la résistance contre ce champignon, par l'activation de la voie de l'AJ, incluant l'expression des inhibiteurs de protéinases PI I et II. Pour contourner cette réaction immunitaire de la plante, *B. cinerea* a développé un facteur de virulence qui lui permet de manipuler l'effet antagoniste qui existe entre les voies de l'AS et l'AJ pour mettre en place la maladie. En effet *B. cinerea* produit un exopolysaccharide, le  $\beta$ -(1,3) (1,6) glucane, qui induit l'accumulation de l'AS. Ce dernier agit comme antagoniste de la voie de l'AJ par la suppression de l'expression des gènes de défense dépendant de l'AJ notamment, les inhibiteurs de protéinases PI I et II.

L'ensemble des résultats obtenus dans cet article, montre pour la première fois que la suppression des réponses de défense de la plante par la manipulation de l'interaction

entre les voies immunitaires (entre l'AS et l'AJ), représente une stratégie sophistiquée utilisée par *B. cinerea* pour favoriser le développement de la maladie.

J'ai réalisé la majorité des expériences décrites dans cet article, ainsi que la rédaction du manuscrit. L. Rigano, A. Vojnov et C. Rodriguez ont fait les expériences de caractérisation de l'exopolysaccharide (Figure 2a-f). A. El Hadrami et F. Daayf ont fait les dosages de l'AS et de l'AJ (Figure 4a et figure supplémentaire 4). Le Dr. Kamal Bouarab a participé activement à la conception des expériences et à la rédaction du manuscrit.

***Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between plant immune pathways to restore its disease**

Mohamed El Oirdi<sup>1</sup>, Luciano Rigano<sup>2</sup>, Abdelbasset El Hadrami<sup>3</sup>, Cecilia Rodriguez<sup>4</sup>,  
Fouad Daayf<sup>3</sup>, Adrian Alberto Vojnov<sup>2</sup>, Kamal Bouarab<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Amélioration Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, 2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke, Québec, J1K2R1, Canada

<sup>2</sup>Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Patricias Argentinas 435, C1405BWE, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Department of Plant Science, 222 Agriculture Building, University of Manitoba, Winnipeg, MB, R3T 2N2, Canada.

<sup>4</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Author for correspondence: Kamal Bouarab Tel: +1 819 8217070 Fax: +1 819 8218049  
Email: Kamal.Bouarab@USherbrooke.ca

**ABSTRACT**

**Plants have evolved a powerful and multi-layered immune system to defend against infection by most microbial organisms. Resistance against biotrophic pathogens requires salicylic acid (SA) signalling but to combat necrotrophic pathogens plants need to activate jasmonic acid (JA) pathway. SA can antagonise JA signalling and vice versa. We show here that the necrotrophic pathogen *B. cinerea* induces the expression of systemin which is involved in the resistance of tomato against this fungus by activating JA signalling including the expression of proteinase inhibitors I and II. To circumvent this immune response, *B. cinerea* has evolved a new specific virulence factor to effectively manipulate the antagonistic effects between SA and JA pathways as an important pathogenesis strategy to spread in the host. Suppression of plant immune responses by manipulating the cross talk between the plant immune systems represent a sophisticated strategy used by this fungus to promote disease symptom development.**

Plants are able to defend themselves against attack by a variety of potential pathogens through the deployment of both constitutive and induced defences<sup>1</sup>. The plant hormones salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) are major players in the regulation of signalling networks that are involved in induced defence responses against pathogens<sup>2,3</sup>. Some plant defence responses are associated with the activation of a salicylic acid (SA)-dependent signalling pathway which leads to expression of certain pathogenesis-related (PR) proteins thought to contribute to resistance<sup>2</sup>. Some other plant defence responses are controlled by mechanisms dependent on jasmonic acid (JA) that leads to expression of proteinase inhibitors I and II<sup>3</sup>. It has become clear that different defensive pathways are differentially effective against specific types of attackers. In general, pathogens that have a biotrophic and hemi-biotrophic lifestyle are more sensitive to SA-dependent responses, whereas usually necrotrophic pathogens are better resisted by JA-dependent defenses<sup>4</sup>. It is also well documented that SA- and JA-dependent pathways have been shown to be reciprocally antagonistic<sup>5,6,7</sup>. SA and JA cross-talk presumably reduces fitness costs of

inappropriate resistance and provides the plant with a regulatory potential to fine-tune the defence reaction depending on the type of attacker encountered.

The fungus *Botrytis cinerea* is a plant necrotrophic pathogen that colonizes senescent or dead plant tissues, causes grey mould in vegetables and softening in fruits. Fungal hyphae can penetrate through wounds or natural openings of the plant tissue and spread from previously colonized dead tissues into healthy tissues<sup>8</sup>. *B. cinerea* attacks different plant tissues and has a broad host range of food plants including grapes, tomato, potato, strawberry and causes the important economic losses, either in pre- or post-harvest crops. Several virulence factors required for its pathogenicity on different hosts have been described<sup>9</sup>. The successful protection of host plants against this pathogen is severely hampered by the lack of resistance genes in the hosts and the considerable phenotypic diversity of the fungus.

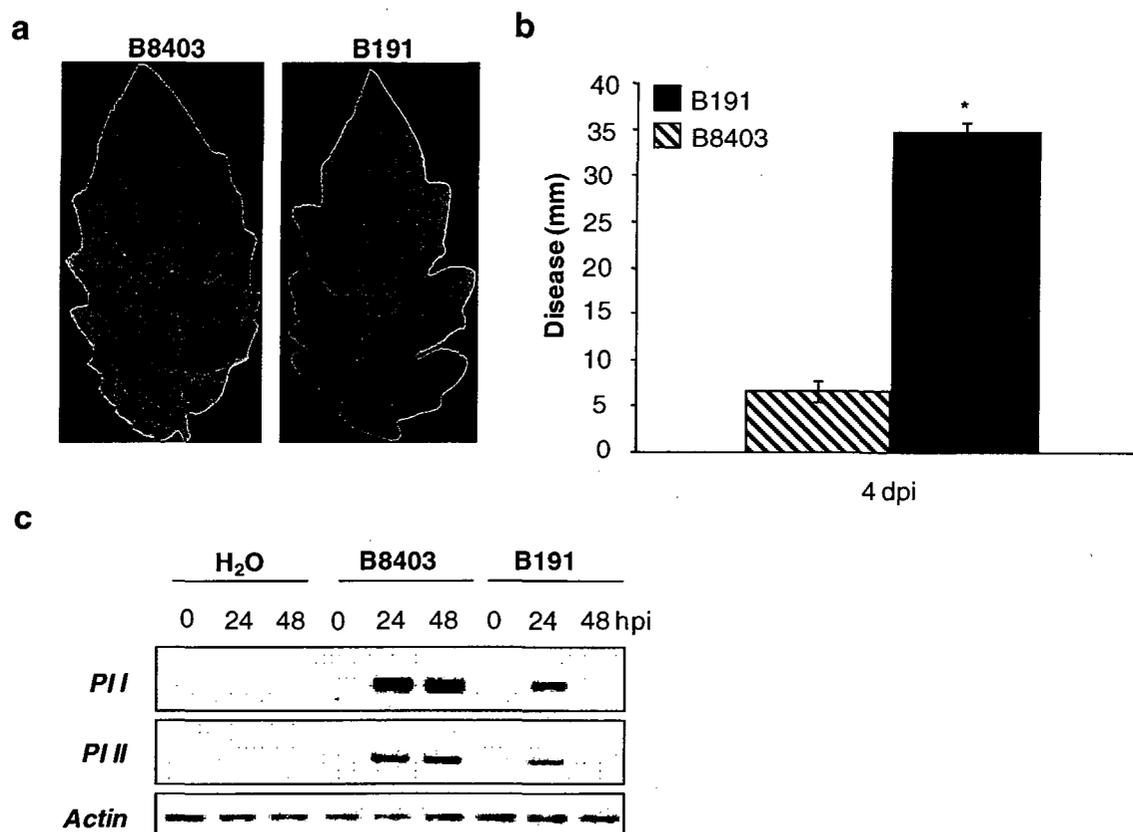
Suppression of plant immune responses is one of the sophisticated strategies used by some pathogens to invade their hosts<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15</sup>. Targets for suppression include the hypersensitive response, expression of defence-related genes, cell wall-based defences, and jasmonic acid signalling<sup>10, 16</sup>. Many necrotrophic fungi have an early biotrophic stage in their early host infection process<sup>17</sup>. The presence of this biotrophic stage may have a biological significance during the interaction between necrotrophic pathogens and their hosts. SGT1 (suppressor of the G2 allele of *skp1*) and EDS1 (enhanced disease susceptibility) are two plant signalling components required for the SA-induced resistance against biotrophic pathogens<sup>18</sup>. Lack of SGT1b enhances disease resistance to the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum* in *Arabidopsis* buds and flowers<sup>19</sup>. We have shown that SGT1 and EDS1 are also involved in symptom development during disease susceptibility to *B. cinerea*<sup>8</sup>. These data lead us to investigate whether the necrotrophic pathogen *B. cinerea* overcomes host immunity and cause diseases by manipulating the antagonistic effect between SA, required to combat biotrophic pathogens, and JA signalling, essential for plants to resist against necrotrophic microbes.

Pathogenicity tests were carried out on tomato (*Solanum lycopersicum* Monemayker) leaves with two isolates of *B. cinerea*, B191<sup>8</sup> and B8403, provided by the Canadian

Collection of Fungal Cultures. Detached leaves from five weeks old tomato plants were infected with mycelium plugs (5 mm of diameter) of both isolates. The disease was analysed four days post inoculation. Inoculations of tomato leaves with B191 isolate consistently yielded expanding disease lesions (Fig. 1a). In contrast, lesion expansion was not observed after inoculation of tomato leaves with B8403 isolate (Fig. 1a). The severity of the disease was quantified by measuring the diameter of the necrotic lesion. The isolate B191 induced a high necrosis lesion with a diameter around 35 mm after four days (Fig. 1b). However, the isolate B8403 was not able to cause high necrosis lesion on tomato (lesion diameter was around 8 mm, Fig. 1b). These results suggest that *B. cinerea* B191 but not B8403 isolate, is virulent on tomato. We then tested whether the absence of the disease in B8403 isolate-infected tomato leaves was related to the activation of defence responses. The resistance to *B. cinerea* has been known to be JA dependent<sup>20</sup>. This lead us to look on the expression levels of the two JA acid dependent genes, proteinase inhibitors I and II (PI I, PI II). Five weeks old tomato plants were sprayed with spores ( $10^6$  spores/ml) of both isolates. The plants were then incubated in a growth chamber with high humidity and the samples were harvested at 0, 24 and 48 hours post infection. A semi-quantitative assay of the expression of PI I and II was carried out by RT-PCR (Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction). Interestingly *B. cinerea* B8403 isolate induced the expression levels of JA dependent and transient genes, PI I and II (Fig. 1c). In contrast the expression level of those genes was lower in tomato inoculated with the virulent B191 isolate (Fig. 1c). These results suggest that the induction of the expression of PI I and II was correlated with the resistance of tomato plants to *B. cinerea* B8403 isolate.

To further investigate the role of JA signalling in the resistance against *B. cinerea* isolate B8403, we tested wild-type tomato cv Castlemart and the jasmonate-deficient mutants *def1* (Defensless1) and *Spr2* (suppressor of prosystemin-mediated responses2)<sup>21</sup>. Leaves from wild type and mutant tomato plants were infected with mycelium plugs (5 mm of diameter) of B8403 or B191 isolates. The severity of disease was evaluated four days after inoculation. The infection of wild type, *def1* and *Spr2* mutants with the virulent

B191 isolate was similar (Supplementary Fig. 1a, c). In contrast to wild type tomato, *def1* and *Spr2* tomato mutants were susceptible to *B. cinerea* B8403 isolate.

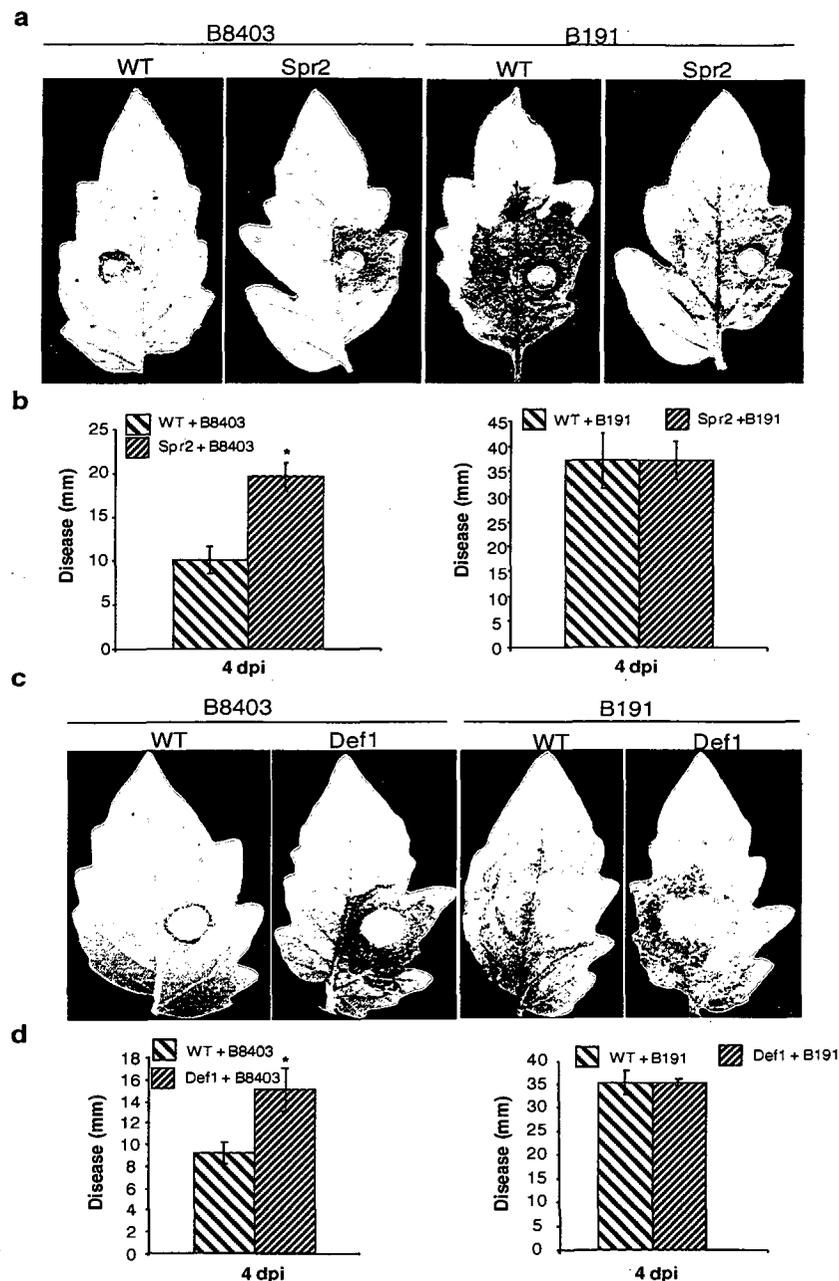


**Fig. 1: Pathogenicity test in tomato leaves with two *Botrytis cinerea* isolates**

Detached leaves from five-week-old plants were inoculated with 5 mm diameter of either *B. cinerea* B8403 or B191 isolate. Pictures were taken (a) and disease diameter was analysed (b), 4 days post inoculation (dpi). Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different as assessed by the Student's t-test: \*P < 0.001. (c) Expression patterns of *PI I* and *PI II* after *Botrytis cinerea* infection. Five-week-old plants were sprayed with either 10<sup>6</sup> spores/mL of *B. cinerea* B191 or B8403 isolate or H<sub>2</sub>O; samples were harvested for RNA extractions 0, 24 and 48 hours after infections. RT-PCR was carried out with specific primers for *tomato PI I*, *PI II* and *Actin* (control) as described in material and methods. The gel picture is representative of three independent experiments.

The severity of the disease was quantified by measuring the diameter of the necrotic lesion (Supplementary Fig. 1 b, d). The lesion diameter recovered from leaves of *def1* and *Spr2* tomato mutants infected with B8403 isolate was approximately 2 fold higher

than the ones of wild type tomato plants (Supplementary Fig. 1 b, d). These results suggest that JA signalling is involved in the resistance of tomato to *B. cinerea* B8403 isolate, which is consistent with the results published previously<sup>22</sup>.

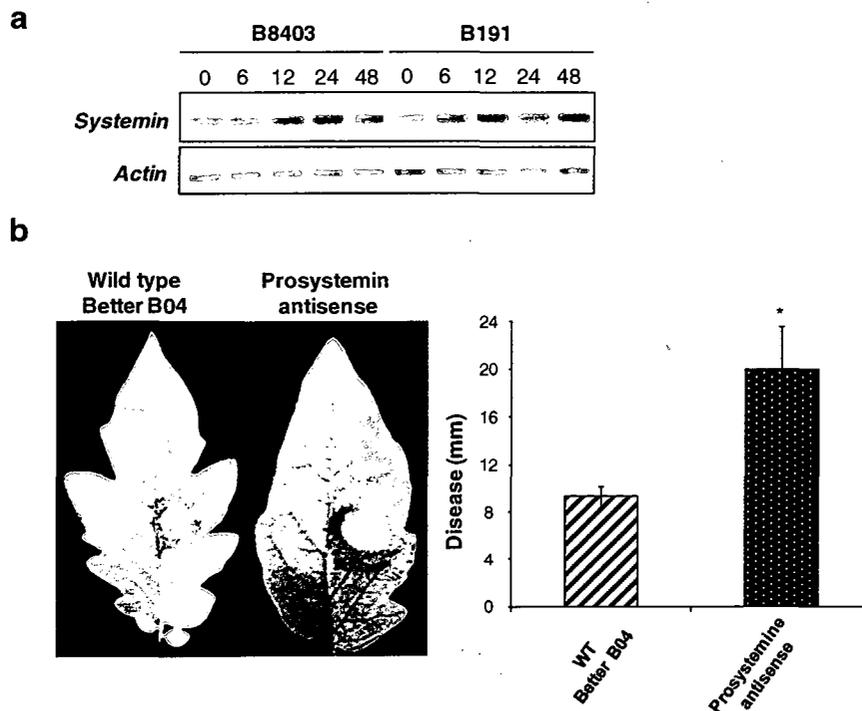


**Supplementary Fig. 1: Resistance of tomato to *B. cinerea* B8403 isolate requires jasmonic acid signalling.**

Detached leaves from five-week-old plants impaired in jasmonate synthesis (*spr2* in a and b ; *def1* in c and d) and their wild type progenitor were inoculated with 5 mm

diameter of either *B. cinerea* B191 or B8403 isolate. Pictures were taken (a and c) and disease diameter (b and d) was analysed, 4 dpi. Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different from controls (wild type plants) as assessed by the Student's t-test: \*P < 0.001.

The polypeptide systemin is known to be an elicitor of JA signalling in tomato<sup>21</sup>. We then evaluated whether systemin is involved in the resistance of tomato to *B. cinerea*. The transcript levels of systemin were analysed from the leaves of tomato plants sprayed with spores (10<sup>6</sup> spores/ml) of B191 or B8403 isolates. Interestingly the two isolates induced the accumulation of systemin transcript (Supplementary Fig. 2 a). Remarkably expression of an Antisense Prosystemin gene, a precursor of systemin, in tomato plants reduced resistance to *B. cinerea* B8403 isolate compared to the wild type plants (Supplementary Fig. 2 b). These data suggest clearly that systemin is involved in the interaction between *B. cinerea* and its host tomato.



**Supplementary Fig. 2: Systemin is involved in the interaction between tomato and *B. cinerea*.**

(a) Expression of systemin transcript is induced in tomato by both isolates of *B. cinerea*. Five-week-old plants were sprayed with either 10<sup>6</sup> spores/mL of *B. cinerea* B191 or

B8403 isolate and then 0, 6 and 12 hours later leaves were used to extract RNA. RT-PCR was carried out with specific primers for *tomato prosystemin* and *Actin* (control) as described in material and methods. The gel picture is representative of three independent experiments. (b) Tomato leaves expressing the antisense of *prosystemin* are susceptible to the isolate B8403. Detached leaves from five-week-old WT and *prosystemin* antisense-expressing plants were inoculated with 5 mm diameter of *B. cinerea* B8403. Pictures were taken (b, left panel) and disease diameter (b, right panel) was analysed, 4 dpi. Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different as assessed by the Student's t-test: \*P < 0.001.

*B. cinerea* was shown to produce an exopolysaccharide (EPS) known as  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan<sup>23</sup>. EPSs are a group of carbohydrates produced by several pathogenic fungi and bacteria and they are established as key virulence factors and some of them are involved in suppression of plant immune responses<sup>14, 15</sup>. We first purified the EPS from the virulent isolate B191 as described in Material and Methods. Polysaccharide molecules were then observed by atomic force microscopy single (Fig. 2a). The results showed that the contour length of the EPS was between 6.5 to 9.67 Å and the end to end distances of the molecules was between 0, 9 to 1, 26 µm, demonstrating that the EPS is a high molecular weight polysaccharide (Fig. 2a). To determine the nature of this EPS, an acid hydrolysis was performed and the products were analyzed by thin layer (TLC) and GC chromatography. The pure glucose, galactose and mannose were used as a control. TLC and GC experiments showed that the main monomeric constituent of the EPS was the glucose (Fig. 2b-d). Glycosidic linkages were determined by two-dimensional nuclear magnetic resonance analysis (Fig. 2e). The <sup>13</sup>C HMQC analysis showed signals indicating the presence of a  $\beta$  (1→3)-glucan backbone, namely 102.88 ppm (C-1), 73.64 ppm (C-2), 87.09 ppm (C-3), 69.91 ppm (C-4), 76.67 ppm (C-5) and 60.84 (C-6)<sup>24</sup>. C-1 signals at low field and H-1 signals at high field indicated  $\beta$ -configuration. There is an additional signal corresponding to anomeric carbon at 102.92 ppm (Fig. 2f). This, together with the downfield displacement of signal corresponding to C-6 at 68.56 ppm indicates some degree of substitution in C-6 by  $\beta$ -D-glucopyranosyl stubs on the main backbone (Fig. 2b, d). Signals at 72.42 ppm, 76.76 ppm and 60.86 ppm can be respectively attributed to C-2, C-3 and unsubstituted C-6 of the afore mentioned 6-linked stubs. These data suggest that the EPS produced by the isolate B191 corresponded to the

$\beta$ -(1,3)(1,6) glucan described previously<sup>23</sup> (Fig. 2g). Interestingly we found that the isolate B191 who causes disease on tomato produces a high amount of the  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan, whereas the isolate B8403 produces much lower amount (Fig. 2 h). These data led us to investigate the role of this glucan in the disease caused by *B. cinerea*.

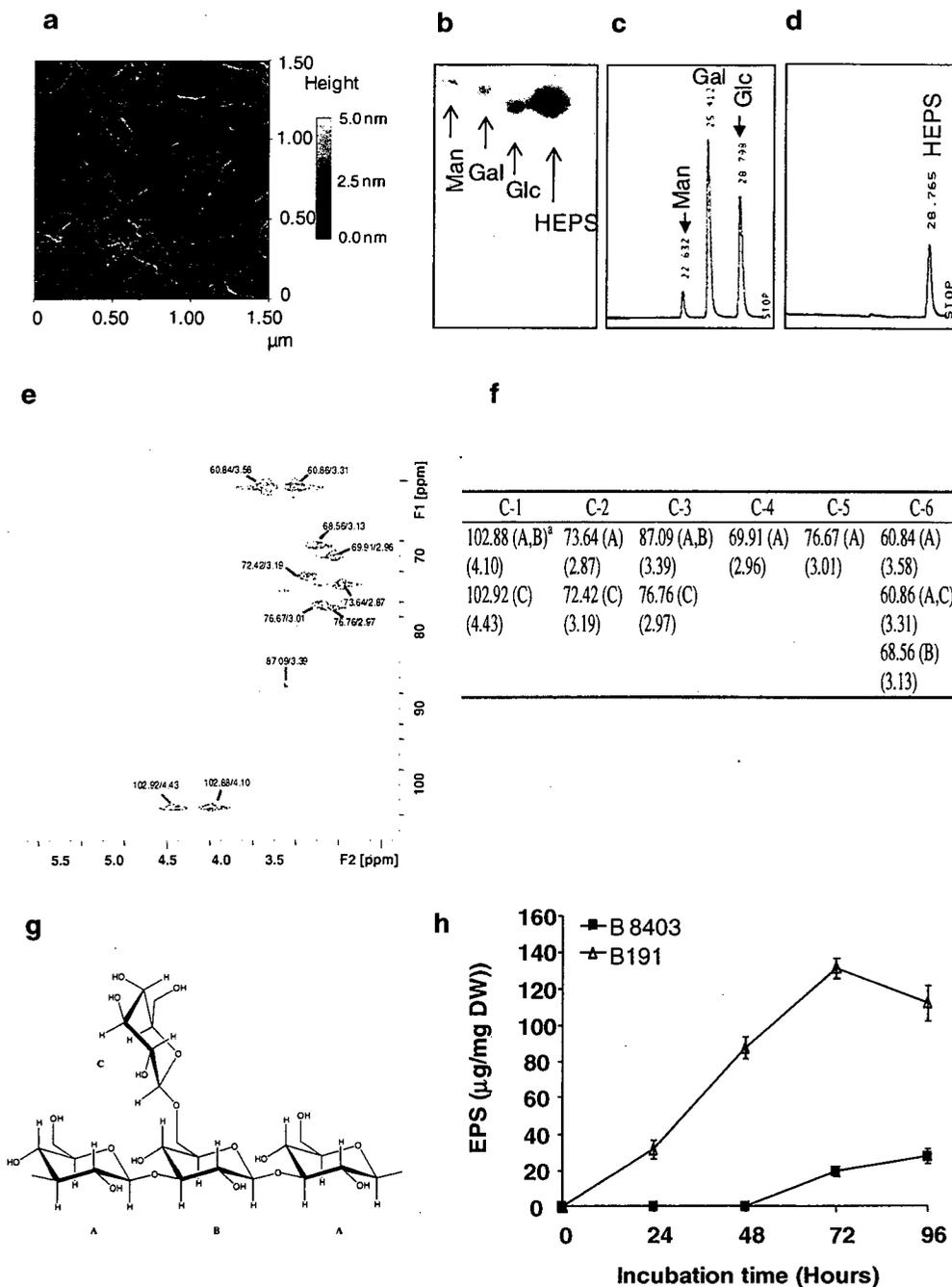
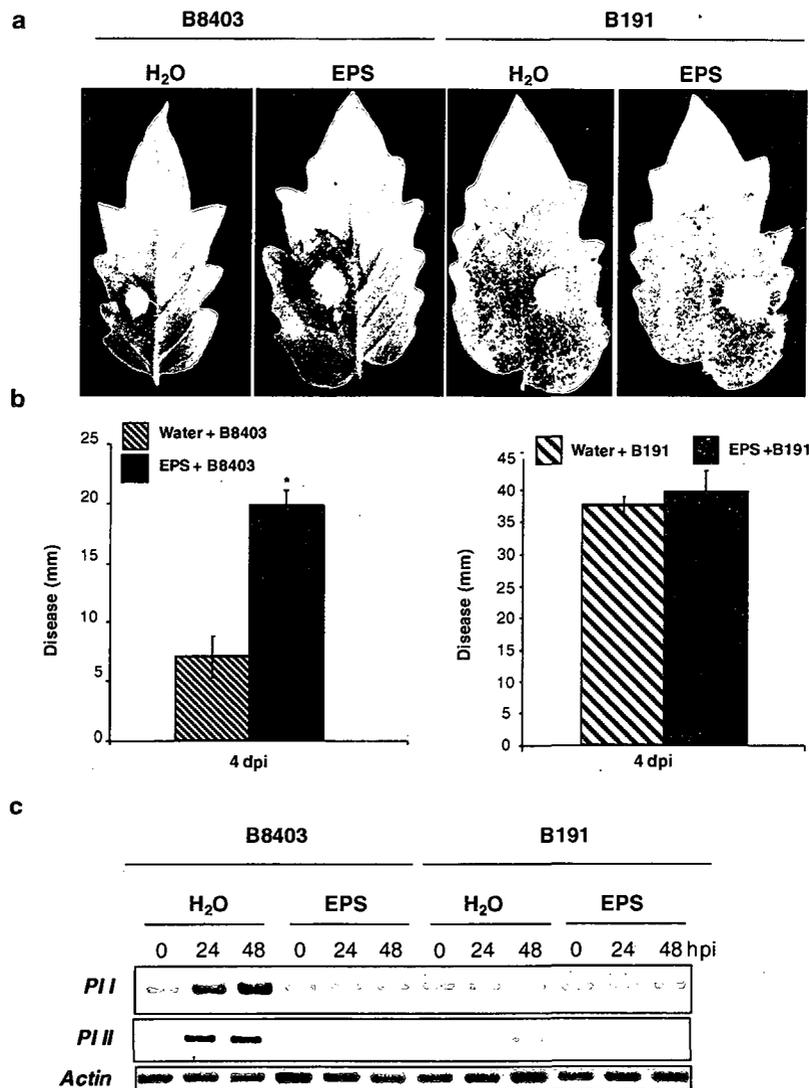


Fig. 2: *B. cinerea* secretes a  $\beta$ -(1,3)(1,6) glucan (EPS)

(a) Atomic Force Microscopy image of the pure EPS. (b) Thin Layer Chromatography of the hydrolyzed EPS (HEPS). Glucose (Glc), mannose (Man) and galactose (Gal) are used as standards. Gas chromatography-mass spectrometry profiles of standards shown in b (c) and the derivative sugars from the hydrolyzed EPS (d). (e) Heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  chemical shift correlated spectrum of the EPS. (f)  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR assignments of the EPS. Letters in brackets refer to glucopyranose units shown e. (g) A possible repeating unit for the EPS. A,B and C refers to letters in brackets shown in f. (h) Quantification of the EPS amount (in  $\mu\text{g}$  per mg of dry weight) produced in PDB medium by B191 and B8403 isolates. Data presented are the means of three biological replicates and error bars represent the standard deviation.

Tomato leaves were sprayed with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of purified  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan 24h before inoculation with the two isolates of *B. cinerea*, B191 or B8403 (Fig. 3). Remarkably, leaves of tomato pre-treated with  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan showed disease symptoms in response to the isolate B8403. However, mock-treated plants were still resistant to B8403 (Fig. 3a). The severity of the disease was quantified by measuring the diameter of the necrotic lesion. For the isolate B8403, the lesion diameter recovered from leaves of tomato plants pre-treated with  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan was approximately 2 fold higher than the one of mock-treated plants (Fig. 3b). The symptoms and the necrotic lesion induced by the virulent isolate B191 in plants pre-treated with  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan were similar to those mock-treated (Fig. 3a, b). As several EPSs are suppressors of plant defence, we then investigated whether  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan suppresses JA-dependent defence markers (PI I and II) induced by B8403 isolate in tomato. Five weeks old tomato plants were pretreated with water, or  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan 24h before inoculation, by spraying, with spores ( $10^6$  spores/ml) of both isolates. The plants were then incubated in growth chamber with high humidity and the samples were harvested at 0, 24 and 48 hours post infection. Transcript levels of PI I and II were detected by RT-PCR. Interestingly, a significant reduction of PI I and PI II expression was observed in leaves pre-treated with  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan compared to those pre-treated with water (Fig. 3c). From these data we conclude that the  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan permits growth of *B. cinerea* in tomato by compromising JA-dependent defences.

To characterize this suppression effect, a dose response and the minimal time necessary for this  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan to induce tomato susceptibility to *B. cinerea* were determined. Several concentrations of  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan from 10 to 150  $\mu$ g/ml were used to pre-treat tomato plants 24 hours before inoculation with mycelium plugs (5 mm of diameter) of B8403 isolate. The severity of disease was evaluated by measuring the necrosis diameter four days post inoculation.



**Fig. 3:  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induces susceptibility of tomato to *B. cinerea* by suppressing JA signalling.**

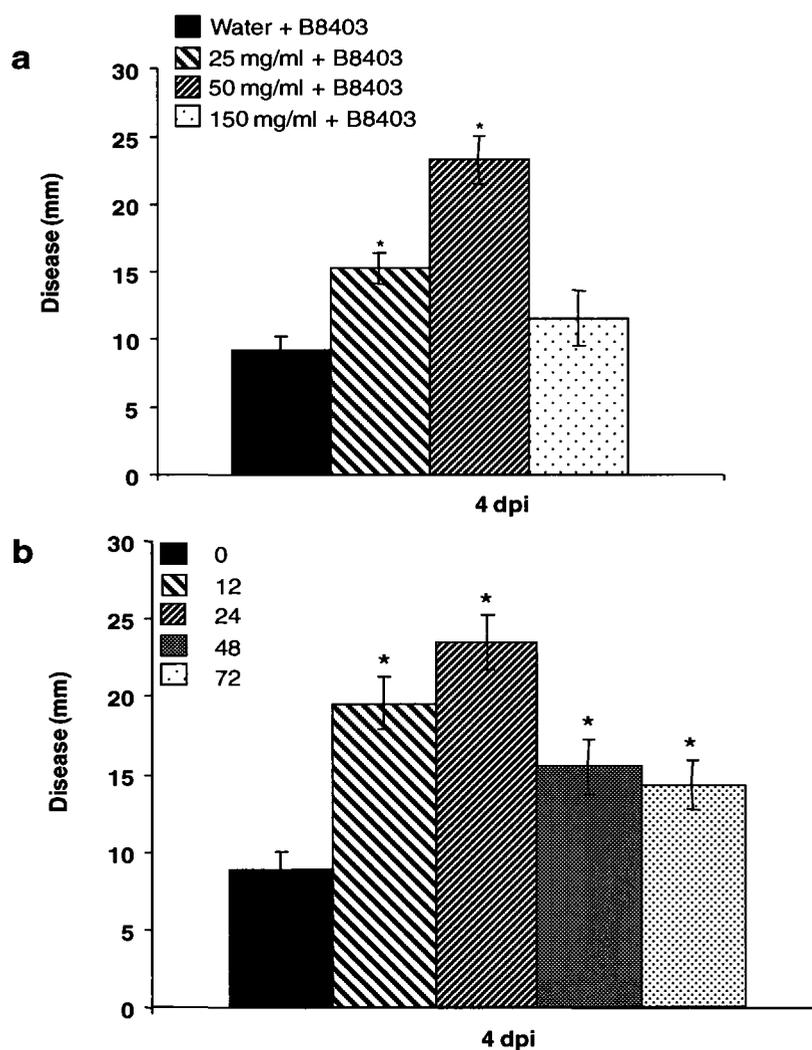
(a, b) infection of tomato leaves with *B. cinerea* isolates B191 and B8403. Five-week-old tomato plants were sprayed with H<sub>2</sub>O or EPS, 24 hours after detached leaves were inoculated with 5 mm diameter of either *B. cinerea* B8403 or B191 isolate. Pictures were

taken (a) and disease diameter was analysed, 4 dpi (b). Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different as assessed by the Student's t-test: \* $P < 0.001$ . (c) Expression patterns of tomato *PI I* and *PI II* transcripts after *Botrytis cinerea* infection. Five-week-old plants were sprayed with H<sub>2</sub>O or EPS; 24 hours after treatment, tomato plants were sprayed with either 10<sup>6</sup> spores/mL of *B. cinerea* B191 or B8403 isolate or H<sub>2</sub>O; 0, 24 and 48 hours after infections, samples were harvested for RNA extractions. RT-PCR was carried out with specific primers for *tomato PI I*, *PI II* and *Actin* (control) as described in material and methods. The gel picture is representative of three independent experiments.

The results showed that the minimal concentration of  $\beta$ -glucan required for restoring disease symptoms with the avirulent isolate was 25  $\mu\text{g/mL}$  (Supplementary Fig. 3a). These data showed clearly that susceptibility of tomato to *B. cinerea* induced by  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan was dose dependent. The minimal time necessary for  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan to induce susceptibility of *B. cinerea* to tomato was carried out. Tomato leaves were pre-treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  of purified glucan 0, 6, 12, 24 and 48 hours before inoculation with mycelium plugs (5 mm of diameter) of B8403 isolate. The disease was analyzed by measuring the necrosis diameter four days after inoculation. As shown in Supplementary Fig. 3b, the minimal time between inoculations for the suppression effect to be observed was 6h. Thus, in B8403 isolate, the restoration of infection by  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan requires a minimal concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  and an induction period, from 6 hours, to be effective.

$\beta$ -glucans are also known to act as elicitors of plant immune responses including SA-dependent defence<sup>25</sup>. As the isolate B191 produced high amount of the  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan, we then tested whether this fungus and this EPS induce the accumulation of SA in tomato. Five weeks old tomato plants were sprayed with water, 10<sup>6</sup> spores/ml of the isolate B191 or B8403. The accumulation of SA was quantified by HPLC 12 and 24 hours after infection. On the other hand, five weeks old tomato plants were sprayed with water, or  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and samples were then harvested at 3 and 6 hours after treatments for SA quantification as below. Our experiments showed that in contrast to water-treated plants and B8403-infected tomatoes, B191 isolate and pure  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induce the accumulation of SA in tomato plants (Fig. 4a).

We have shown here that  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induces tomato susceptibility to *B. cinerea*, suppresses the expression of JA dependents genes PI I and PI II and induces the accumulation of SA (Fig. 3, 4). As it is clearly established that SA can antagonise JA, we then tested whether SA itself induces susceptibility of tomato to the isolate B8403. Five weeks old tomato plants were watered and sprayed with 0.05, 0.5 or 2.5mM of SA and 24h after, tomato detached leaves were inoculated with mycelium plugs (5 mm of diameter) of the avirulent isolate B8403. As shown in Fig. 4 b, plants pre-treated with SA were susceptible to B8403 and this susceptibility depended on the SA concentration.

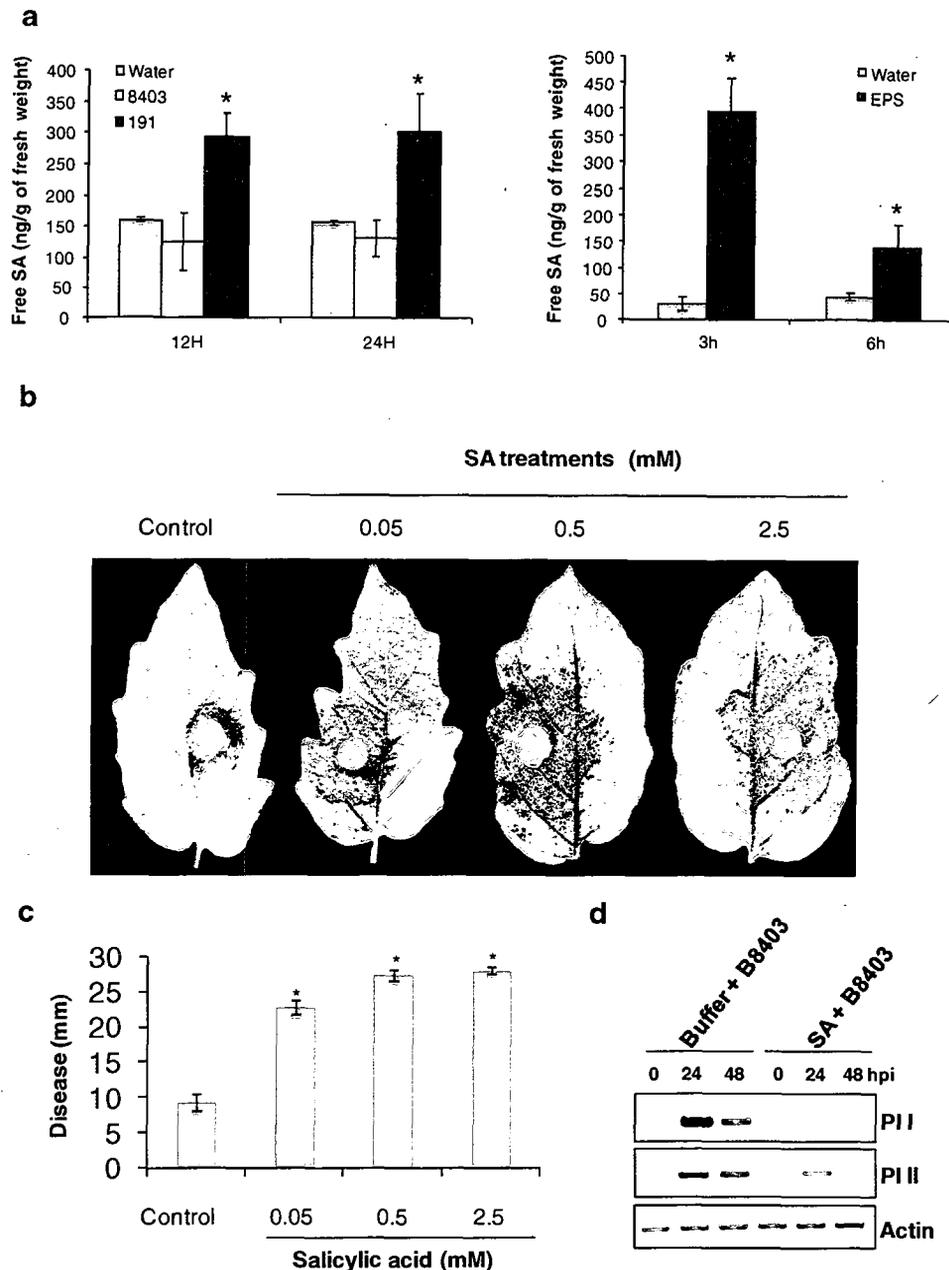


Supplementary Fig. 3: Characterisation of susceptibility induced by *B. cinerea* EPS in tomato.

(a) *B. cinerea*  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan suppression effect is dose dependent. Five-week-old plants were sprayed with either different concentrations of *B. cinerea*  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan (25, 50 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or water and then 24 hours later leaves were detached and were inoculated with 5 mm diameter of *B. cinerea* plugs. Disease diameters were assessed 4 dpi. Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different from control (water-pretreated leaves) as assessed by the Student's t-test: \* $P < 0.001$ . (b) The minimal time necessary for *B. cinerea*  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan suppressor to establish the susceptibility to the B8403 isolate. Five-week-old plants were sprayed with either 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *B. cinerea* EPS or water and then 0-12-24-48 or 72 hours later leaves were detached and were inoculated with 5 mm diameter of *B. cinerea* plugs. Disease diameters were assessed 4 dpi. Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different from control (water-pretreated leaves) as assessed by the Student's t-test: \* $P < 0.001$ .

The lesion diameters recovered from SA-pretreated leaves infected with B8403 are significantly higher than those recovered from water-treated leaves (Fig. 4c). As SA can antagonises JA signalling, we then tested the effect of SA on the expression of JA dependent defence marker (PI I and II) induced by B8403 isolate in tomato. Five weeks old tomato plants were pre-treated with buffer, or SA (0.5 mM) 24h before inoculation, by spraying, with spores ( $10^6$  spores/ml) of B8403 isolate. Interestingly, a significant reduction of PI I and PI II expression was observed in leaves pre-treated with SA and inoculated with B8403 compared to those pre-treated with buffer and infected with B8403. (Fig. 4 D). These results show clearly that *B. cinerea* manipulates, through its EPS  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan, the antagonistic effect between SA and JA to cause its disease in tomato.

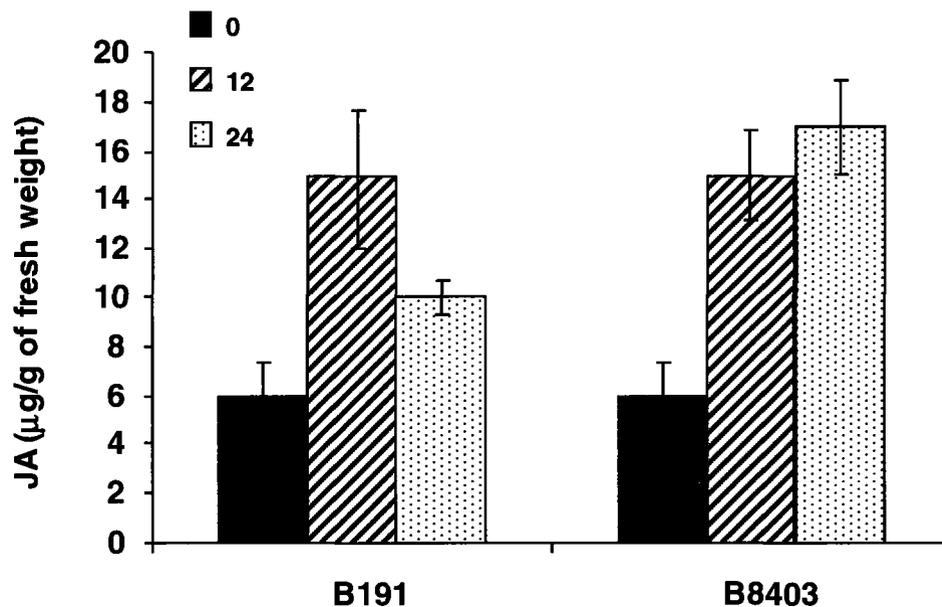
We then investigated whether *B. cinerea* isolates B191 and B8403 induce the accumulation of JA. Plants were sprayed with  $10^6$  spores/ml of B191 or B8403 isolate and samples were harvested 12 and 24 hours postinfection. JA was quantified as described in Material and methods. As shown in the Supplementary Fig. 4 both isolates induced similar quantity of JA at 12 hpi. This accumulation was slightly reduced at 24 hpi by B191 isolate but still higher. This result suggests that the suppression of JA dependent signalling by the virulent isolate B191 through its EPS is downstream of the accumulation of JA.



**Fig. 4:  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan induces the accumulation of SA which enhances susceptibility of tomato to *B. cinerea*.**

(a, b) SA accumulation in tomato in response to *B. cinerea* inoculations and the EPS treatment. Five-week-old tomato plants were sprayed with either  $10^6$  spores/mL of *B. cinerea* B191 or B8403 isolate (a, left panel) or EPS (b, right panel); water spray was used in both cases as a control; 12 and 24 hours after infections (a, left panel) or 3 and 6 hours after EPS treatments (a, right panel), samples were harvested for SA quantifications. Data for each of the three biological replicates are averages of two

technical replicates. Error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different from water-treated or B8403-infected plants as assessed by the Student's t-test: \*  $P < 0.001$ . (b, c) SA induces susceptibility of tomato to *B. cinerea*. Five-week-old tomato plants were treated with 0, 0.05, 0.5 or 2.5 mM of SA and detached leaves from treated plants were inoculated with 5 mm diameter of *B. cinerea* B8403 isolate. Pictures were taken (b) and disease diameter was analysed (c), 4 dpi. Data presented are the means of four biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with an asterisk are significantly different as assessed by the Student's t-test: \*  $P < 0.001$ . (d) Expression of tomato *PI I* and *PI II* after *B. cinerea* infection. Five-week-old plants were treated with SA or sodium phosphate buffer (control); 24 hours after treatment, tomato plants were sprayed with  $10^6$  spores/mL of *B. cinerea* B8403 isolate or H<sub>2</sub>O; 0, 24 and 48 hours after infections, samples were harvested for RNA extractions. RT-PCR was carried out with specific primers for *tomato PI I*, *PI II* and *Actin* (control) as described in material and methods. The gel picture is representative of three independent experiments.

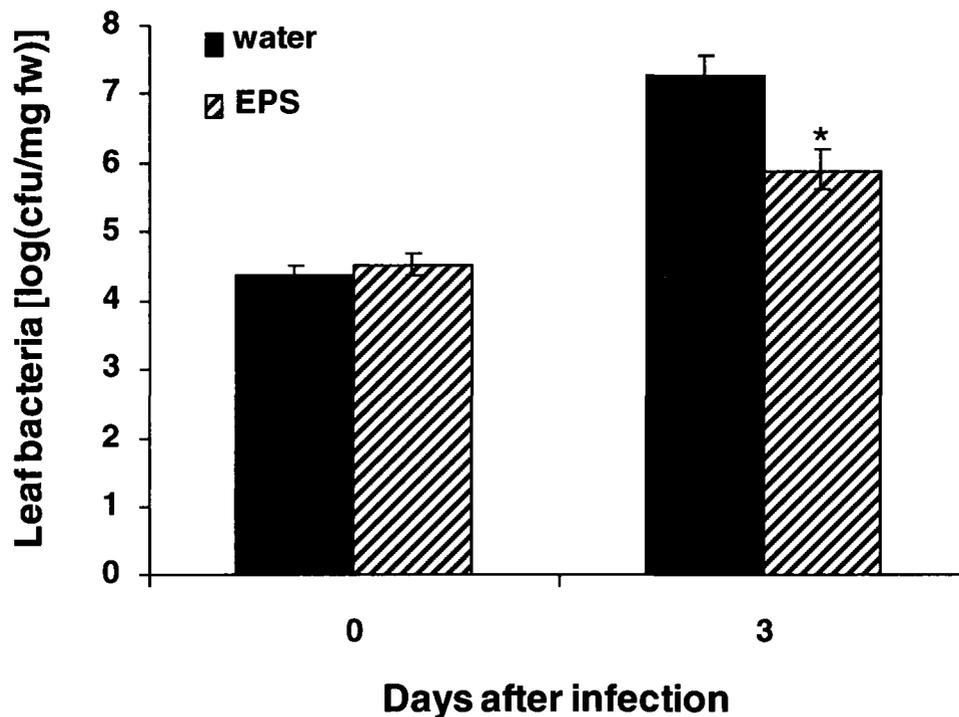


**Supplementary Fig. 4: JA accumulation in tomato in response to infection by *B. cinerea***

Five-week-old tomato plants were sprayed with either  $10^6$  spores/mL of *B. cinerea* B191 or B8403 isolate; 0, 12 and 24 hours after infections, samples were harvested for JA quantifications as described in Material and methods. Data for each of the three biological replicates are averages of two technical replicates. Error bars represent the standard deviation.

As the EPS induces SA accumulation which has been shown to be required for the resistance against biotrophic pathogens (Fig. 4), we investigated whether this EPS confers resistance to the biotrophic bacteria *P. syringae*. Tomato plants were sprayed

with water or the EPS (50 µg/mL) and 24 hours later they were dip inoculated with 0.01 OD of *P. syringae*. Sample leaves were harvested 0 and 3 dpi and assayed for bacterial growth. The number of bacteria recovered from leaves that had been pretreated with purified EPS was ~8-9-fold lesser than the number recovered from leaves pretreated with water. This result shows clearly that the EPS confers resistance to the biotrophic pathogen *P. syringae* DC3000 (Supplementary Fig. 5).



**Supplementary Fig. 5: *B. cinerea* EPS confers resistance to *P. syringae* DC 3000 in tomato**

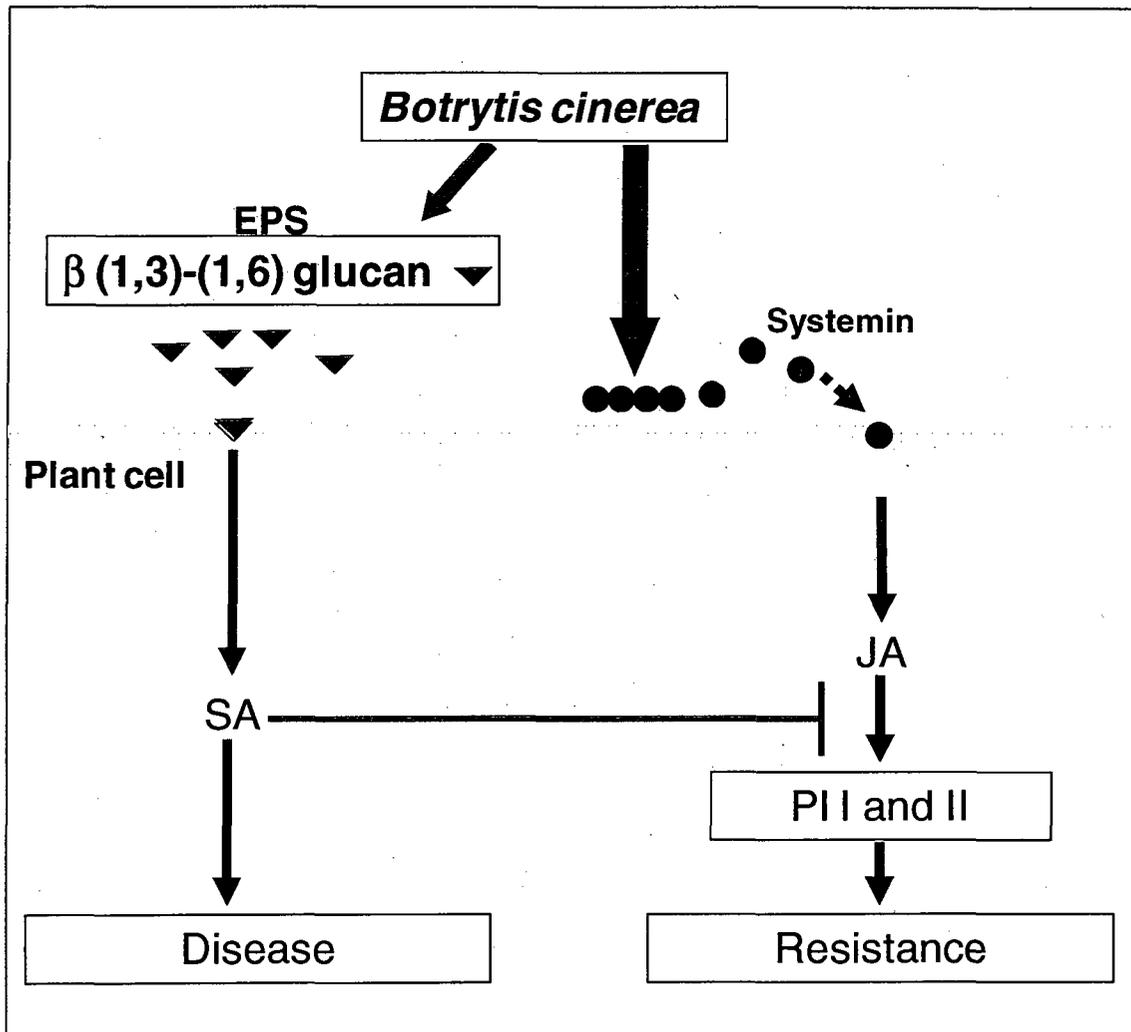
Plants were sprayed with the EPS or water and 24 hours later leaves were vacuum infiltrated with *P. syringae* DC3000 (about 0.01 OD). Bacterial numbers were measured immediately after bacterial inoculation and at 3 days after inoculation. Bacterial numbers were reported in c.f.u per mg of leaves fresh weight. Data presented are the means of three biological replicates and error bars represent the standard deviation. Data sets marked with asterisks are significantly different from control (water-pretreated leaves) as assessed by Student's *t* test ( $P < 0.001$ ).

The crosstalk between SA and JA, two pathways required for the resistance against biotrophic and necrotrophic pathogens respectively, has been well documented and several evidences have also shown that SA can antagonise JA and vice versa<sup>26</sup>. The

phytoalexin coronatine (COR) produced by *P. syringae* is required for full susceptibility to these bacteria in both *Arabidopsis* and tomato<sup>17</sup>. It is believed that one of the roles of COR is to mimic JA and promote disease symptom development of *P. syringae* biotrophic pathogen by down-regulating SA-inducible defence response pathways via a SA/JA antagonism<sup>27,28</sup>.

The fact that *B. cinerea* activates the SA pathway which is required against biotrophic pathogens and the presence of a biotrophic stage during the infection cycle of almost all the necrotrophic pathogens, suggest that this stage may have a biological significance. Our results clearly show that *B. cinerea* produces an EPS that acts as an elicitor of SA pathway which antagonises the JA pathway and allowed the fungus to establish its disease in tomato (Supplementary Fig. 5). The fact that the JA accumulation is induced in the same way by the two isolates of *B. cinerea*, suggests that the antagonism induced by B191, through its EPS, is downstream of the accumulation of JA. NPR1 (nonexpresser of PR-1 genes) and TGA-element binding protein family are very important for the SA signalling pathway<sup>29</sup>. It is also believed that these two regulators play a role in the antagonism between SA and JA by acting upstream of the JA synthesis<sup>30,31</sup>. *B. cinerea* may manipulate these actors to establish the antagonism between SA and JA signalling and causes disease in tomato; experimental evidences for this should be obtained in the future studies.

The ability of *B. cinerea* to manipulate the antagonistic effect between SA and JA, through the SA-induced EPS elicitor, distinguishes it from all other fungi, which as far as we are aware have not been reported to use this antagonism as a strategy to infect their hosts. It will be of interest to examine whether other necrotrophic pathogens are able to exploit this antagonism between SA and JA to cause or enhance their plant diseases. Our data present an important advance in understanding the strategies used by pathogens to manipulate their hosts. An exciting future challenge will be the biochemical and genetic elucidation of this suppression effect, which may have implications on our understanding of the strategies used by the necrotrophic pathogen *B. cinerea* to overcome the plant immune system and consequently establish its disease.



**Supplementary Fig. 6: Proposed model showing how *B. cinerea* manipulates the antagonistic effects between SA and JA to spread in its host, tomato.**

The resistance of tomato to *B. cinerea* requires the production of systemin which leads to the activation of JA signalling including the accumulation of proteinase inhibitors I and II. *B. cinerea* produces the exopolysaccharide  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan, which acts as an elicitor of SA. SA inhibits JA signalling, consequently *B. cinerea* causes disease in tomato by manipulating this antagonistic effect between SA and JA throughout  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan.

### **METHODS**

***B. cinerea* growth conditions.** *B. cinerea* wild-type isolates MEE B191 and MEE B8403 that were used for this study were provided by the Canadian Collection of Fungal Cultures (Agriculture and Agri-Food Canada / 960 Carling Avenue, Ottawa, Ontario, Canada, K1A0C6). The fungus isolates were sub-cultured as previously described<sup>8</sup>.

**Plant material.** *S. lycopersicum* Monomayker Cf0, *S. lycopersicum* Castlemart seeds were germinated and grown seeds were grown as previously described<sup>8</sup>. *Def 1*, prosystemin antisense and *Spr2* mutants, generously given by Drs Ryan and Howe respectively, were grown in the same manner.

**Plant inoculations.** Detached leaves from 5 weeks old tomato plants were inoculated as previously described<sup>8</sup>

For glucan treatments, leaves of 5 weeks old plants were sprayed with purified glucan (50 µg/mL) with 0.02% Silwet L-77 to reduce surface tension. For SA treatments, plants were watered with 0.05, 0.5 or 2.5mM of salicylic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and sprayed with the same solution containing 0.02% Silwet L-77. Control plants were watered with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and sprayed with this buffer containing 0.02% Silwet L-77. 24 hours later, detached leaves from mock-, SA- and glucan pretreated plants were infected with *B. cinerea* as previously described<sup>8</sup>.

For RT-PCRs experiments, the infection tests were carried out in planta; 5 weeks old plants were sprayed with the spores (10<sup>6</sup> spores/ml) of *B. cinerea* isolates B191 or B8403. The plants were then incubated in a growth chamber with high humidity. The same experiment was done with mock-, SA- and glucan-pretreated plants. The samples were then harvested for RNA extractions.

For bacterial growth, tomato plants were vacuum infiltrated with *Pseudomonas syringae* DC3000 (about 0.01 OD) suspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.02% Silwet. Bacterial leaf

populations were measured from three leaves per plants and three plants per treatment, three days after infiltration.

**Characterization of *B. cinerea* extracellular  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D glucan (EPS).**  $10^6$  spores/mL of isolates B191 or B8403 were cultivated in 80 mL of PDB (Potato Dextrose Broth) medium and the EPS was, purified and quantified at 0, 24, 48, 72 and 96 hours post-incubation, as previously described<sup>32</sup>.

Carbohydrate analysis of the EPS by TLC was performed after hydrolysis of the sample in 1 M HCl for 4 h at 100°C. The hydrolyzed sample was subjected to thin layer chromatography on silica gel G in butan-1-ol/ ethanol/ water (5:5:4 by vol) with three developments. Carbohydrates were detected by spraying the plate with a solution of 5% (v/v) sulfuric acid in ethanol followed by heating at 120 °C.

Monosaccharide composition of EPS was determined by gas chromatography (GC) after hydrolysis in 2M TFA at 121°C for 4 hs and further derivatization to alditol acetates. The hydrolysed samples were then injected into a Hewlett-Packard 5890A GC equipped with a flame-ionization detector and fitted with a fused-silica column (0.25 mm i.d. x 30 m) WCOT-coated with 0.20- $\mu$ m film of SP-2330. Chromatography was carried out at 220°C isothermally. Nitrogen was used as carrier at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The split ratio was 80:1. The injector and detector temperature was 240°C. Sugar assignation was confirmed by GLC-MS carried out on a GCMS-QP 5050A gas chromatograph/mass spectrometer (Shimadzu Corporation). Chromatography was performed on the SP-2330 capillary column run isothermally as previously indicated. The Helium total flow rate was 4.4 mL min<sup>-1</sup>, the head pressure 12 psi; the injector temperature 250°C and the split ratio 10:1. Mass spectra were recorded over a mass range of 30-600 atomic mass unit (Dalton), using the ionization potential of 70 eV.

For NMR analysis, <sup>13</sup>C HMQC determinations were carried out using a Bruker AM 500 spectrometer provided with a 5 mm probe at room temperature. The polysaccharide sample (15 mg) was dissolved in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. Spectra were done at 25°C. Chemical shifts are expressed in ppm ( $\delta$ ) relative to resonance of Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at  $\delta$  39.70 (<sup>13</sup>C) and 2.40

(<sup>1</sup>H). The major peak was pooled and lyophilized and re-suspended in water for further analysis.

For atomic force microscopy (AFM) imaging, the EPS was diluted to 1 ng/μl in milliQ water, and 20 μl of the mix was deposited onto freshly cleaved muscovite mica. After 2 to 5 min, the sample was gently washed with 0.5 ml milliQ water to remove molecules that were not firmly attached to the mica and blown dry with nitrogen. Tapping-mode AFM was performed using a Nanoscope III Multimode-AFM (Digital Instruments, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA) with a J-type piezoelectric scanner with a maximal lateral range of 120 μm. Microfabricated silicon cantilevers of 125 μm in length and a force constant of ~40 N m<sup>-1</sup> were used (NanoDevices, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA). Cantilever oscillation frequency was tuned to the resonance frequency of the cantilever (280 to 350 kHz). After a period of 15 to 30 min of thermal relaxation, initial engagement of the tip was achieved at scan size zero to minimize sample deformation and tip contamination. The images (512 by 512 pixels) were captured with a scan size of between 0.5 and 3 μm at a scan rate of 1 to 2 scan lines per s. Images were processed by flattening using Nanoscope software (Digital Instruments) to remove background slope.

**RT-PCR.** Total RNA was extracted using the Tri Reagent method according to the manufacturer's recommendation (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). RNA samples were treated with DNase Turbo DNA-free (Ambion) and reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). RT-PCR was performed by using the following primers:

For PI I, Forward primer GAGAAATGCTTCAACAGGGGGAAG. Reverse primer CACCTAATGCCTTTTCACATATGC;

For PI II, Forward primer ATGATTGCAACATGGAGAAAAAAGAG. Reverse primer ACAAGCCCTTTTCACCCC;

For Actin, Forward primer ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA. Reverse primer GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG;

For systemin, Forward primer ATGGGAACTCCTTCATATGA. Reverse primer CTAGAGTTTATTATTGTCTGTTTGC.

**SA and JA quantifications.** Tissues were reduced to a fine powder using a mortar and a pestle pre-cooled in liquid nitrogen. ~1g of the frozen powder was transferred to a pre-tared tube then mixed with 0.5 ml of cold 80% methanol. The mixture was alternatively vortexed and incubated on ice for 2-3h then centrifuged. The supernatant from each extract was transferred into new tube and used for further HPLC analyses. For HPLC analysis, a Waters 2690 separation module was used. This module is equipped with an autosampler and a Waters 996 photodiode array detector and a Waters 2475 multi  $\lambda$  fluorescence detector, and fitted with a 5  $\mu\text{m}$  LiChrospher® 100 RP-18 guard column (LiChroCART® 4-4) and a reverse-phase 5  $\mu\text{m}$  250-4 LiChrospher® 100 RP-18 column (LiChroCART® 4-4). Results were analyzed using Empower 2.0 Software. The column was eluted at a flow of 1 mL per min with a gradient using a solvent system composed of A: 0.1% *o*-phosphoric acid-acidified water and B: HPLC grade acetonitrile. The gradient used to carry the analysis was as follows: min/%A/%B = 0/100/0, 5/95/5, 10/95/5, 14/90/10, 20/80/20, 23/80/20, 30/65/35, 35/65/35, 43/50/50, 48/25/75, 55/0/100, 60/0/100. Injection volumes were 50  $\mu\text{L}$  per sample. Three replicates were used per treatment and every injection onto the HPLC was repeated twice.

Salicylic acid was detected in the samples based on the retention time and the characteristic UV spectra from the diode array and fluorescence detectors as well as after co-elution with a commercial standard. For fluorescence, an excitation of 290nm was used while spectra of emission were collected from 300 to 500nm to ensure the identity of the detected compounds. Quantification of SA was determined by comparing peak area of the emission measured at 400nm with reference to a standard curve established under the same conditions. This standard curve was generated using a dilution series of a commercial SA solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and injected on the HPLC in triplicates.

The presence of jasmonic acid in the extracts was confirmed using both TLC and HPLC analysis. For TLC, the extracts were separated on a silica gel plates (Silica gel plate,

SHGF<sub>254</sub>) using chloroform-methanol-water (6:3:1, v/v/v) mixture as a mobile phase. After the plates dried, they were stained under iodine vapor. JA was determined by reference to a commercial standard (Sigma-Aldrich Inc.) chromatographed under the same conditions or co-eluted with the samples. On HPLC, a standard curve was established under the same running conditions as the analyzed samples using a dilution series of the commercial standard of JA.

### REFERENCE

1. Jones, J.D. & Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9 (2006)
2. van Loon, L.C., Rep, M., & Pieterse, C.M. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 135-62 (2006).
3. Ryan, C.A. & Moura, D.S. Systemic wound signaling in plants: A new perception. *PNAS.* **99**, 6519-6520 (2002).
4. Grant, M. & Lamb, C. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 1-7 (2006)
5. Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* **140**, 249- 262 (2006).
6. Mao. P., Duan, M., Wei, C. & Li, Y. WRKY62 Transcription Factor Acts Downstream of Cytosolic NPR1 and Negatively Regulates Jasmonate-Responsive Gene Expression. *Plant Cell Physiol.* **48**, 833-842 (2007).
7. Koornneef, A. *et al.*, Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol.* **147**, 1358-68 (2008).
8. El Oirdi, M. & Bouarab. K. Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **175**:131-139 (2007).
9. Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G. & Ausubel, F.M. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* **35**, 193-205 (2003).
10. Abramovitch, R.B. & Martin, G.B. AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS microbiology letters* **245**, 1-8 (2005).

11. Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D. & Osbourn, A. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defenses. *Nature* **418**, 889–892 (2002).
12. Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803–814 (2006).
13. Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B. & Stebbins, C.E. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* **311**, 222–226 (2006).
14. Rigano L.A. et al. Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan Acts in Systemic Suppression of Plant Immune Responses. *Plant Cell* **19**, 2077–89. (2007).
15. Yun MH, et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol.* **141**, 178–187 (2006).
16. Zhou, J.M., Chai, J. Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr .Opin. Microbiol.* **11**, 179–8 (2008).
17. Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205–227 (2005).
18. Dangl, J.L. & Jones, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833 (2001).
19. Cuzick, A., Maguire, K. & Hammond-Kosack. K.E. Lack of the plant signalling component SGT1b enhances disease resistance to *Fusarium culmorum* in Arabidopsis buds and flowers. *New Phytologist* **10**, 1469–8137.2008.02712 (2009).
20. Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Mettraux, J.P., Broekaert, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103–2113. (1998).
21. Li, C., Liu, G., Xu, C., Lee, G.I., Bauer, P., Ling, H.Q., Ganai, M.W. & Howe, G.A. The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 Gene Encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of basmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell* **15**, 1646–1661. (2003)
22. AbuQamar, S., Chai, M., Luo, H., Song, F. & Mengiste, T. Tomato Protein Kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell* **20**, 1964–1983 (2008).

23. Stahmann KP, *et al.* Structural properties of native and sonicated cinerean, a beta-(1-3) (1-6)-D-glucan produced by *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* **266**, 115-28. (1995).
24. Carbonero, E.R., & *et al.* A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydr. Polym.* **66**, 252-257 (2006).
25. Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B. & Fritig, B. Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **124**, 1027-1037 (2000).
26. Koornneef, A. & Pieterse, C.M.J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol.* **146**, 839–844 (2008).
27. Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H. & Kunkel, B.N. The Arabidopsis thaliana JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 789-800 (2006).
28. Uppalapati, S.R., *et al.* The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 955-65. (2007).
29. Durrant, W.E. & Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185–209 (2004).
30. Yuan Y, *et al.* Functional analysis of rice *NPRI*-like genes reveals that *OsNPRI/NHI* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol. J.* **5**, 313-324 (2007).
31. Ndamukong, I., Abdallat, A.A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R. & Gatz, C. SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* **50**: 128-139 (2007).
32. Dubourdieu, D., Riberau-Gayon, P. & Fournet, B. Structure of the extracellular  $\beta$ -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr. Res.* **93**, 294-299. (1980).

**Acknowledgements,** We thank Drs Ryan and Howe for providing JA synthesis mutants and tomato plants expressing antisense prosystemin. We thank Dr Rocio Gonzalez-Lamothe for constructive criticism of the manuscript. This work is supported by the

National Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canadian Foundation for Innovation.

**Author Contributions**, M.E.O. and K.B. designed experiments and wrote the manuscript. M.E.O. performed all experiments. L.R., A.V. and C.R. performed EPS purification and characterisation. A.E.H. and F.D. performed SA and JA quantification. K.B. initiated and directed the study.

**Competing interests statement** , The authors declare that they have no competing financial interests.

*Correspondence and requests for materials should be addressed to K.B. (e-mail: [Kamal.Bouarab@Usherbrooke.ca](mailto:Kamal.Bouarab@Usherbrooke.ca)).*

## CHAPITRE 3

### LA RÉSISTANCE DES PLANTES DE TABAC À *BOTRYTIS CINEREA* DÉPEND DES CULTIVARS ET DU STADE DE VIE DE L'AGENT PATHOGÈNE

#### Préambule

Pour se protéger, les plantes ont développé des moyens de défense constitutifs ou induits en réponse à la présence d'un agent pathogène. Parmi ces mécanismes de défense les plantes accumulent des molécules antimicrobiennes comme les phytoalexines ou les protéines reliées à la pathogénèse (protéines PR). Les phytoalexines sont des composés de petit poids moléculaire, lipophiles et antimicrobiens qui s'accumulent rapidement autour des sites de nécrose. Les protéines PR sont des marqueurs de défense induits rapidement chez les plantes résistantes à certains agents pathogènes. Ces protéines sont très stables en milieu acide et résistent à l'action des protéases produites par la plante ou l'agent pathogène pendant l'interaction. Ces caractéristiques leur confèrent une grande stabilité dans la vacuole et dans les espaces intercellulaires occupés par les agents pathogènes. En contrepartie, pour contourner l'effet antimicrobien des métabolites secondaires sécrétés par la plante hôte, certains agents phytopathogènes métabolisent ces phytoalexines et compromettent leurs activités biologiques.

Dans notre étude nous avons montré que *B. cinerea* induit l'accumulation d'une phytoalexine, la scopolétine, dans une espèce et un cultivar de tabac (*N. sylvestris* et *N. tabacum* cv Petit Havana). Cette accumulation est corrélée avec la résistance contre cet agent pathogène. La scopolétine inhibe la germination des spores de *B. cinerea*, mais non la croissance de son mycélium. Nous avons montré aussi que le mycélium et non les spores, de *B. cinerea* est capable de détoxifier ou dégrader la scopolétine. Par ailleurs, les spores et non le mycélium, induisent une forte accumulation des PR protéines. La résistance du cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana à *B. cinerea* dépend du type d'inoculum. En effet le cultivar est moins résistant au mycélium qu'aux spores de *B. cinerea*. Cette différence au niveau de la résistance est corrélée avec le métabolisme de la

scopolétine et l'inhibition de l'accumulation des protéines PRs induit par le mycélium à la différence des spores. Les différents résultats obtenus nous laissent suggérer que *B. cinerea* sous sa forme mycéliale utilise une stratégie sophistiquée pour contourner l'effet antimicrobien de ce métabolite secondaire sécrété par la plante hôte.

J'ai effectué la totalité des procédures expérimentales reliées aux travaux présentés dans cet article, à l'exception des résultats présentés dans les deux figures concernant les PR protéines que la stagiaire Adeline Trapani m'a aidé à réaliser. J'ai également participé activement à la rédaction du manuscrit. Le Dr Kamal Bouarab a participé activement à la conception des expériences et à la rédaction de l'article.

**Resistance of tobacco to *Botrytis cinerea* is cultivar and pathogen's stage dependent**

**Mohamed El Oirdi, Adeline Trapani, Kamal Bouarab**

Centre de Recherche en Amélioration Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, 2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke (Québec), J1K2R1, Canada

Author for correspondence: Kamal Bouarab Tel: +1 819 8217070 Fax: +1 819 8218049  
Email: Kamal.Bouarab@USherbrooke.ca

### Summary

- To protect themselves, plants have developed an armoury of defences expressed in response to the presence of a pathogen or related situations. It is known that the plants respond to pathogen attack by the production of pathogenesis-related proteins and the accumulation of antimicrobial molecules like phytoalexins.
- Here we report that resistance of tobacco to *B. cinerea* is cultivar specific. *Nicotiana tabacum* cv Petit Havana but not *N. tabacum* cv Xanthi or cv samsun is resistant to *B. cinerea*. This resistance is correlated with the accumulation of the phytoalexin scopoletin and pathogenesis-related (PR) proteins. We also show that this resistance depends on the type of *B. cinerea* inoculum. *N. tabacum* cv Petit Havana is more resistant to spores but not mycelium inoculum of *B. cinerea*. This reduction of *N. tabacum* cv Petit Havana resistance to the mycelium compared to the spores is correlated with the suppression of the accumulation of PR proteins and the capacity of the mycelium but not the spores to metabolize the scopoletin.
- These data present an important advance in understanding the strategies used by *B. cinerea* to establish its disease on tobacco plants.

### **Introduction**

Plants have evolved both general and highly specialized defence mechanisms that function to handle the diseases caused by the invading microbial pathogens (Dangl & Jones, 2001; Staskawicz *et al.*, 2001). The general or basal defence is driven by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as flagellin, oligosaccharides and peptides, however the highly specialized defence is governed by the gene for gene system (Dangl & Jones, 2001). In contrast to the PAMPs, the resistance induced by specific elicitors appeared to be plant cultivar-specific (Nürnbergger *et al.*, 2004).

The simplest mechanistic explanation of the gene for gene model is that plant resistance is due to the direct or indirect specific interaction between a pathogen Avr (avirulence) protein and the corresponding plant disease resistance (*R*) counterpart (Dangl & Jones, 2001, Staskawicz *et al.*, 2001). If one of these two actors is inactive or absent, disease occurs (Flor, 1971). The defence responses due to the recognition of general or specific elicitors often include the induction of pathogenesis related proteins (PR) and production of phytoalexins which have antimicrobial activities (Van Loon and Van Strien, 1999; Thomma *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Gachon *et al.*, 2004; Narasimhan *et al.*, 2005). Experiments in which levels of phytoalexins in plants have been altered, either by the generation of mutants or by transformation-mediated manipulation of gene expression, have provided evidence to link phytoalexins with disease resistance (Hain *et al.*, 1993; Glazebrook & Ausubel, 1994; Glazebrook *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 1998). Genetic analysis of plants impaired in camalexin biosynthesis revealed that this phytoalexin is important for resistance against several necrotrophic fungi (Thomma *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 2004; Glawischnig *et al.*, 2004). Scopoletin is the major phytoalexin in tobacco plants. This compound is well known to display antimicrobial properties *in vitro* (Valle *et al.*, 1997) and accumulates in tobacco plants responding to pathogens and elicitors (Chong *et al.*, 2002; Matros & Mock, 2004).

PR proteins have been reported to enhance resistance to several pathogens (Fritig *et al.*, 1998). Transgenic plants overexpressing the *PR-1a* gene exhibited increased tolerance to

the oomycete pathogens *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Peronospora tabacina* (Alexander *et al.*, 1993). Tomato PR-1 strongly inhibited not only the germination of *Phytophthora infestans* zoospores, but also development of symptoms on the surface of leaf disks infected with this oomycete pathogen (Niderman *et al.*, 1995). Overexpression of a pepper basic PR-1 proteins in tobacco plants enhanced tolerance to the oomycete pathogen *Phytophthora nicotianae*, and the bacterial pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* (Sarowar *et al.*, 2005)

The fungus *Botrytis cinerea* is a necrotrophic plant pathogen that colonizes senescent or dead plant tissues and causes softening in fruits. Fungal hyphae can penetrate through wounds, natural openings, of the plant tissue or directly and spread from previously colonized dead tissues into healthy ones (El Oirdi & Bouarab, 2007). *B. cinerea* attacks different plant tissues and has a broad host range (Mansfield, 1980). It is a major cause of post-harvest rot of perishable plant products, including grapes, tomato, potato, strawberry and tobacco. Because it is also able to infect at low temperatures, it can result in important economic losses, either in pre- and post-harvest crops (Mansfield, 1980). Several virulence factors required for its pathogenicity on different hosts have been described (Ferrari *et al.*, 2003b). *B. cinerea* synthesizes extracellular enzymes that degrade pectin, the major component and the most complex polysaccharide in the plant cell wall, which allows its growth inside the plant (Wubben *et al.*, 1999; Rha *et al.*, 2001; ten Have *et al.*, 2001; Cabanne & Doneche, 2002; Poinssot *et al.*, 2003; Soulie *et al.*, 2003; Kars *et al.*, 2005). *B. cinerea* can also elicit the production of trans-resveratrol in grapevines (Langcake & Pryce, 1977; Langcake & McCarthy, 1979). Recent studies have shown that trans-resveratrol is fungitoxic at physiological concentrations against *B. cinerea* (Iriti *et al.*, 2004; Bru *et al.*, 2006). Here we report that the resistance of tobacco to *B. cinerea* is cultivar dependent. *B. cinerea* induces the accumulation of scopoletin and PR proteins in the resistant cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana. We also show that this resistance depends on the type of *B. cinerea* inoculums. *N. tabacum* cv Petit Havana is more resistant to spores but not mycelium inoculums of *B. cinerea*. This reduction of *N. tabacum* cv Petit Havana resistance to the mycelium compared to the

spores is correlated with the suppression of the accumulation of PR proteins and the capacity of the mycelium but not the spores to metabolize the scopoletin.

### **Materials and methods**

#### **Plant material, fungal isolates and plant inoculations**

*N. sylvestris*, *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* cv Samsun, *N. tabacum* cv Xanthi and *N. tabacum* cv Petit Havana seeds were grown as previously described (El Oirdi & Bouarab, 2007).

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr. isolate MEE B191 (B191) used for this study was previously described (El Oirdi & Bouarab, 2007). For pathogenicity tests and statistical analysis, detached leaves of 30 day-old plants were laid on Petri dishes containing two blotting filter papers (Whatman, Schleicher & Schuell, Ottawa, Canada) wetted with sterile water, then spotted with 10  $\mu$ l spore suspension ( $10^6$ ,  $10^7$  or  $10^8$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of PDB, difco Potato Dextrose Broth, medium) or 5-mm-diameter agar plugs containing actively growing hyphae of *B. cinerea* (3 days old). Petri dishes were then incubated at 22°C at high humidity in glass trays covered with polyethylene wrap. All plant inoculations involved a minimum of three leaves from each of three plants, and each experiment was carried out at least three times. The disease caused by *Botrytis* was assessed in detached leaves 4 days postinoculation (dpi), by measuring the necrosis diameter induced by the spores or the mycelium plugs.

#### **Mycelium growth**

Several concentrations of scopoletin (Sigma, 0, 100, 300 or 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) dissolved at 1% final concentration of DMSO were added to PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) medium. Plugs of 3 day-old *B. cinerea* mycelium (5 mm of diameter) grown in the PDA medium were then cut with a sterile needle from working plates of the 191 isolate and inoculated into the centre of each agar plates containing different concentrations of scopoletin. Solvent-only control plates were prepared in the same manner. The plates were kept at

22°C for three days. Photographs were taken three days after treatments. The radial growth of the fungus was also measured.

### **Spore Germination Assay**

Spore germination in the presence of the same concentrations of scopoletin described above was assessed in 96-well microplates, in clarified PDB medium. Scopoletin dissolved in DMSO (1% final concentration) was added in each well together with spores ( $4 \cdot 10^5$ ), in triplicate, in a total volume of 100  $\mu$ l, and the plates were kept at 22°C and darkness for 8 hours. DMSO-only with spores were prepared in the same manner, as a control. The plates were observed in a microscope (Carl Zeiss Axio Imager M1 Mot, Québec, Canada), and for each treatment several pictures were acquired with a charge-coupled device camera (Carl Zeiss Axiocam MRC High Resolution Color Digital Camera, 1300 X 1030 Pixels, Québec, Canada). The spores were also subsequently assessed for germination status. Spores with germ tubes longer, or as long than the spore, were counted as being germinated. The length of germ tubes were measured by using Axiovision LE Rel 4.5 software (Carl Zeiss, Québec, Canada)

### **Scopoletin-Detoxifying enzyme Assay**

Five plugs of mycelium (5 mm of diameter) or  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *B. cinerea*, as described above, were added to 10 ml of PDB medium and supplemented with 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin and incubated at 22°C in darkness with rotary shaking at 120 rpm. As a control, solvent-only with spores and mycelium or scopoletin-only without the fungus, were prepared in the same manner. One ml was taken at 0, 3, 6 and 9 hours after treatments, visualized under UV light and subjected to TLC to detect the presence of scopoletin.

### **Precipitation of *B. cinerea* extracellular proteins**

50 plugs of mycelium (5 mm of diameter) *B. cinerea* prepared as described above were added to 250 ml of PDB medium and incubated at 22°C in darkness with rotary shaking

at 120 rpm for 36 hours. The culture was filtered and centrifuged at 4,000 x g for 30 min and the supernatant was used to precipitate the extracellular proteins by adding the ammonium sulphate (30%) to the filtrate. The proteins were then pelleted by centrifugation at 12,000 x g for 30 min. Proteins were resuspended into 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 10% glycerol. The protein solution was desalted with the same buffer and concentrated by ultrafiltration with an Amicon Ultra 50,000 NMWL device (Millipore). Fourty microliter of these extracellular proteins was added to the spore suspension ( $160 \mu\text{l}$  at  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) and  $10 \mu\text{l}$  was used for infection. As a control the buffer was added in stead of the extracellular proteins. Detached leaves from 4 weeks old *N. tabacum* cv Petit Havana plants were inoculated as described above.

#### **Secondary Metabolites Extraction and Characterization**

Phenolic compounds were extracted from infected leaves as described previously with some modifications (Daayf *et al.*, 1997). Briefly, leaves inoculated with 6 drops of spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) were weighed and ground in 80% HPLC-grade MeOH ( $10 \text{ ml g}^{-1}$  fresh weight) and samples incubated in dark on a rotary shaker at  $20^\circ\text{C}$  for 30 min. The methanolic extracts were filtered, and the residue was washed with 10 ml 80% methanol. Chlorophyll, lipids, and waxes were removed by partitioning against light petroleum ether three times. The methanolic fraction containing the phenolic constituents was roto-evaporated, and the aqueous residue was partitioned three times with ethyl acetate. The final ethyl acetate concentrated extracts were separated on 0.2-mm thin layer chromatography (TLC) silica gel plates (60 Å Partisil K6F with Fluorescent indicator, Chromatographic Specialties Inc, Ontario, Canada) using chloroform/methanol/water (65:30:05) as a mobile phase. The blue-autofluorescent bands were scraped from the TLC plates and extracted with ethyl acetate. The compounds were further concentrated by evaporating the ethyl acetate and resuspended in DMSO. These fractions were then used for HPLC analysis on a Dionex DX-500 chromatography system (ED40 Electrochemical Detector, AD20 Absorbance Detector) equipped with an autosampler and fitted with a column IonPac® NG1 Guard and NS1 Separator. Results were analyzed using Chromeleon Software, version 6.60. The column was eluted at a flow of 1 ml per min

with 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 30% Acetonitrile and 70% water. Acid hydrolysis of the FC2 fraction was performed as described previously (Daayf *et al.*, 1997).

### **Protein gel blot analysis**

Total proteins were extracted from 100 to 200 mg of homogenate of frozen leave in 200 µl of extraction buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 5 mM dithiothreitol (DTT)] and a protease inhibitor cocktail (Sigma). The crude extract was centrifuged at 13000 rpm for 20 min. The supernatant was equilibrated in the same buffer and boiled for 5 min. Fifty micrograms of protein of each sample were used for western blotting analysis. Proteins were subjected to gel blot analysis using a rabbit polyclonal anti-acidic, -basics PR3 or PR5 antibodies, at a dilution of 1:8000 (Cordelier *et al.*, 2003). Equal samples of proteins were loaded in 12% SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and the protein quantification was visually confirmed by Ponceau Red staining for each PVDF membrane following protein transfer. Horse Radish Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG were used as secondary antibody (1/10000). Immunodetection was conducted with chemiluminescent substrate (Bio-Rad, immun-star kit) and exposition to X-ray films.

### **Results**

#### **Inoculations of *Nicotiana* cultivars and species with the necrotrophic pathogen *B. cinerea***

*B. cinerea* is an important plant pathogen with a broad host range including the Solanaceous species, potato, tomato and tobacco. To determine whether some *Nicotiana* species are resistant to *B. cinerea*, we examined the interaction between *B. cinerea* isolate B191 and several cultivars and species of *Nicotiana* by using a well-defined virulence bioassay (see material and methods). Ten microlitres of spore suspension (10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup>) from *B. cinerea* isolate B191 were inoculated on leaves of the tobacco species and cultivars representing the species *N. sylvestris*, *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* cv Samsun, *N. tabacum* cv Xanthi and *N. tabacum* cv Petit Havana. The disease was

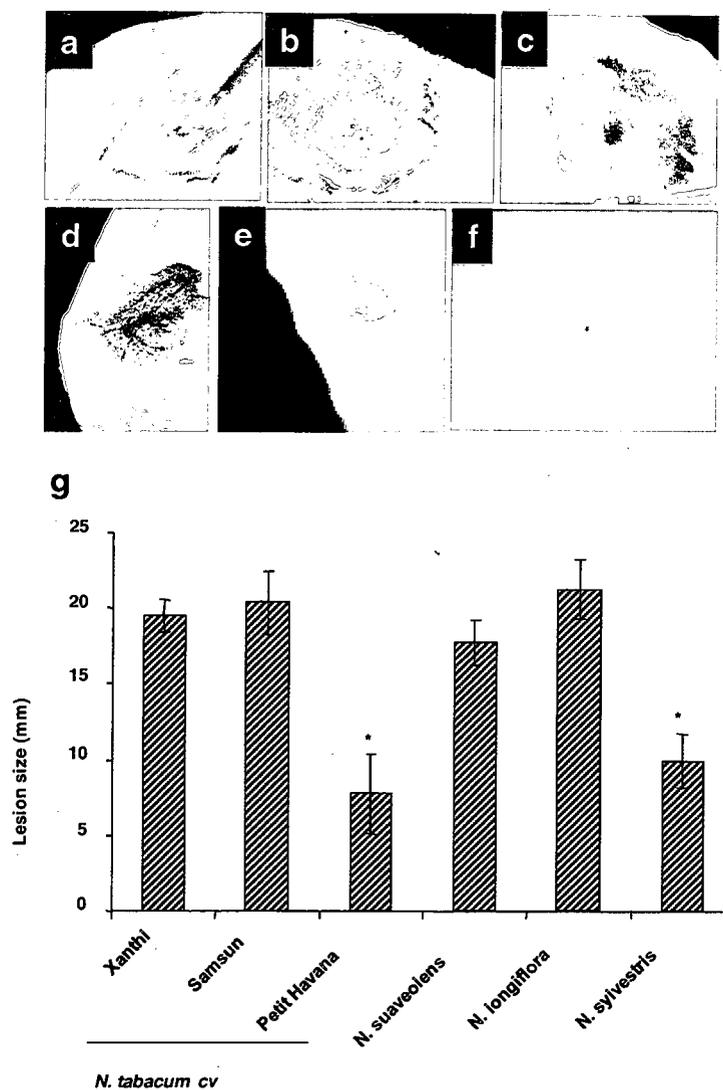
analysed 4 dpi. Inoculations of the host plants *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* Samsun and *N. tabacum* cv Xanthi, consistently yielded expanding disease lesions (Fig. 1a-d). In contrast, lesion expansion was not observed after inoculation of *N. sylvestris* and *N. tabacum* Petit Havana (Fig. 1e and 1f). The severity of the disease was quantified by measuring the diameter of the necrotic lesion. The susceptible cultivars showed similar severity of the disease with a necrosis diameter around 20 mm after four days (Fig. 1g). However, *N. sylvestris* species and *N. tabacum* cv Petit Havana cultivar showed a significant decrease of the necrotic lesion (around 8 mm, Fig. 1g). These results demonstrate the existence of resistance to *B. cinerea* isolate B191 in *Nicotiana* spp (*N. sylvestris* and *N. tabacum* Petit Havana). These data demonstrate also that the resistance to *B. cinerea* among the *N. tabacum* cultivars is restricted to only one of the tested cultivars; this specificity may have a biological significance.

#### ***B. cinerea* induces the accumulation of scopoletin and pathogenesis-related (PR) proteins in the resistant cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana**

Secondary metabolites are known to accumulate around infection sites in resistant plants (Thomma *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2002; Matros & Mock, 2004; Yang *et al.*, 2004; Prats *et al.*, 2006). Some of those compounds are autofluorescent under UV illumination (Chong *et al.*, 2002; Matros & Mock, 2004). This leads us to test whether the resistance of *N. sylvestris* and *N. tabacum* Petit Havana plants to *B. cinerea* is correlated with the accumulation of those compounds around the sites of infections.

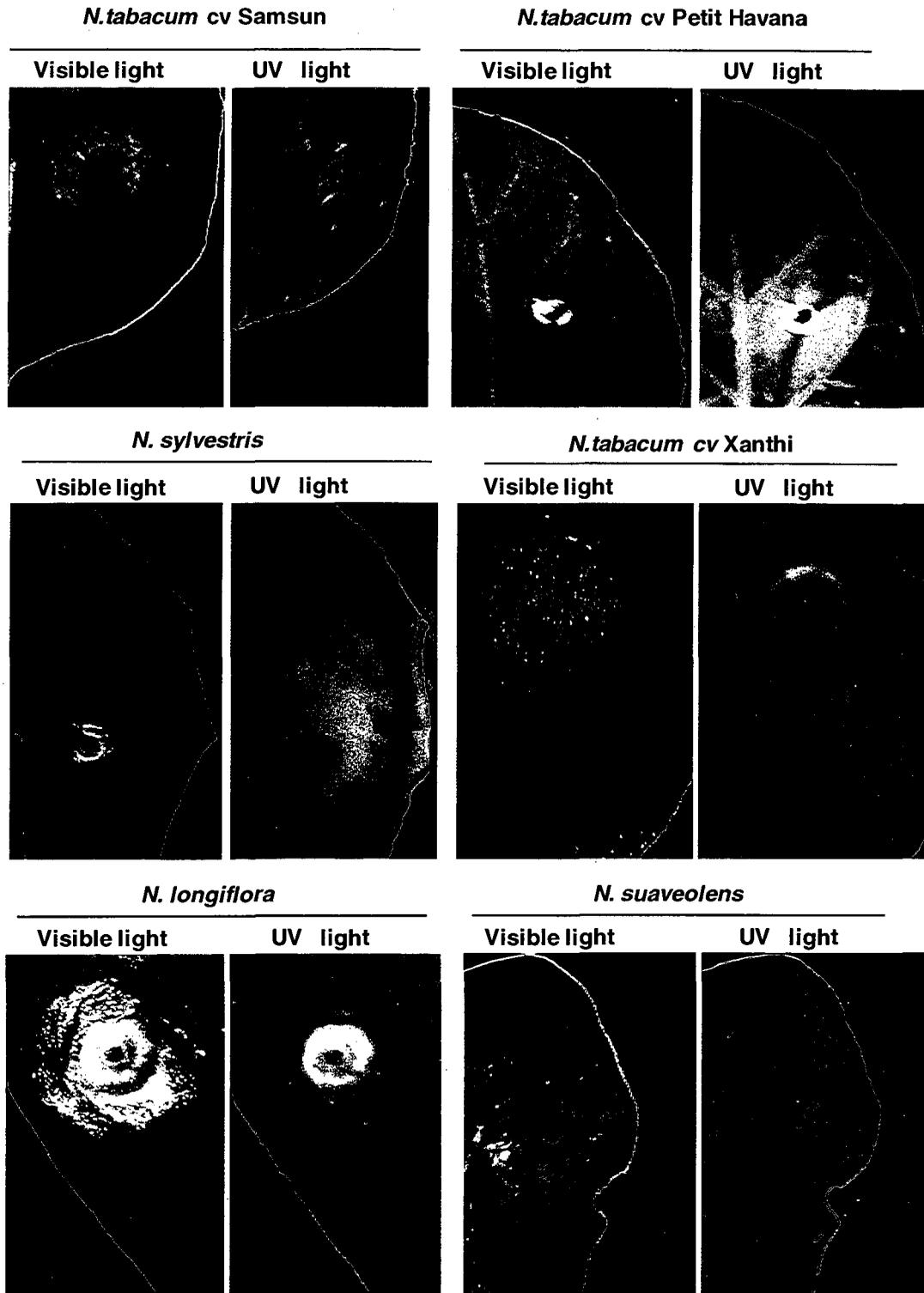
The different *Nicotiana* species or cultivars (*N. sylvestris*, *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* Samsun, *N. tabacum* cv Xanthi and *N. tabacum* cv Petit Havana) were infected by *B. cinerea* ( $10^6$  spores ml<sup>-1</sup>) followed by UV illumination (365nm) four days after inoculation. As shown in figure 2 the two resistant plants, *N. sylvestris* and *N. tabacum* Petit Havana, showed a high accumulation of blue autofluorescent compounds around the infection sites. However the susceptible plants (*N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* Samsun and *N. tabacum* cv Xanthi) did not accumulate any significant blue autofluorescent compounds around the inoculation areas (Fig. 2). This result suggests that

the resistance of *Nicotiana* species or cultivars to *B. cinerea* is correlated with the accumulation of blue autofluorescent compounds around the infection sites.



**Fig. 1: *B. cinerea* symptoms in tobacco cultivars.**

Leaves from *N. sylvestris* (a), *N. longiflora* (b), *N. suaveolens* (c), *N. tabacum* cv Samsun (d), cv Xanthi (e) and cv Petit Havana (f) were infected by a drop (10  $\mu$ l) of spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) and incubated for four days when photographs were taken. Data shown are representative of three independent experiments. G, Size of lesions formed in leaves four days after inoculation with *B. cinerea* isolate B191. Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Data sets marked with an asterisk (*N. sylvestris* and *N. tabacum* cv Petit Havana leaves) are significantly different from the *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* cv Samsun and *N. tabacum* cv Xanthi leaves as assessed by the Student's t-test.



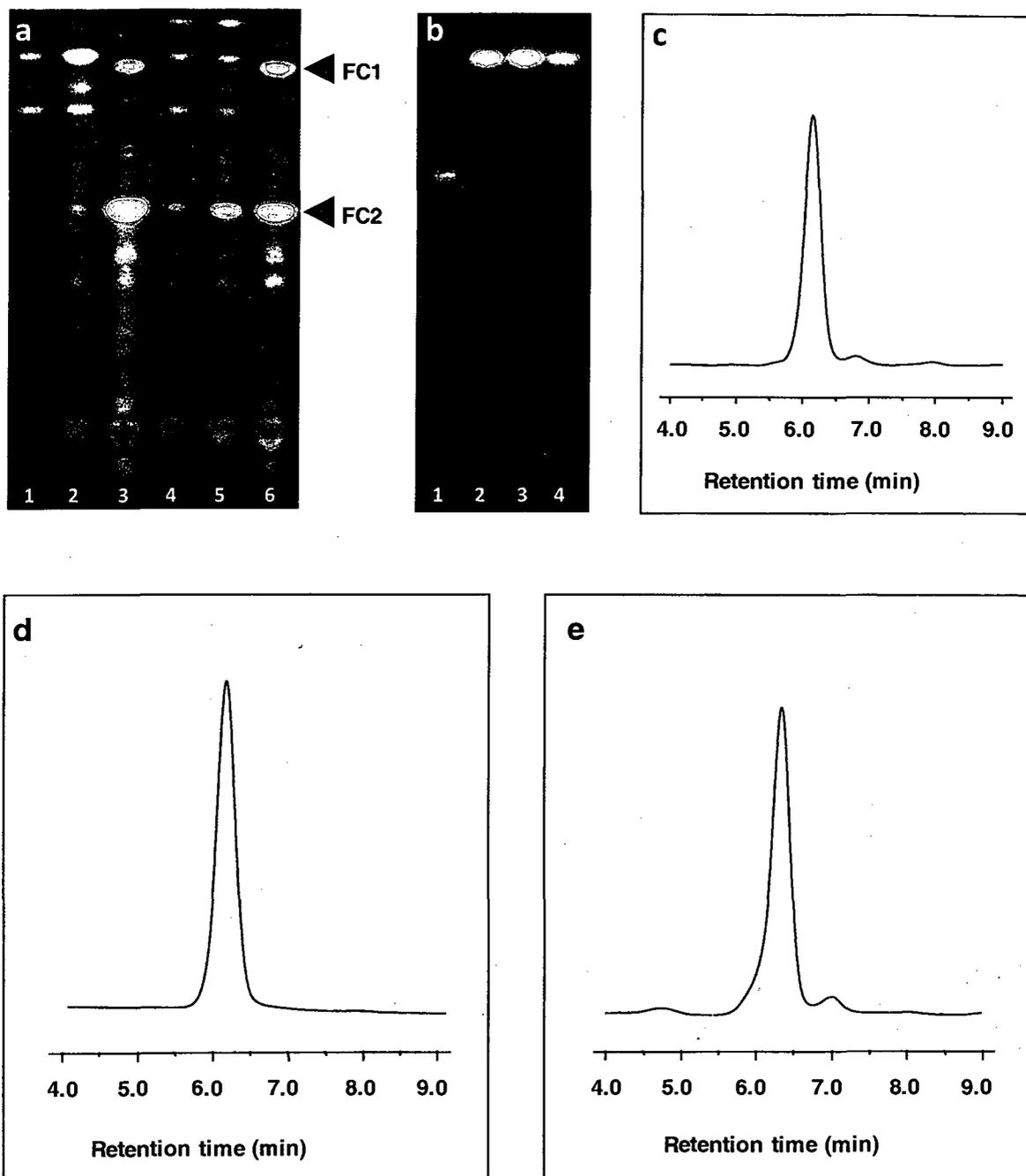
**Fig. 2: Resistant tobacco cultivars to *B. cinerea* accumulate blue UV-autofluorescent compounds.**

Leaves from *N. sylvestris*, *N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* cv Samsun, *N. tabacum* cv Xanthi and *N. tabacum* cv Petit Havana were infected with a drop (10  $\mu$ l) of

spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) and then incubated for four days when photographs were taken under visible and UV light. Data shown are representative of three independent experiments.

To determine the nature of the fluorescent compounds, methanol extraction was performed and the products were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Two major blue auto-fluorescent compounds were found on our TLC analysis (FC1 and FC2 for fluorescent compound 1 and 2; Fig. 3a). These compounds accumulated at high levels in the resistant cultivars (Fig. 3a). FC1 and FC2 were extracted from the TLC plate and further analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; Fig. 3b-e). Scopoletin is a blue autofluorescent compound that accumulated in *Nicotiana* species after pathogen elicitation (Chong *et al.*, 2002; Matros & Mock, 2004). Thus we investigated whether FC1 and FC2 correspond to free and conjugated scopoletin. The analysis of pure commercial scopoletin was performed as a control. TLC and HPLC experiments showed that FC1 corresponded to free scopoletin (Fig. 3b-d) and acid hydrolysis experiments indicated that FC2 was a conjugated form of scopoletin (Fig. 3b and 3e). The identification of FC1 and FC2 as being free and conjugated scopoletin, respectively, was also confirmed using GC-MS (data not shown).

As *N. tabacum* cultivar cv Petit Havana but not the cultivar Xanthi is resistant to *B. cinerea*, we used this two cultivars to do kinetics of the accumulation of two plant immune markers, the scopoletin and PR proteins. The two cultivars *N. tabacum* cv Xanthi (susceptible cultivar) and *N. tabacum* Petit Havana (resistant cultivar) were inoculated with spores ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) from *B. cinerea* isolate B191 and samples were harvested at different times after infection in order to see the accumulation of PRs proteins and to quantify the scopoletin as explained in the material and methods.



**Fig. 3: UV-fluorescent compounds induced by *B. cinerea* in tobacco correspond to free and conjugated-scopoletin**

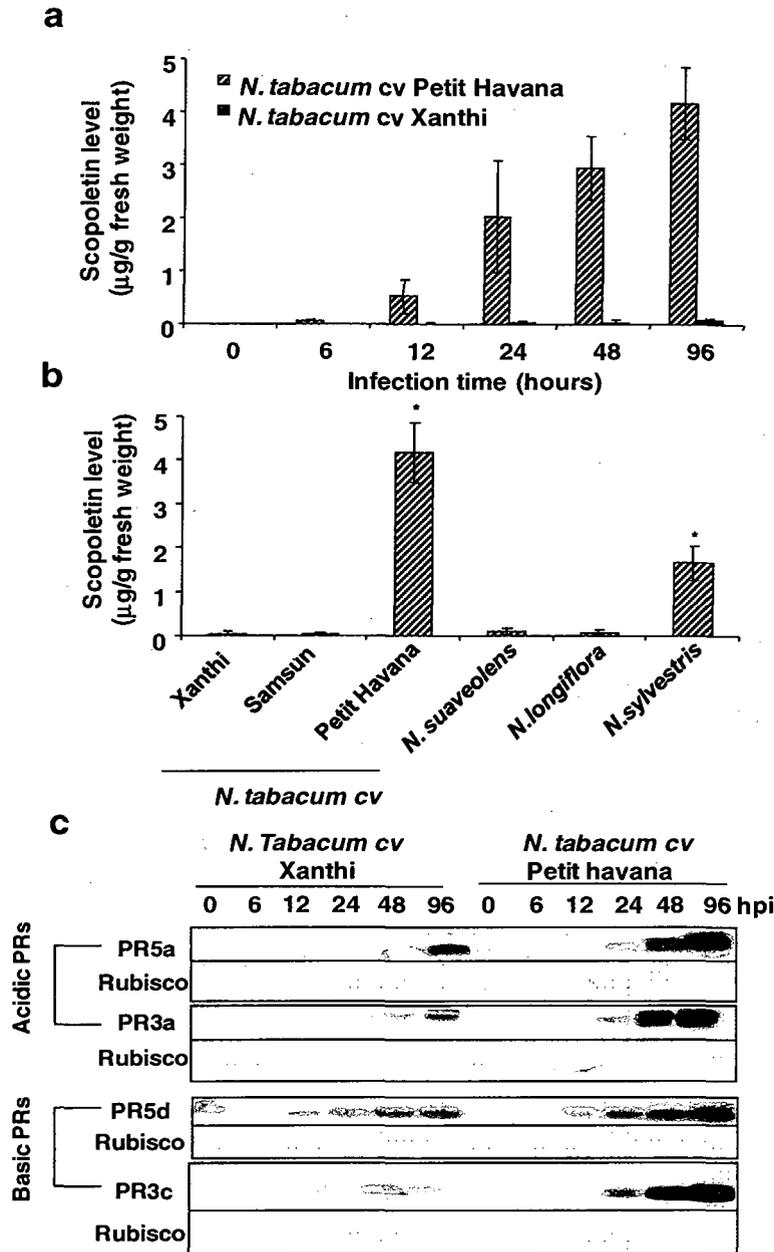
**a**, TLC, visualised under UV light, of methanolic extracts from *N. tabacum* cv Xanthi (1), *N. tabacum* cv Samsun (2), *N. sylvestris* (3), *N. suaveolens* (4), *N. longiflora* (5) and *N. tabacum* cv Petit Havana (6) leaves four days after infection with  $10^6$  spore suspension  $\text{ml}^{-1}$  ( $10 \mu\text{l}$ ) of *B. cinerea* isolate B191. **b**, TLC, seen under UV light, of purified FC2 (1), FC1 (2), commercial scopoletin (3) and FC2-hydrolysis product (4). HPLC profiles of FC1 compound (c), commercial scopoletin (d) and FC2-hydrolysis product (e). Data shown are representative of three independent experiments.

Figure 4a shows that, in leaves of *N. tabacum* Petit Havana inoculated with *B. cinerea*, scopoletin was first detected at 12 hours and increased with the time of infection. In contrast leaves of *N. tabacum* cv Xanthi inoculated with *B. cinerea* did not show any significant accumulation of scopoletin (Fig. 4a). We then quantified the scopoletin levels in the other species and cultivars four days post inoculation. In contrast to the two resistant plants (*N. tabacum* Petit Havana and *N. sylvestris*), the susceptible plants (*N. tabacum* cv Xanthi, *N. tabacum* cv Samsun, *N. suaveolens* and *N. longiflora*) showed a very small accumulation of scopoletin (Fig. 4b). This result suggests that the resistance of *N. tabacum* Petit Havana and *N. sylvestris* to *B. cinerea* isolate B191 is consistent with the high accumulation of the antimicrobial scopoletin.

We then examined the accumulation of the acidic and basic PR3 and PR5 proteins in leaves of *N. tabacum* cv Xanthi or cv Petit Havana inoculated with *B. cinerea* spores. Our results showed that the basic and acidic isoforms of PR3 and PR5 were highly accumulated in *N. tabacum* cv Petit Havana in response to the infection by the spores of *B. cinerea*. However this accumulation was not significant in the susceptible cultivar, *N. tabacum* cv Xanthi, in response to the infection by the spores of the fungus (Fig.4c). These results suggest that the resistance of *N. tabacum* cv Petit Havana to *B. cinerea* is correlated not only with the induction of the scopoletin but also with the accumulation of PR proteins.

### **Scopoletin has an antimicrobial effect on *B. cinerea* spores**

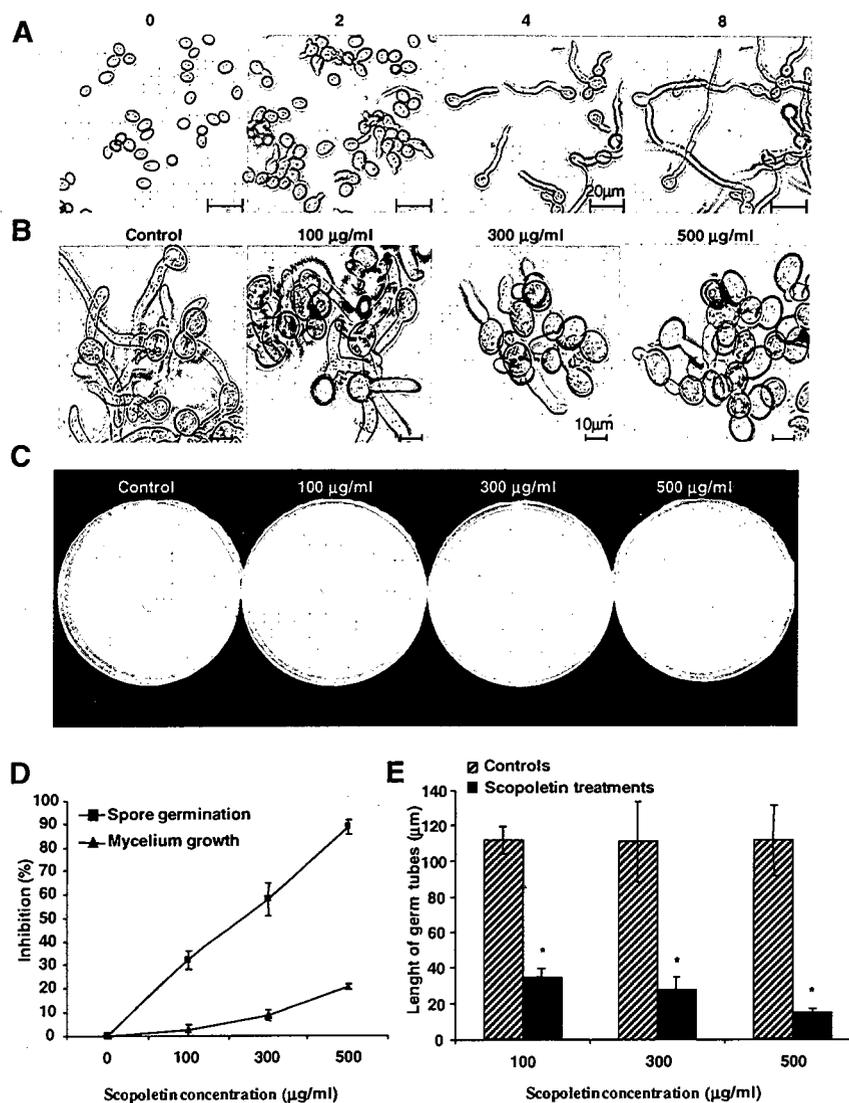
The phytoalexin scopoletin is known to have antioxidant and antimicrobial activities against a broad range of plant pathogens (Boveris *et al.*, 1977; Ahl-Goy *et al.*, 1993; Costet *et al.*, 2002; Gachon *et al.*, 2004; Gomez-Vasquez *et al.*, 2004; Prats *et al.*, 2006).



**Fig. 4: The accumulation of scopoletin and PR proteins is correlated with resistance of tobacco to *B. cinerea***

**a**, Kinetics of scopoletin accumulation were determined at the indicated time points in leaves of *N. tabacum* cv Petit Havana (resistant cultivar) and *N. tabacum* cv Xanthi (susceptible cultivar) inoculated with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  of *B. cinerea* isolate B191 (drop of 10  $\mu\text{l}$ ). Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. **b**, Scopoletin levels in all cultivars used in this study 4 days after infection with  $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  (drop of 10  $\mu\text{l}$ ) of *B. cinerea* isolate B191. Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Data sets marked with an asterisk (resistant cultivars, *N. tabacum* Petit Havana and *N. sylvestris*) are significantly different from the

susceptible cultivars (*N. longiflora*, *N. suaveolens*, *N. tabacum* cv Samsun and *N. tabacum* cv Xanthi) as assessed by the Student's t-test. **c**, PR proteins accumulation after inoculation of *N. tabacum* cv Petit Havana and cv Xanthi plants with *B. cinerea*. Proteins were extracted 0, 6, 12, 24, 48 and 96 hours post infection of *N. tabacum* cv Petit Havana and cv Xanthi with spores suspension ( $10^6$  spores  $ml^{-1}$ ) of *B. cinerea*. Western blots were carried out by using acidic and basic anti-PR3 and PR5 as described previously (Cordelier *et al.*, 2003). Rubisco shows the equal amount of the proteins in all the experiments.

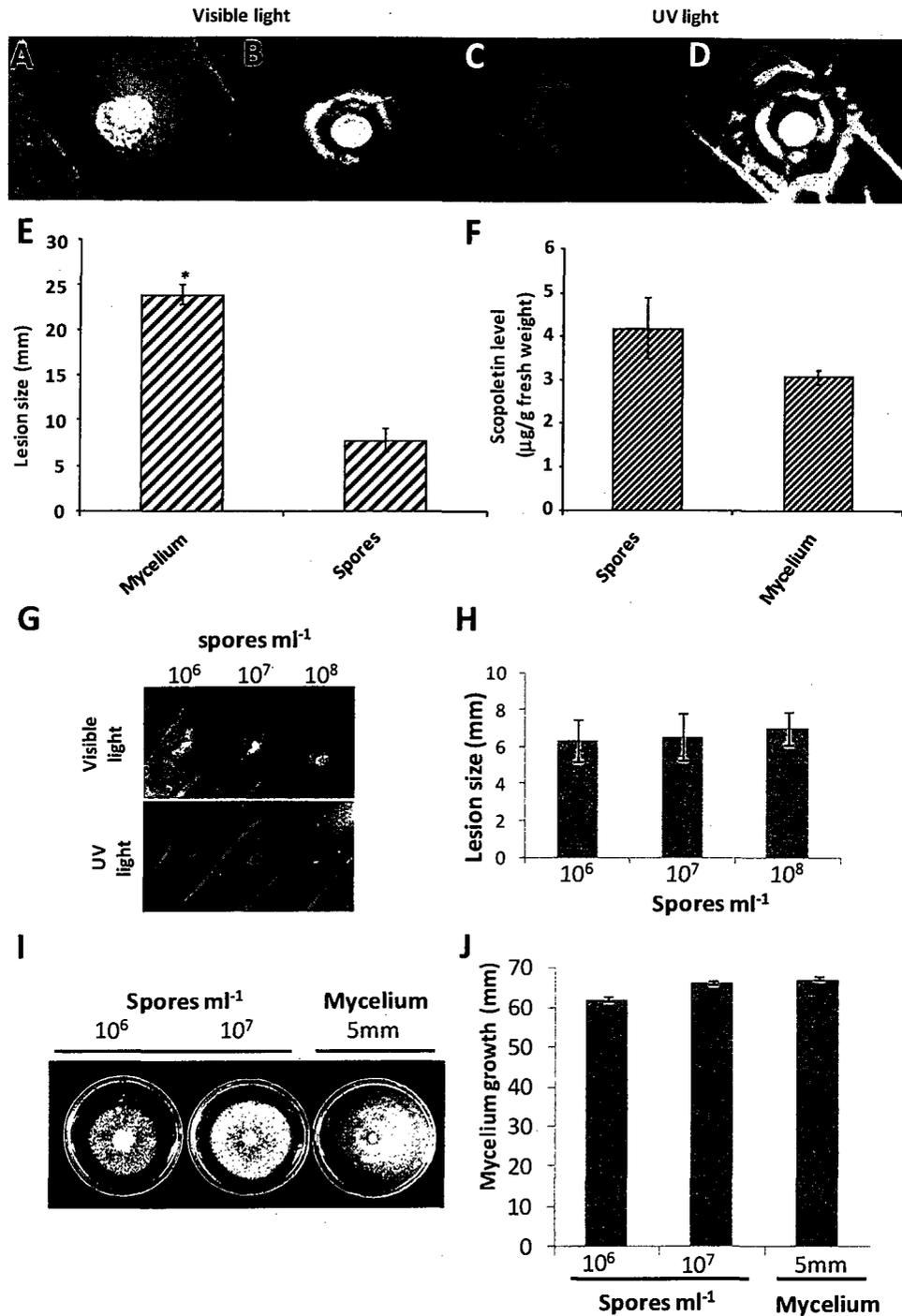


**Fig. 5: Scopoletin inhibits the germination of *B. cinerea* spores but not its mycelium growth**

**a**, Kinetics of spore germination 0, 2, 4 and 8 hours after incubation in PDB medium. Spore germinations eight hours after incubation in PDB medium supplemented with 100, 300 and 500  $\mu g ml^{-1}$  of scopoletin (**b**) and mycelium plugs growth on PDA medium 3

days after treatment with the same concentration of scopoletin described above (c).  $4.10^5$  spores were incubated in a total volume of 100  $\mu\text{L}$  of PDB medium supplemented with different concentrations of scopoletin. The plates were kept at 22°C for eight hours, after which the number of germinated spores was determined. Spores with germ tubes longer, or as long than the spore, were counted as being germinated. Round plugs of *B. cinerea* mycelium were transferred to potato dextrose agar plates supplemented with the same concentrations of purified scopoletin used for the spore experiments. The radial growth of *B. cinerea* mycelium was then measured three days post-treatments. The values given are the percentage of inhibition of spore germination or of the percent inhibition plug mycelium radial growth (d). e, The length of spore germ tubes was also measured from samples shown in b (two hundred spores were measured for each replicate). Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. Data sets marked with an asterisk are significantly different from the controls as assessed by the Student's t-test.

*B. cinerea* spores started their germination after two hours after incubation in PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) medium (Fig. 5a), and the germination is complete within four hours of incubation (Fig. 5a). We investigated whether scopoletin inhibits the germination of the spores or the growth of the mycelium of *B. cinerea*. One hundred microlitres of spore suspension ( $4.10^5$  spores  $\text{ml}^{-1}$  in PDB medium) from *B. cinerea* isolate B191 was supplemented with 100, 300 or 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin (dissolved in DMSO) and spores were observed under a microscope eight hours after treatments. The same volume of DMSO was added in the controls. Interestingly scopoletin inhibited the germination of *B. cinerea* spores in a dose-dependent manner (Fig. 5 b and d). The germination was strongly inhibited at 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin, with 90% of germination inhibition (Fig. 5d). The length of spore germ tubes was also measured. We observed also that the length of the germ tubes was highly reduced with the three tested concentrations of scopoletin (Fig. 5e). A similar experiment was carried out in PDA medium supplemented with the same concentrations of scopoletin and then inoculated with mycelium plugs (5 mm of diameter). Mycelium growth was measured three days after incubation at 22 °C. As shown in figure 6c the same concentrations of scopoletin used for spores experiments did not affect significantly the mycelium growth of *B. cinerea*. Only 25% growth inhibition was observed with 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Fig. 5d). These results suggest that spores are more sensitive than mycelium to the antimicrobial effect of scopoletin.



**Fig. 6: *B. cinerea* mycelium grows more than spores on resistant tobacco cultivars**

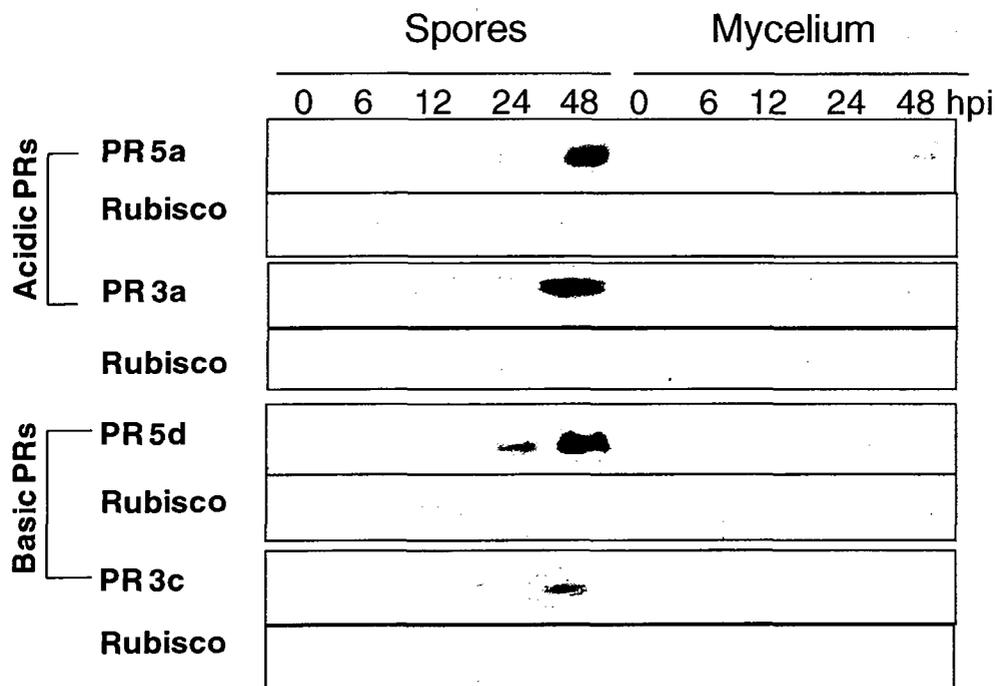
Leaves of *N. tabacum* Petit Havana were infected by a drop (10 µl) of spore suspension (10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup>) (a and c) or round plugs (5mm in diameter) (b and d) of *B. cinerea* isolate B191. The infected leaves were maintained in high humidity for four days. Pictures were then taken under visible and UV light four days post inoculation. Data shown are representative of three independent experiments. e, Size of lesions formed in

leaves shown in a and b. Error bars represented the standard deviations of three independent experiments. Data sets marked with an asterisk (Mycelium plug infected-*N. tabacum* cv Petit Havana leaves) are significantly different from the spore-infected *N. tabacum* cv Petit Havana leaves as assessed by the Student's t-test. **f**, Scopoletin levels in *B. cinerea* spores- and mycelium plug- infected *N. tabacum* cv Petit Havana plants. Leaves of *N. tabacum* cv Petit Havana were infected by a drop (10  $\mu$ l) of spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) or round plugs (5 mm in diameter) of *B. cinerea* isolate B191 and scopoletin levels were carried out, as described in material and methods, four days post inoculation. Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. **g** Leaves of *N. tabacum* Petit Havana were infected by a drop (10  $\mu$ l) of spore suspension ( $10^6$ ,  $10^7$  or  $10^8$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ). The pictures were taken 4dpi. **h** Size of the lesions formed in leaves shown in g. Error bars represent the standard deviations of three independent experiments. **i-j** The radial growth of *B. cinerea* spores (10  $\mu$ l of  $10^6$ ,  $10^7$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) and mycelium plugs (5mm of diameter) measured three days post culture.

To investigate whether this difference in sensitivity to scopoletin between spores and mycelium has a consequence on the degree of disease severity caused by *B. cinerea*, we compared *N. tabacum* Petit Havana (resistant cultivar) leaves infected with spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) versus mycelium plugs (5mm of diameter) four days post inoculation.

Figure 6 shows that the lesion size was enhanced in plants infected with mycelium plugs (Fig. 6b and 6e) versus the plants inoculated with spores (Fig. 7a and 7e). The lesion size was two-fold higher in leaves infected with mycelium plugs versus the leaves inoculated with spores (Fig. 6g). The leaves of the resistant cultivar *N. tabacum* Petit Havana accumulated the scopoletin around spores as well as mycelium plug-infected areas (Fig. 6c and 6d). The scopoletin levels were quantified in leaves of *N. tabacum* Petit Havana infected with mycelium plugs or spores four days post infection. The results showed that scopoletin levels were similar in both spores- and mycelium plug-infected leaves (Fig. 6f). Indeed the mycelium is more virulent than the spores even when the resistant cultivar reacted to both inoculums (spores and mycelium plugs) by accumulating the antimicrobial scopoletin. The sensitivity of *B. cinerea* spores to scopoletin may compromise its virulence on *N. tabacum* Petit Havana. To be sure that the high resistance of *N. tabacum* Petit Havana to spores, but not to the mycelium, was due to the relative biomass of the inoculum, we infected the leaves with various concentrations of *B. cinerea* spores ( $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ). Interestingly there was no difference between lesions

size caused by the three spore concentrations (fig 6g and h). These three different concentrations of *B. cinerea* spores induced also the accumulation of the scopoletin around the infection sites of *N. tabacum* Petit Havana leaves (Fig 6g, lower panel). We also tested whether the growth of the mycelium plugs was faster than the spores. To do this we added mycelium plugs (5 mm of diameter) or 10  $\mu$ l of  $10^6$ ,  $10^7$  spores  $\text{ml}^{-1}$  to the PDA medium and three days after incubation at 22°C, the radial growths were measured. Interestingly we did not see any significant differences in the radial growth between mycelium plugs and the two concentrations of spores (10  $\mu$ l of  $10^6$ ,  $10^7$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) that we analysed (figure 6i and j). These data suggest that the differences that we observed in the resistance to the mycelium versus the spores are not due the relative biomass between the two inoculums.



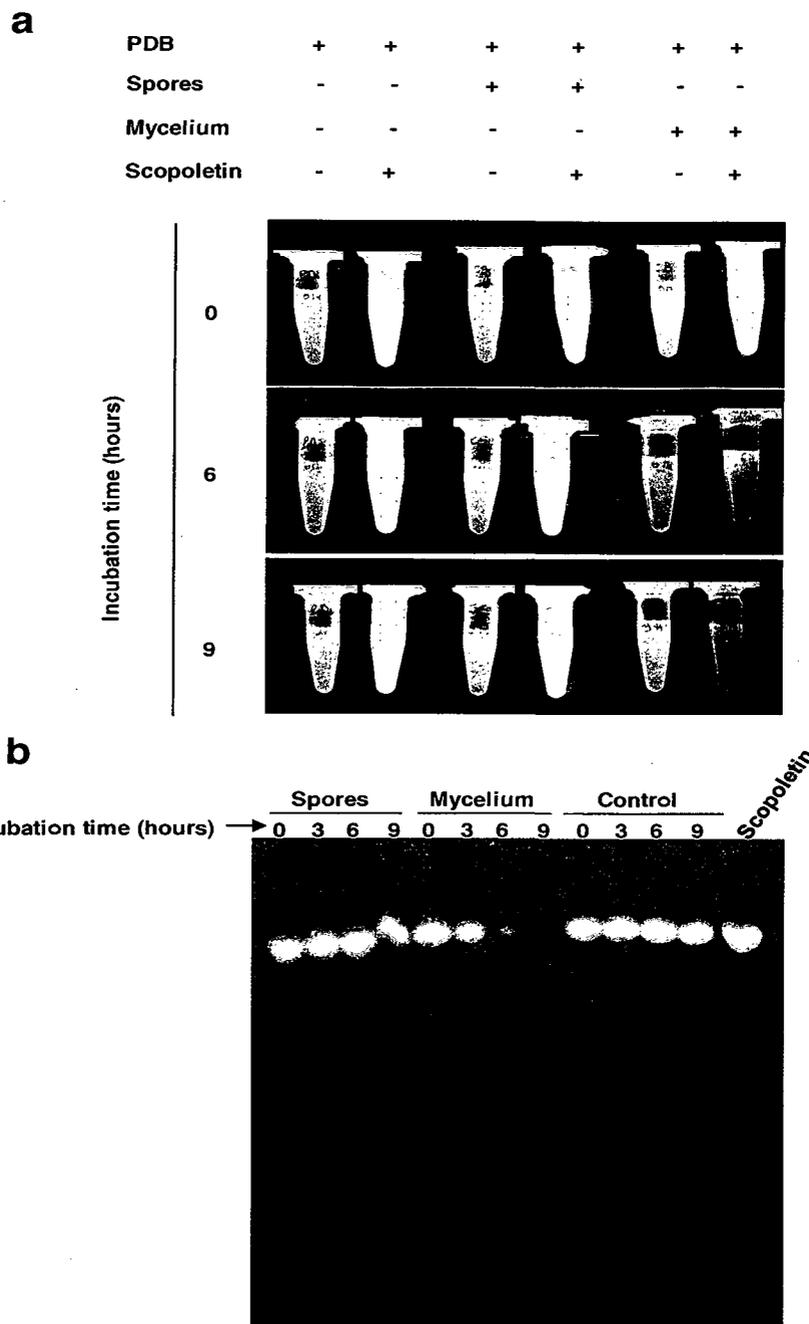
**Fig. 7: PR protein accumulation after inoculation of *N. tabacum* cv Petit Havana leaves with spores or mycelium plugs of *B. cinerea***

Proteins were extracted 0, 6, 12, 24 and 48 hours post infection from *N. tabacum* cv Petit Havana leaves with spores suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) or mycelium plugs (5mm diameter) of *B. cinerea*. Western blots were carried out by using acidic and basic anti-PR3 and PR5 as described previously (Cordelier *et al.*, 2003). Rubisco shows the equal amount of the proteins in all the experiments.

We then investigated whether these results are consistent with the expression of the PR proteins in the leaves of *N. tabacum* Petit Havana challenged with spores or mycelium of *B. cinerea*. Detached leaves were inoculated with 6 drops ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) or 6 plugs of *B. cinerea* and samples were harvested for PR proteins detection at 0, 12, 24, and 48 hours postinoculation. Indeed, spores induced high accumulation of the acidic and basic PR3 and PR5. However the mycelium induced a slight accumulation of those PR proteins in *N. tabacum* cv Petit Havana leaves (Fig. 7). This result is correlated with the difference in the resistance of *N. tabacum* cv Petit Havana to the spores versus the mycelium of *B. cinerea*. These results suggest that the mycelium avoids the accumulation of PR proteins and tolerates the scopoletin which might enhance its virulence compared to the spores in tobacco.

### ***B. cinerea* metabolizes the scopoletin**

Several pathogens are known to secrete enzymes that detoxify secondary metabolites including phytoalexins. The breakdown of such compounds is essential for the pathogenicity of several pathogens (Morrissey & Osbourn, 1999; Bouarab *et al.*, 2002). We thus tested whether the difference in scopoletin sensitivity of spores versus mycelium was related to the possible detoxification or degradation of this phytoalexin by the latter but not by the former. Ten millilitres of PDB medium containing spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) or five mycelium plugs (5 mm in diameter) from *B. cinerea* isolate B191 were supplemented with  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin. The same experiment was monitored in the absence of scopoletin (control). Similarly a solution of  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin was incubated in 10 ml of PDB medium in the absence of the fungus (control). An aliquot of 1 ml was recuperated at 0, 3, 6 and 9 hours after each treatment and the tubes were observed under UV illumination. Interestingly, the mycelium was able to degrade or detoxify scopoletin as can be observed by the disappearance of the blue fluorescence (Fig. 8a and 8b). Based on scopoletin fluorescence, the phytoalexin metabolism was complete 9 hours after treatment (Fig. 8b). Our data suggest that *B. cinerea* degrades or modifies the scopoletin produced by tobacco.



**Fig. 8: *B. cinerea* mycelium but not spores metabolizes the scopoletin**

Spore suspension ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) or 5 round plugs (5 mm in diameter) of *B. cinerea* isolate B191 were incubated in 10 ml of PDB medium supplemented with  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  of scopoletin. As controls, solvent with spores and mycelium or scopoletin without the fungus were prepared in the same manner. The flasks were then incubated at  $22^\circ\text{C}$  and 1 ml was taken at 0, 3, 6 and 9 hours after treatments, for observation under UV (**a**) and were resolved by TLC to detect the presence of scopoletin (**b**). Data shown are representative of three independent experiments.

**Extracellular proteins from the mycelium break down the resistance to spores in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana**

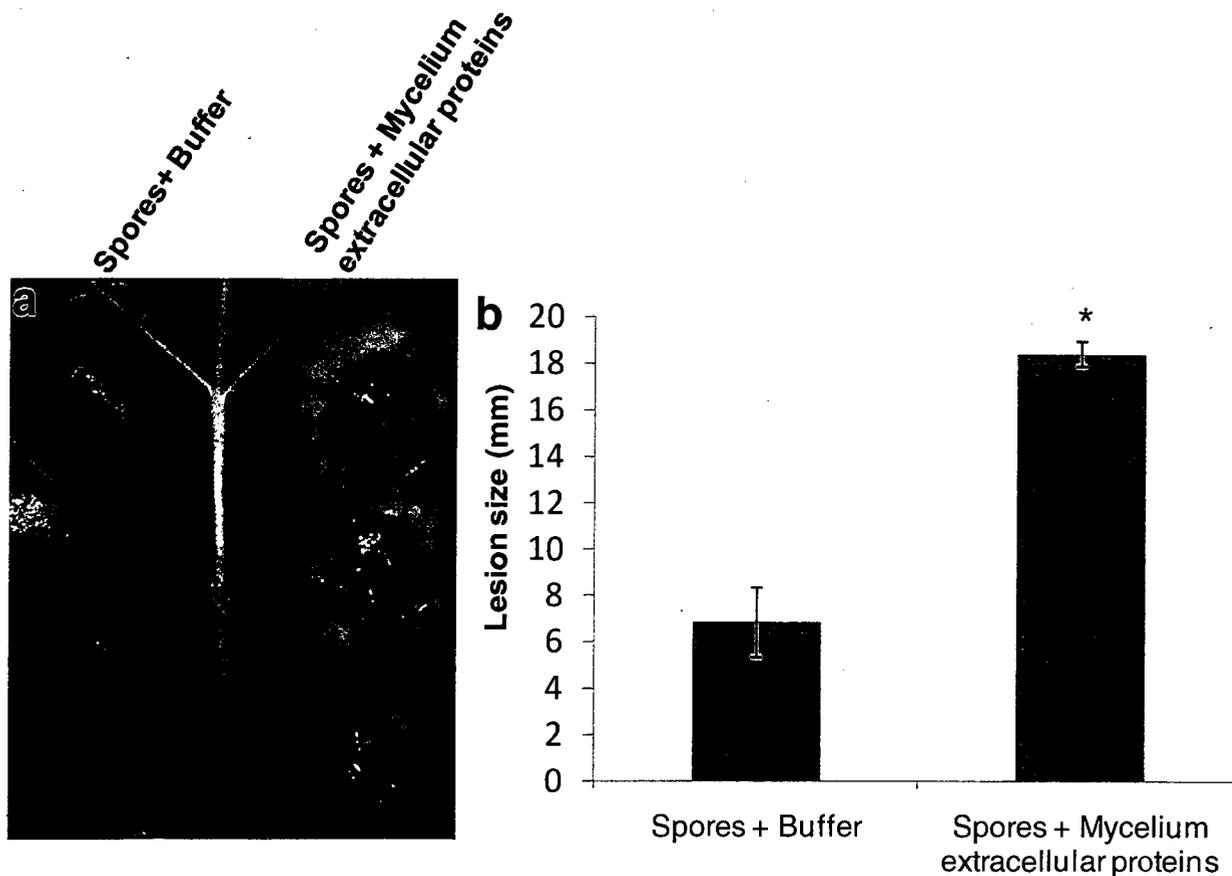
To investigate whether the mycelium produces virulence proteins that break down the resistance in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana, detached leaves were inoculated with spores ( $10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$ ) mixed with the mycelium extracellular protein prepared as described in the material and methods or the similar concentration of spores mixed with the buffer. Interestingly the lesion size was three-fold higher in the leaves infected with spores mixed with the mycelium extracellular protein versus the leaves inoculated with mock-treated spores (figure 9). Interestingly this extracellular protein fraction was still able to metabolize the scopoletin (data not shown).

These result suggest that the mycelium produces a virulence proteins that compromised the resistance in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana and the metabolism of the scopoletin might be involved in this virulence strategy.

**Discussion**

Plant disease resistance can be induced by general elicitors or, only in particular host plant cultivars, in response to particular pathogen races (race-specific resistance), (race-cultivar-specific or gene-for-gene resistance). This host-pathogen specificity can be attributed to a single gene or a small number of related genes enabling the production of race-specific elicitors (Dangl & Jones, 2001, Nürnberger *et al.*, 2004). The fact that the resistance of tobacco to *B. cinerea* is cultivar specific (Figs. 1 and 2) suggests that this resistance is mediated by a signal that is specifically recognized by the resistant cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana. As the specificity of the resistance to pathogens at cultivar level is always due to the gene for gene interaction, this resistance induced by *B. cinera* might be controlled by a gene for gene system. We also show that the *N. sylvestris* specie is resistant to *B. cinerea*. *N. tabacum* is a complex amphidiploid involving *N. sylvestris* and *N. tomentosa* genomes (Goodspeed, 1954). *N. sylvestris* is often considered as being the ancestor of the amphidiploid *N. tabacum*. The analysis of its genome shows some degree of sequence identity with *N. tabacum* (Goodspeed, 1954, Chase *et al.*, 2003).

These suggest that the genes controlling the resistance observed in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana might come from *N. sylvestris*.



**Fig. 9: Mycelium extracellular proteins of *B. cinerea* affects the resistance induced in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana**

**a**, The right side of *N. tabacum* cv Petit Havana detached leaves were infected with a drop (10  $\mu$ l) of spore suspension ( $10^6$  spores  $ml^{-1}$ ) mixed with the mycelium extracellular proteins as detailed in the material and methods. As a control, the left side of the same leaves were infected with a drops (10  $\mu$ l) of spore suspension ( $10^6$  spores  $ml^{-1}$ ) mixed with the buffer. The leaves were then incubated for four days as described in the material and methods. The pictures were taken at 4dpi. Data shown are representative of three independent experiments. **b**, Lesion sizes formed in leaves shown in a. Error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

The present study clearly shows that the resistant cultivar, *N. tabacum* cv Petit Havana, accumulates high amounts of PR proteins and scopoletin in response to *B. cinerea* spores compared to the susceptible cultivar, *N. tabacum* cv Xanthi (Fig 4). We also show that this phytoalexin inhibits the germination of *B. cinerea* spores (Fig. 5). In many plant-pathogen systems, phytoalexins accumulate rapidly in response to elicitors and pathogens (Matros & Mock, 2004; Yang *et al.*, 2004). *Arabidopsis thaliana* produces the phytoalexin camalexin in response to *B. cinerea* infection (Ferrari *et al.*, 2003a). This phytoalexin is able to limit *B. cinerea* growth *in vitro* (Ferrari *et al.*, 2003a). *Pad3* mutants (*Phytoalexin deficient 3*), impaired in an enzyme required for camalexin biosynthesis, fail to accumulate detectable levels of camalexin in response to *B. cinerea* and display greatly enhanced disease symptoms (Zhou *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2003a).

Our data also show that the resistance of tobacco to *B. cinerea* is affected by the type of the inoculum we used. The scopoletin inhibits the germination of the spores but does not have any significant effect on the radial growth of the mycelium of *B. cinerea*. We then demonstrate that the mycelium is able to metabolize the scopoletin, which might be involved in allowing the fungus to grow on its host (Fig. 8). This may explain why there are differences on disease lesions between leaves from resistant cultivar *N. tabacum* Petit Havana infected with spores versus plugs of mycelium (Fig. 6). These results were supported by the high accumulation of PR proteins in *N. tabacum* Petit Havana infected with spores, but slightly accumulated when the leaves of this plant were infected with the mycelium of *B. cinerea* (Fig 7). The mycelium may use this degradation or detoxification activities to escape the toxicity of the antimicrobial compound scopoletin (Figs. 6 and 8) and allows it to be more virulent than spores on tobacco (Fig. 6). The fact that the extracellular proteins from the mycelium break down the resistance to spores in the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana clearly suggest that the mycelium produces more effective virulence proteins than the spores. Consequently, the mycelium is more virulent than the spores on the cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana.

Pathogens have developed several strategies to overcome the antimicrobial effect of phytoalexins (VanEtten *et al.*, 1994; Morrissey & Osbourn, 1999; Bouarab *et al.*, 2002).

These strategies may include the production of degradative enzymes, innate resistance of the target site, or efflux mechanisms that prevent intracellular antifungal compounds from building up to toxic levels (Morrissey & Osbourn, 1999). Detoxification or degradation of host-plant phytoalexins has been shown to be important for full virulence (Wasmann & VanEtten, 1996; Enkerli *et al.*, 1998). *Gibberella pulicaris*, a pathogen of potato, produces an enzyme that degrades the potato phytoalexins rishitin and lubimin and allows the pathogenicity of the fungus to be assessed (Fleissner *et al.*, 2002). The root pathogen *Rhizoctonia solani* can metabolize camalexin to 5-hydroxycamalexin, which is less toxic to fungal growth (Pedras & Khan, 2000; Pedras & Liu, 2004). Many fungi that are pathogenic on pea, possess a pisatin demethylase enzyme, shown to be a cytochrome P-450 monooxygenase, that detoxifies the pea phytoalexin pisatin (George *et al.*, 1998; George & VanEtten, 2001; Funnell & VanEtten, 2002; Funnell *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2003). The breakdown of this antimicrobial phytoalexin is essential for the pathogenicity process of several pathogens (George *et al.*, 1998; George & VanEtten, 2001; Funnell & VanEtten, 2002; Funnell *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2003). The generation of a scopoletin-detoxifying enzyme minus mutant is essential to understand the role of this enzyme in the establishment of the disease caused by *B. cinerea*. It will be also interesting to generate transgenic tobacco plants (*N. tabacum* Petit Havana or *N. sylvestris*) accumulating scopoletin-detoxifying enzyme, in order to investigate the importance of the scopoletin in the resistance against *B. cinerea* and other pathogens. This will also help in understanding the role of phytoalexin-detoxifying enzyme in the establishment of the disease.

In conclusion, our data show that the resistance of tobacco to *B. cinerea* is inoculum and cultivar dependent. The fact that the resistance looks to be cultivar specific makes this work very interesting and distinguishes it from all other works using necrotrophic pathogens, which as far as we are aware, have not reported similar specific resistance. As the specificity of the resistance to pathogens at cultivar level is always due to the gene for gene interaction, this work may help in discovering the first resistance gene or avirulence protein in a plant-necrotrophic pathogen system.

Our data present also an important advance in understanding the strategy used by the mycelium of *B. cinerea* to establish disease on tobacco plants.

### **Acknowledgments**

We thank Drs Rocio Gonzalez-Lamothe and Peter Moffett for constructive criticism of the manuscript. This work is supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds Québécois de Recherche en Nature et Technologie, the Canadian Foundation for Innovation and the Université de Sherbrooke.

**References**

**Ahl-Goy P, Signer H, Reist R, Aichholz R, Blum B, Schmidt E, Kessmann, H. 1993.** Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. *Planta* **191**: 200-206.

**Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weyman K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J. 1993.** Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7327-7331

**Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A. 2002.** A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889-892.

**Boveris A, Martino E, Stoppani AO. 1977.** Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems. *Annal. Biochem.* **80**: 145-158.

**Bru R, Sellés S, Casado-Vela J, Belchí-Navarro S, Pedreño MA. 2006.** Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defence responses in grapevine cCell cultures. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 65 -71.

**Cabanne C, Doneche B. 2002.** Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiol. Res.* **157**: 183-189.

**Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson J, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokony AS. 2003.** Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annal. Botany* **92**: 107-127.

**Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. 2002.** Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**: 1093-1107.

**Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S. 2003.** Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol. Biol.* **51**: 109–118.

**Costet L, Fritig B, Kauffmann S. 2002.** Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants. *Physiol. Plant.* **115**: 228-235.

**Daayf F, Schmitt A, Bélanger RR. 1997.** Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol.* **113**: 719-727.

**Dangl JL, Jones JD. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833

**El Oirdi M, Bouarab K. 2007.** Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **175**:131-139.

**Enkerli J, Bhatt G, Covert SF. 1998.** Maackiain detoxification contributes to the virulence of *Nectria haematococca* MP VI on chickpea. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 317-326.

**Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM. 2003a.** *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *Plant J.* **35**: 193-205.

**Ferrari S, Vairo D, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G. 2003b.** Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell* **15**: 93-106.

**Fleissner A, Sopalla C, Weltring KM. 2002.** An ATP-binding cassette multidrug resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 102-108.

**Flor HH. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.

**Fritig B, Heitz T, Legrand M. 1998.** Antimicrobial proteins in induced plant defence. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 16-22.

**Funnell DL, Matthews PS, VanEtten HD. 2002.** Identification of new pisatin demethylase genes (*PDA5* and *PDA7*) in *Nectria haematococca* and non-Mendelian segregation of pisatin demethylating ability and virulence on pea due to loss of chromosomal elements. *Fungal Genet. Biol.* **37**: 121-133.

**Funnell DL, VanEtten HD. 2002.** Pisatin demethylase genes are on dispensable chromosomes while genes for pathogenicity on carrot and ripe tomato are on other chromosomes in *Nectria haematococca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 840-846.

**Gachon C, Baltz R, Saindrenan P. 2004.** Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol. Biol.* **54**: 137-146.

**George HL, Hirschi KD, VanEtten HD. 1998.** Biochemical properties of the products of cytochrome P450 genes (PDA) encoding pisatin demethylase activity in necrotic haematococca. *Arch. Microbiol.* **170**: 147-54.

**George HL, VanEtten HD. 2001.** Characterization of pisatin-inducible cytochrome p450s in fungal pathogens of pea that detoxify the pea phytoalexin pisatin. *Fungal Genet. Biol.* **33**: 37-48.

**Glawischnig E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA. 2004.** Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8245–8250.

**Glazebrook J, Ausubel FM. 1994.** Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8955-8959.

**Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R, Ausubel FM. 1997.** Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**: 381-392.

**Gomez-Vasquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR, Cooper RM. 2004.** Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annal. Bot.* **94**: 87-97.

**Goodspeed TH. 1954.** The genus *Nicotiana*. *Chronica botanica, Waltham, Mass. USA.*

**Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stocker RH, Stenzel K. 1993.** Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**: 153-156.

**Iriti M, Rossoni M, Borgo M, Faoro F. 2004.** Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 4406-4413.

**Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA, van Kan, JA. 2005.** Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* **43**: 213-225.

**Khan R, Tan R, Mariscal AG, Straney D. 2003.** A binuclear zinc transcription factor binds the host isoflavonoid-responsive element in a fungal cytochrome p450 gene responsible for detoxification. *Mol. Microbiol.* **49**: 117-130.

**Langcake P, McCarthy WV. 1979.** Relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **18**: 244-253.

**Langcake P, Pryce RJ. 1977.** The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **9**: 77-86.

**Mansfield JW. 1980.** The biology of *Botrytis*. In 'The Biology of *Botrytis*', J.R. Coley-Smith, K. Verhoeff, and W.R. Jarvis, eds. *Academic Press, London.* 181-218.

**Matros M, Mock HP. 2004.** Ectopic expression of a UDP-glucose:phenylpropanoid glucosyltransferase leads to increased resistance of transgenic tobacco plants against infection with Potato Virus Y. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1185-1193.

**Morrissey JP, Osbourn AE. 1999.** Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 708-24.

**Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA. 2005.** Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. *Mol. Cell.* **17**: 171-180.

**Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E. 1995.** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiol.* **108**:17-27

**Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**: 249-66.

**Pedras MS, Khan AQ. 2000.** Biotransformation of the phytoalexin camalexin by the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Phytochemistry* **53**: 59-69.

**Pedras MS, Liu J. 2004.** Designer phytoalexins: probing camalexin detoxification pathways in the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Org. Biomol. Chem.* **2**: 1070-1076.

**Poinsot B, Vandelle E, Bentejac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thevenot P, Pugin A. 2003.** The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16:** 553-564.

**Prats E, Bazzalo ME, Leon A, Jorin JV, 2006.** Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* **147:** 451-460.

**Rha E, Park HJ, Kim MO, Chung YR, Lee CW, Kim JW. 2001.** Expression of exopolygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **201:** 105-109.

**Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS. 2005.** Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep.* **24:** 216-24.

**Soulie MC, Piffeteau A, Choquer M, Boccara M, Vidal-Cros A. 2003.** Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene Bchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet. Biol.* **40:** 38-46.

**Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE. 2001.** Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292:** 2285-2289.

**ten Have A, Breuil WO, Wubben JP, Visser J, van Kan JA. 2001.** *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* **33:** 97-105.

**Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert W F. 1998.** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95:** 15107-15111.

**Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF. 1999.** Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **19:** 163-171.

**Valle T, Lopez JL, Hernandez JM, Corchete P. 1997.** Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Sci.* **125:** 97-101.

**van Loon LC, van Strien EA. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55:** 85-97

**VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE. 1994.** Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins" *Plant Cell* **6**: 1191-1192.

**Wasmann CC, VanEtten HD. 1996.** Transformation-mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decrease the virulence of *Nectria haematococca* on pea. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 793-803.

**Wubben JP, Mulder W, ten Have A, van Kan JA, Visser J. 1999.** Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1596-1602.

**Yang Q, Trinh HX, Imai S, Ishihara A, Zhang L, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. 2004.** Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**: 81-89.

**Zhou N, Tootle TL, Glazebrook J. 1999.** *Arabidopsis* *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**: 2419-2428.

## CONCLUSION

Les plantes ont élaboré au cours de leur évolution des moyens de défense qui leur permettent de contrer efficacement les agressions. Il est admis que les réponses de défense de la plante dépendent du mode de vie de l'agent pathogène qui l'infecte. Si elle est confrontée à un agent pathogène biotrophe ayant besoin de cellules vivantes pour proliférer, la plante induira la mise en place des réponses de défense liées à la voie de l'AS. Dans le cas d'un agent pathogène nécrotrophe, qui tire profit des cellules mortes, la plante induira la mise en place des réponses de défense liées à la voie de l'AJ. Ces deux voies (acide salicylique et acide jasmonique) peuvent être antagonistes. En contrepartie les agents pathogènes ont co-évolué en développant de nouvelles stratégies qui leur permettent de contourner les défenses de la plante hôte et de mettre en place la maladie.

Les travaux présentés dans cette thèse sur les facteurs qui contrôlent le pouvoir pathogène chez *B. cinerea* ont permis de mettre en évidence trois résultats majeurs. Premièrement les régulateurs EDS1 (enhanced disease susceptibility) et SGT1 (suppressor of the G2 allele of Skp1) augmentent la sévérité de la maladie causée par le champignon nécrotrophe *B. cinerea*. Dans cette partie nous avons montré que *B. cinerea* manipule les voies de signalisation qui mènent à la mise en place de la réaction hypersensible pour installer sa maladie. En fait la pourriture grise causée par *B. cinerea* chez *Nicotiana benthamiana*, nécessite la présence des deux régulateurs de la réaction hypersensible chez la plante, EDS1 et SGT1. L'expression de ces deux gènes est induite suite à l'infection de ces plantes par *B. cinerea*. Par ailleurs les plantes dont l'expression de ces deux gènes est fortement réduite sont résistantes à *B. cinerea*. L'ensemble de ces résultats suggère que *B. cinerea* utilise la voie qui mène à la mise en place de la réaction hypersensible pour instaurer sa maladie.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons mis en évidence une nouvelle stratégie utilisée par *B. cinerea* pour détourner la voie immunitaire de la plante requise pour sa destruction. Nous avons montré que l'agent pathogène *B. cinerea* induit l'expression de la systémine qui est impliquée dans la résistance contre ce champignon,

par l'activation de la voie de l'AJ, incluant l'expression des inhibiteurs de protéinases PI I et II. Pour contourner cette immuno-réaction innée de la plante, *B. cinerea* a développé un nouveau facteur de virulence pour manipuler l'effet antagoniste qui existe entre les voies de l'acide salicylique et l'acide jasmonique pour instaurer la maladie. En effet, *B. cinerea* produit un exopolysaccharide, le  $\beta$ -(1,3) (1,6) glucane, qui induit l'accumulation de l'acide salicylique. Ce dernier agit comme antagoniste de la voie de l'acide jasmonique par la suppression des marqueurs de défense dépendant de l'AJ notamment, les inhibiteurs de protéinases PI I et II. Les réflexions suscitées à la suite de ce travail sont multiples et offrent plusieurs perspectives d'études. Au-delà des considérations propres au modèle proposé, elles nous amènent notamment à nous interroger sur le ou les mécanismes par lesquels l'AS supprime l'expression des inhibiteurs de protéinases PI I et II. Ces travaux ont donc ouvert une nouvelle avenue qui pourrait permettre de découvrir de nouvelles cibles importantes dans les stratégies utilisées par les agents pathogènes pour détourner le système immunitaire de la plante. La défense induite par l'AS est dans la plupart des cas gouvernée par la protéine NPR1 et les facteurs de transcription de type TGA. Ces deux acteurs interagissent physiquement pour ainsi réguler l'expression des gènes dépendant de l'AS. Ces deux acteurs ont aussi un rôle dans la mise en place de l'antagonisme chez *A. thaliana*. Nous avons montré que l'antagonisme induit par *B. cinerea* via son EPS nécessite la présence de NPR1 et de TGA1a (Abd El Rahman *et al*, données non publiées). En effet les plants de tomate qui sous-expriment *NPR1* et *TGA1a* deviennent résistants à *B. cinerea*. De plus, les plants qui sur-expriment *NPR1* sont plus sensibles à *B. cinerea* que les plants sauvages (Abd El Rahman *et al*, données non publiées). Ces deux acteurs, NPR1 et TGA1a, régulent négativement l'expression de PI I et PI II (Abd El Rahman *et al*, données non publiées). Il est donc important de vérifier si NPR1 et TGA1a régulent directement l'expression de PI I et PI II. Les facteurs de transcription TGA reconnaissent une séquence au niveau de la région promotrice pour s'y lier et réguler l'expression. Abd El Rahman (données non publiées) a analysé la région promotrice de PI I et PI II et il a trouvé la présence de ces séquences de liaison de TGA. Par conséquent des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine seront essentielles pour montrer s'il y a une liaison entre TGA1a et la région promotrice de PI I

et PI II, ce qui expliquerait la régulation négative de l'expression de ces deux gènes par NPR1 et TGA1a.

Il est également important d'étudier le transcriptome de la tomate en réponse à *B. cinerea* et aux traitements par l'AS et l'EPS. Ces résultats devraient amener à découvrir les cibles moléculaires impliquées dans la mise en place de cet antagonisme.

Dans la dernière partie nous avons montré que *B. cinerea* induit l'accumulation d'une phytoalexine, la scopolétine, dans une espèce et un cultivar de tabac (*N. sylvestris* et *N. tabacum* cv Petit Havana). *N. tabacum* est une espèce amphidiploïde qui est générée à partir des croisements entre *N. sylvestris* et *N. tomentosa*. Par conséquent, la résistance du cultivar *N. tabacum* cv Petit Havana pourrait avoir comme origine *N. sylvestris*. L'accumulation de la scopolétine est corrélée avec la résistance contre cet agent pathogène. En effet, à la différence de toutes les espèces de tabac testées, les deux espèces *N. sylvestris* et *N. tabacum* cv Petit Havana qui sont résistantes à *B. cinerea* sont les seules qui ont accumulé la scopolétine à la suite de l'infection par ce champignon. La scopolétine inhibe la germination des spores, mais elle n'a pas d'effet significatif sur la croissance du mycélium de *B. cinerea*. J'ai montré aussi qu'à la différence des spores, le mycélium de *B. cinerea* est capable de détoxifier ou dégrader la scopolétine. Par ailleurs, la résistance du cultivar Petit Havana est corrélée avec l'induction importante de l'accumulation des PR protéines. En revanche cette accumulation est réduite chez les plants infectés par le mycélium en comparaison aux plants infectés par les spores de *B. cinerea*. On peut donc conclure que la résistance du tabac à *B. cinerea* est cultivar et inoculum dépendant. Il est connu que plusieurs agents pathogènes contournent la toxicité des phytoalexines par la production des enzymes de détoxification de ces molécules antimicrobiennes. Il sera important de purifier et caractériser l'enzyme responsable du métabolisme de la scopolétine. Il est également important de générer des mutants incapables d'exprimer cette enzyme pour ainsi étudier son rôle dans la mise en place de la maladie causée par *B. cinerea*. Il sera également intéressant de générer des plantes de tabac (*N. tabacum* Petit Havana or *N. sylvestris*) capables d'accumuler l'enzyme de détoxification ou de dégradation. Ces plantes vont aider à mieux comprendre

## Conclusion

l'importance de la scopolétine dans la résistance des plantes contre les agents pathogènes, incluant *B. cinerea*. Ces plantes devraient aussi montrer si l'enzyme pourrait avoir un effet sur d'autres réponses induites en réponse à un éliciteur ou un agent pathogène avirulent.

Enfin, la compréhension des mécanismes qui régissent l'interaction entre *B. cinerea* et ses plantes hôtes, pourrait aider à la découverte de moyens de lutte phytosanitaires plus respectueux pour l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant. Sci.* *118*, 11-23.
- Abramovitch, R.B., and Martin, G.B. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* *7*, 356-64.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B. (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant diseasesusceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* *22*, 60-69.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. Amsterdam; 5<sup>th</sup> ed. (Boston: Elsevier Academic Press)
- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Gruissem, W., Meins, F., Hohn, T.J., et al. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* *34*, 462-471
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., and Ward, E. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 7327-31.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., and Berkowitz, G. A. (2007). Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel2 and innate immunity. *Plant Cell* *19*, 1081-1095.
- Allwood, E.G., Davies, D.R., Gerrish, C., Ellis, B.E. and Bolwell, G.P. (1999). Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett.* *457*, 47-52.
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., and Mysore, K.S. (2008). Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* *146*, 703-15.
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and Van Loon, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* *47*, 79-87.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* *55*, 373-99.

- Aravind, L., and Koonin, E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.* 285, 1353–1361.
- Aslam, S.N., Newman, M.A., Erbs, G., Morrissey, K.L., Chinchilla, D., Boller, T., Jensen, T.T., De Castro, C., Ierano, T., Molinaro, A., Jackson, R.W., Knight, M.R., and Cooper, R.M. (2008). Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr. Biol.* 18, 1078-83.
- Assmann, S.M. (2002). Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 14, S355-S377.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., and Parker, J.E. (2002). Regulatory role of *SGT1* in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 295, 2077–2080.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of RIN4. *Cell* 112, 369-377.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The *RAR1* interactor *SGT1*, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295, 2073–2076.
- Baldwin, I.T.; Kessler, A. and Halitschke, R. (2002). Volatile signalling in plant-plant-herbivore interactions: What is real? *Curr. Opinion Plant Biol.* 5, 351-354.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S. and Kerr, K.J. (2007). Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Can. Fam. Physician* 53, 1704-1711.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Baumberger, N., and Baulcombe, D. C. (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11928–11933.
- Benhamou, N., (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1, 233–240.
- 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.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

- Berrie, A. (1994). The importance of *Botrytis cinerea* as a storage rot of apple cv. Cox and pear cv. Conference. Nor. J. Agricul. Sciences 17, 383–389.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., and Jones, R.L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. Plant Cell 16, 332-341.
- Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., and Steinbiss, H.H. (2004). RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. Plant Cell 16, 3480–3495.
- Birch, P.R., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S., and Beynon, J.L., (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. Trends Microbiol. 14: 8–11
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N., Scheel, D., (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. Plant Cell 12, 1425-40.
- Bogdanove, A.J., and Martin, G.B. (2000). AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8836-8840.
- Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. 46: 189-214.
- Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., and Osbourn A. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. Nature 418, 889–892.
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W.A., and Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 435-466.
- Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D., and Balague, C. (2007). Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant vad1. Plant Physiol. 145, 465-477.
- Bourett, T.M., and Howard, R.J. (1990). *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Can. J. Bot. 68, 329-342.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of Arabidopsis expresses both *NPR1*- dependent and *NPR1*-independent resistance. Plant Cell 9, 1573–84
- Brian, W., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J.A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol. Plant Phytopathol. 8, 561–580
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., and Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6, 1703-1712

- Brodersen, P., and Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22, 268-280.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C., and Cammue, B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 393-416.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., and Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clark, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6531-6536.
- Catlett, M.G., and Kaplan, K.B. (2006). Sgt1p is a unique co-chaperone that acts as a client adaptor to link Hsp90 to Skp1p. *J. Biol. Chem.* 281, 33739-33748.
- Chandra, S., and Low, P.S. (1997). Measurement of Ca<sup>2+</sup> fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28274-28280.
- Chandra, S., and Low, P.S., (1995). Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4120-4123.
- Chandra, S., Stennis, M., Low, P.S., (1997). Measurement of Ca<sup>2+</sup> fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28274-80.
- Cheng, S.H., Sheen, J., Gerrish, C., and Bolwell, G.P. (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.* 503, 185- 8.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., and Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666-71.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- Chiu, Y.L., and Rana, T.M., (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10, 549-61.

- Clarke, J. D., Liu, Y., Klessig, D. F., and Dong, X. (1998). Uncoupling *PR* gene expression from *NPR1* and bacterial resistance: Characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell* 10, 557-569.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X. (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 2175–2190
- Clary, T., and Ritz, B. (2003). Pancreatic cancer mortality and organochlorine pesticide exposure in California, 1989-1996. *Am. J. Ind. Med.* 43, 306-13
- Collado, I.G., Sánchez, A.J., and Hanson, J.R. (2007). Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 674-86.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., and Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7, 210-216
- Cook, R.J. (1998). The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9711-9712.
- Cui, J., Bahrami, A.K., Pringle, E.G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C.L., Pierce, N.E., and Ausubel, F.M. (2005). *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102, 1791–1796.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., and Bourque, S. (2009). Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* 418, 191-200.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- De Jong, J.C., McCormack B.J., Smirnov N., and Talbot N.J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389, 244-245.
- De Pinto, M.C., Tommasi, F., and De Gara, L. (2002). Changes in the antioxidant system as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol.* 130, 698-708.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Egea, P.R., Bögre, L., and Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* 26, 1434-1443.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Van Loon, L.C., Dicke, M., and Pieterse, C.M.J.

(2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 923-937.

De Wit, P.J.G.M. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2, 452-458.

De Young, B.J., and Innes, R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7, 1243-1249.

Dean, R.A. (1997). Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopath.* 35, 211-234.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C., 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13454-13459.

Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-8.

Desender, S., Andrivon, D., and Val, F. (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cell Microbiol.* 9, 21-30.

Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. and Fobert, P.R. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15, 2181–2191.

Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12, 279–290.

Devoto, A. and Turner, J.G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annu. Bot.* 92, 329-337.

Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G. (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitinligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 457–466.

Diaz, J., ten Have, A., and van Kan J.A.L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 129, 1341–1351

Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R. 2001. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 6957–6962.

Dodds, P.N., Lawrence G.J., Catanzariti, A.M., The, T., Wang, C.I., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity

and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 8888-8893.

Doke, N. (1975). Prevention of the hypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* by constituents of the zoospores. *Physiological Plant Pathol.* *7*: 1-7.

Dreher, K., and Callis, J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annu. Bot.* *99*, 787-822.

Droillard, M.-J., Güclü, J., Le Caer, J.-P., Mathieu, Y., Guern, J., and Laurière, C. (1997). Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. *Planta* *202*, 341-348.

Dumas, B., Freyssinet, G., and Pallett, K.E. (1995). Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of Barley Seedlings. *Plant Physiol.* *107*, 1091-1096.

Dunoyer, P., and Voinnet, O. (2005). The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 415-423.

Durner, J., Wendehenne, D., and Kelssig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 10328-10333.

Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *42*, 185-209.

El Oirdi, M., and Bouarab, K. (2007). Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* *175*, 131-9.

Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* *3*, 278-84.

Ellis, J.G., Dodds, P.N., and Lawrence, G.J. (2007). The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 326-331.

Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* *109*, 813- 820

Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., Law, T.F., Grant, S.R., Dangl, J.L., and Carrington, J.C. (2007). High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE.* *14*, e219.

- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis*, has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 3292–3297.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Basse, C., and Boller, T. (1991). Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol.* *197*, 19-25
- Felix, G., Regenass, M., Spanu, P., and Boller, T. (1994). The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins *in vivo* as revealed by pulse-labeling with [<sup>33</sup>P]phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 952-956
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* *9*, 275-296.
- Fobert, P.R., and Després, C. (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*: 378-382.
- Forouhar, F., Lee, I., Benach, J., Kulkarni, K., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., and Tong, L. (2004). A novel NAD-binding protein revealed by the crystal structure of 2,3-diketo-L-gulonate reductase (YiaK). *J. Biol. Chem.* *279*, 13148-55.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F., and Tong, L. (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *102*: 1773-1778
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J.E., and Tsuyumu, S. (2006). Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* *19*, 342-349
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006). Early Signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *19*, 711-724.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., and Rodriguez-Palenzuela P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* *47*, 479-91.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* *3*, 72-74.

- Garcia-Olmedo, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., Lopez-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., and Poza-Carrion, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* *498*, 219-22.
- Gelli, A., Higgins, V.J., and Blumwald, E. (1997). Activation of plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* *113*, 269-279.
- Gianinazzi, S., Martin, C., Vallee, J.C., (1970). Hypersensibilite aux virus, temperatures et proteines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolecules lors de la repression de la synthese virale. *C.R. Académie des sciences. Paris* *270*, 2383-2386.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *43*, 205-227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Metraux, J.-P., Zhu, T., and Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* *34*, 217-228.
- Goodman, R. N., and Novacky, A.J. (1994). In the hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. *Amer. Phytopathol. Soci. Press*
- Govrin, E.M., Levine, A., (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.*, *10*, 751-757.
- Grant, J.J., and Loake, G.J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* *124*, 21-9
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006). Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microb.* *60*, 425-449.
- Green, T.R., and Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* *175*, 776-777.
- Greenberg, J. T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *48*, 525-545.
- Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* *6*, 201-211.
- Gu, Y.-Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., and Martin, G.B. (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* *12*, 771-785.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nurnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. E., and Tan, J. W. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite

accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 14569-14576.

Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G., and Boccara, M. (1994). Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Curr. Genet.* *26*, 251-255.

Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., and Valent, B. (1988). A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, *239*, 288-290

Hammer, P.E., Yang, S.F., Reid, M.S., and Marois, J. (1990) Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J. Americ. Soc. Horticul. Sci.* *115*, 102-107.

Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* *37*, 285-306.

Hann, D.R., and Rathjen, J.P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* *49*, 607-618.

Hardham, A.R., Jones, D.A. and Takemoto, D. (2007). Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 342-348.

Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y.A. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* *100*, 8577-8582.

He, P., Shan, L., and Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* *9*, 1385-1396.

He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., and Sheen, J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* *125*, 563-575.

Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* *44*, 321-334.

Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Métraux, J.-P., and Nawrath, C. (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* pv. tomato interaction. *Plant J.* *36*, 342-352

Holt, B.F., Belkhadir, Y., and Dangl, J.L. (2005). Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, *309*, 929-932.

Hoog, J.O.; Jornvall, H.; Holmgren, A.; Carlquist, M., and Persson, M. (1983). The primary structure of *Escherichia coli* glutaredoxin: distant homology with thioredoxins in a superfamily of small proteins with a redox-active cystine disulfide/cysteine dithiol. *Eur. J. Biochem.* *136*, 223-232.

- Howard, R.J., and Valent, B. (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 491-512.
- Hu, X., Neill, S., Tang, Z., and Cai, W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.* *137*, 663-670.
- Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.* *22*, 5679-5689.
- Huckelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* *45*, 101-127.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D., (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *94*, 4800-5.
- Jeun, Y.C., Park, K.S., Kim, C.H., Fowler, W.D., and Kloepper, J.W. (2004) Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control.* *29*, 34-42.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323-329.
- Jones-Rhoades MJ, Bartel B, Bartel DP (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *57*, 19-53.
- Jung, H.W., and Hwang, B.K. (2000). Isolation, partial sequencing, and expression of pathogenesis-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *13*, 136-42.
- Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D, Klessig D, Kachroo P (2003). Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the Arabidopsis *ssi2* mutant. *Plant Cell* *15*, 2952-2965
- Kars, I., and van Kan, J.A.L. (2004). Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of Botrytis. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Nelen, N., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 99-118.
- Kawasaki, T., Koita, H., Nakatsubo, T., Hasegawa, K., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Umemura, K., Umezawa, T., and Shimamoto, K. (2006). Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 230-235.
- Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* *24*, 447-463.

- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998) Use of dsRNA mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Kessler, A., and Baldwin, I.T. (2002). Plant responses to insect herbivory. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299-328
- Kiraly, L., Barna, B., and Kiraly, Z. (2007). Plant resistance to pathogen infection: Forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *J. Phytopathol.* 155, 385-396.
- Kirankumar, S.M., Choong-Min, R. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9, 97-104.
- Knorr, D.A., and Dawson, W.O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 170-174.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 379-384.
- Koornneef, A. and Pieterse, C.M.J. (2008). Cross Talk in Defence Signalling. *Plant Physiol.* 146,839-844.
- Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D, 2003. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* 278, 2256-64.
- Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 325-331.
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the liginiforming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissuespecific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7542-7546.
- Laloi, C., Appel, K., Danon, A., (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 323-328.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 305-315.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* 411, 848-853.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling

functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* *135*, 516-529.

Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., and Ryals J. (1994). Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *Plant Cell* *6*, 581-588.

Le Poivre, P. (2003). *Phytopathologie*, Première édition. Les presses agronomiques de Gembloux. Belgique.

Lebailly, P., Niez, E., and Baldi, I. (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie* *9*, 361-369.

Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* *15*, 773-781

Lecourieux, D., Ouaked, F., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (2000). Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol. Plant-Microb. Interact.* *13*, 821-9.

Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* *117*, 69-81.

Legendre, L., Heinsteint, P.F. and Low, P.S. (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* *267*, 20140-20147.

Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., and Staskawicz, B.J. (2005). Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* *17*, 1268-1278.

Lemaire, S.D. (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth. Res.* *79*, 305-318.

Li, J.; Brader, G.; Kariola, T. and Palva, E.T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signalling pathways in plant defence. *Plant J.* *46*, 477-491.

Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., and Dougherty, W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* *5*, 1749-1759.

Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* *38*, 800-809.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* *297*, 2053-2056.

- Lorenzo, O., Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8: 532-540
- Low, P.S., and Merida, J.R. (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant* 96, 533-542.
- Ma, W., and Berkowitz, G.A. (2007). The grateful dead: Calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 9, 2571-2585.
- Mackey, D. and McFall, A.J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol. Microbiol.* 61, 1365-1371.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L. (2003). *Arabidopsis RIN4* is a target of the type III virulence effector *AvrRpt2* and modulates *RPS2*-mediated resistance. *Cell* 112, 379-389.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002). *RIN4* interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for *RPM1*-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754.
- MacKintosh, C., Lyon, G.D. and MacKintosh, R.W. (1994). Protein phosphatase inhibitors activate anti-fungal defence responses of soybean cotyledons and cell cultures. *Plant J.* 5, 137-147.
- Malamy, J., Hennig, J., and Klessig, D.F. (1992). Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4, 359-366
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. and Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance, *Nat. Genet.* 26, 403-410.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat. Genet.* 38, 31-36.
- Mathias, C., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M.; Simon, A., and Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 1-10.
- Mathieu, Y., Sanchez, F.J., Droillard, M.-J., Lapous, D., Lauriere, C., Guern J., (1996). Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 399-408.
- Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, J., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M., BOI, J.F., Cornelissen, B.J.C., van den Elzen, P.J.M., and Linthorst, H.J.M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.* 5, 469-480.

- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 367-86.
- Métraux, J.-P., Streit, L. and Staub, T.h. (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33, 1-9.
- Mittler, R., Lam, E. (1995) Identification, characterisation, and purification of tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response *Plant cell* 7, 1951-1962
- 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.
- Moiseyev, G. P., Fedoreyeva, L.I., Zhuravlev, Y.N., Yasnetskaya, E., Jekel, P.A. and Beintema, J.J. (1997). Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett.* 407, 207-10.
- Molders. W., Buchala, A., and Métraux, J.P. (1996). Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 112, 787-792.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58, 459-481.
- Montesano, M., Brader, G., and Palva, E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* 4, 73-79.
- Morel, J.-B. and Dangl, J.L. (1999). Suppressors of the Arabidopsis lsd5 cell death mutation identify genes involved in regulating disease resistance responses. *Genetics* 151, 305-319.
- Morohashi, Y. and Matsushima, H. (2000). Development of b-1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *J. Exp. Bot.* 51, 1381-1387
- Morrissey, J.P. and Osbourn, A.E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 708-24.
- Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., and Dong, X. (2006). A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell* 18, 1750-1765.
- Mou, Z., Fan, W.H. and Dong, X.N. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.

- Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* *140*, 249-262.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* *312*, 436-439.
- Ndamukong, I., Abdallat, A.A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., and Gatz, C. (2007). SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* *50*, 128-139.
- Nemchinov, L.G., Shabala, L., and Shabala, S. (2008). Calcium efflux as a component of the hypersensitive response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol.* *49*, 40-6.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR1 proteins are antifungal. *Plant Physiol.* *108*, 17-27
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F., and Dangl, J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* *37*, 579-609
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumphlin, N., Jones, J., and He, S.Y. (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* *313*, 220-223.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *4*, 430-438.
- Nürnbergger, T., and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* *6*, 372-9.
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H., (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* *42*, 479-88.
- Osbourn, A.E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant defense against Fungal Attack. *Plant Cell.* *8*, 1821-1831.
- Ou, S.H. (1985). Blast. In : Rice Diseases, 2nd Edition, Commonwealth Mycological Institute (ed)
- Park, C.J., Shin, R., Park, J.M., Lee, G.J., You, J.S., and Paek, K.H. (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* *48*, 243-54.

- Park, J., Choi, H.-J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z., and Lee, Y. (2000). Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* *124*, 725-32.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* *318*, 113-116.
- Park, S.W., Liu, P.P., Forouhar, F., Vlot, A.C., Tong, L., Tietjen, K., and Klessig, D.F. (2009). Use of a synthetic salicylic Acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *J. Biol. Chem.* *284*, 7307-17
- Parker, J.E. (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* *8*, 245-247.
- Peart, J.R., Cook, G., Feys, B.J., Parker, J.E., and Baulcombe, D.C. (2002). An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.* *29*, 569-579.
- Pedley, K.F., and Martin, G.B. (2004). Identification of MAPKs and their possible MAPKK activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J. Biol. Chem.* *279*, 49229-49235.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.-P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* *10*, 2103-2113.
- Phillips, J.R., Dalmay, T., and Bartels, D. (2007). The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Lett.* *581*, 3592-3597.
- Pieterse, C.M.J., and Van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* *4*, 52-58.
- Poliart, C. (2000). Isolement et caractérisation de métabolites secondaires issus de champignons impliqués dans la maladie de lesca. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel, Suisse.
- Polverari, A., Miolesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., and Delledonne, M. (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in Arabidopsis thaliana. *Plant-Microbe Interac.* *16*, 1094-1105.
- Pontier, D., Balague, C., and Roby, D. (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C. R. Acad. Sci. III* *321*, 721-34.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2004). Jasmonates - signals in plant-microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* *23*, 211-222.
- Ptacek, J., and Snyder, M. (2006). Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet.* *22*, 545-54

- Rairdan, G.J., and Moffett, P. (2006). Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell*. *18*, 2082-93.
- Raposo, R., Gomez, V. and Urrutia Melgarejo, P. (2001). Survival of *Botrytis cinerea* in southeastern Spanish greenhouses. *Eur. J. Plant Pathol.* *107*, 229-236
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R. and Zook, M.N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*. *Plant Physiol.* *97*, 1342-47
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* *11*, 1207-1216.
- Ren, C.M., Zhu, Q., Gao, B.D., Ke, S.Y., Yu, W.C., Xie, D.X., and Peng, W. (2008). Transcription factor WRKY70 displays important but no indispensable roles in jasmonate and salicylic acid signaling. *J. Integr. Plant Biol.* *50*, 630-7
- Ren, D., Yang, K.-Y., Li, G., Liu, Y., and Zhang, S. (2006). Activation of Ntf4, a tobacco MAPK, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol.* *141*, 1482-1493.
- Ribeiro, J.M., Pereira, C.S., Soares, N.C., Vieira, A.M., Feijó, J.A., and Jackson, P.A. (2006). The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *J. Exp. Bot.* *57* 2025-2035
- Ridout, C.J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J.D., and Brown, J.K. (2006). Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *Plant Cell*. *18*, 2402-14.
- Rigano, L.A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M.R., Abramowicz, L., Torres, P.S., Yun, M., Castagnaro, A.P., EL Oirdi, M., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J.M., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2007). Bacterial Cyclic beta-(1,2)-Glucan Acts in Systemic Suppression of Plant Immune Responses. *Plant Cell* *19*, 2077-89.
- Ritter, C., and Dangl, J.L. (1995). The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *8*, 444-53.
- Robatzek, S. (2007). Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell. Microbiol.* *9*, 1-8.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R., and Després, C. (2006). The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* *18*, 3670-85.

- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* *6*, 3343-3353.
- Romero-Puertas, M.C., and Delledonne, M. (2003). Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *IUBMB Life* *55*, 579-83
- Rose, J.K., Ham, K.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* *14*, 1329-45.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* *448*, 370-374.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J.P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 1266-77
- Rustérucci, C., Montillet, J-L., Milat, M-L., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J.-P. (1996). Relationships between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* *111*, 885-891.
- Ryals, J.A., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., *et al.* (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I $\kappa$ B. *Plant Cell* *9*, 425-439
- Sacco, M.A., Mansoor, S., and Moffett, P. (2007). A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *Plant J.* *52*, 82-93
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., and De Oliveira, D.E. (2000). Plant glycin-rich proteins: A family of just proteins with a common motif? *Biochim. Biophys. Acta.* *1492*, 1-14.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield, S., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J. (1996). Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* *86*, 123-133.
- Schaller, A. and Oecking, C. (1999). Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* *11*, 263-272.
- Schaller, F., Schaller, A., Stintz, A. (2005). Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* *23*, 179-199
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* *1*, 305-310.

- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 11655-11660
- 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.
- Segers, G.C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q., and Nuss, D.L. (2007). Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 12902-12906.
- Settimi, L., Masina, A., Andron, A., and Axelson, O. (2003). Prostate cancer and exposure to pesticides in agricultural settings. *Int. J. Cancer* *104*, 458-461.
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defence. *Current Opin. Plant Biol.* *6*, 365-371.
- Shibuya, N., and Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *59*, 223-233.
- Silhavy, D., and Burgyan, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci.* *9*, 76-83.
- Somssich, I.E., and Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* *3*, 86-90.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., and Hahlbrock, K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *83*, 2427-2430.
- Soylu, S. (2006). Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* *170*, 942-952.
- Spoel, H.S., Koornneef, A., Susanne, M.C., Jérôme, P.K., Van Pelt, J.A. Martin, J.M., Antony, J.B., Jean-Pierre, M., Rebecca, B., Kemal, K., Van Loon, L.C., Dong, X., and Corné M.J. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defence Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell* *15*, 760-770.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, G.E. and Jones, J.D.G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* *268*, 661-667.
- Staswick, P.E. (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci.* *13*, 66-71.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J.-P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *35*, 235-270

- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* *12*, 301-309.
- Svoboda, J., Hejnar, J., Geryk, J., Elleder, D., and Vernerová, Z. (2000). Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing. *Gene.* *261*, 181-8.
- Talbot, N.J. (2003). On the trail of a cereal killer : exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 177-202.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: An insight into RISCs. *Trends Biochem. Science* *30*, 106-114.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., and Martin, G. B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* *274*, 2060-2063.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H., De Bolle, M.F.C., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* *267*, 15301-15309.
- Thakore, Y. (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.* *2*, 194-208.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W. and Broekaert, W.F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, *271*, 15018-15025.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* *448*, 661-665.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., and Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* *121*, 1093-1102.
- Thomma, B.P.H.J.; Eggermont, K.; Penninckx, I.A.M.A.; Mauch-Mani, B.; Vogelsang, R.; Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 15107-15111.
- Tör, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., and Holub, E.B. (2002). Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* *14*, 993-1003.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., and Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* *16*, 360-7.

- van der Hoorn, R.A., De Wit, P.J., and Joosten, M.H. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* 7, 67-71.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., and Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.
- van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Wagemakers, C.A.M., and van Kan, J.A.L. (1997). Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 21-29.
- van Loon, L.C. (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: *Active Defense Mechanisms in Plants* (R.K.S. Wood, ed.), pp. 247-273, Plenum Press, New York, USA.
- van Loon, L.C., and Van Kammen, A., (1970). Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199-211.
- van Loon, L.C., and Van Strien, E.A., (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 55, 85-97.
- van 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
- van Ooijen, G., van den Burg, H.A., Cornelissen, B.J.C., and Takken, F.L.W. (2007). Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 43-72.
- van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8711-8716
- Vera Cruz, C.M., Bai, J., Ona, I., Leung, H., Nelson, R.J., Mew, T.W., Leach, J.E. (2000). Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 13500-5.
- Vera, P., and Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.* 87, 58-63.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V.J. and Blumwald, E. (1994). Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiol.* 106, 97-102.

Verberne, M.C., Muljono, R.A.B., and Verpoorte, R., (1999). Salicylic acid biosynthesis. In: Hooykaas, P.J.J., Hall, M.A., Libbenga, K.R. (Eds.), *Biochem. Mol. Biol. Plant Horm.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 295-312.

Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., and Linthorst, H.J. (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* *18*, 779-783.

Verhoeff, K. (1980). The infection process and host-pathogen interactions. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR, eds. *The biology of Botrytis*. London, UK: Academic Press.

Vernooij, B., Friedrich, L., Goy, P.A., Staub, T., Kessmann, H., and Ryals, J. (1995). 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* *8*: 228-234.

Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., and Blein, J.P. (1994). Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* *104*, 1245-1249.

Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 207-220.

Voinnet, O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 464-70.

Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*.

Von Dahl, C.C., and Baldwin, I.T. (2007). Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *J. Plant Growth Regul.* *26*, 201-209.

Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* *2*, 1042-1050.

Wang, J.W., and Wu, J.Y. (2004). Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant Cell Physiol.* *46*, 923-30.

Wang, X., Kang, D., Feng, S., Serino, G., Schwechheimer, C., and Wei, N. (2002). CSN1 N-terminal-dependent activity is required for Arabidopsis development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: A structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. *Mol. Biol. Cell* *13*, 646-655.

Wang, X.-Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science* *292*, 2070-2072

- Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., and Ryals, J. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- Wassenegger, M. and Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* 11, 142-151.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 72, 165-221
- Waterhouse, P.M., Wang, M.-B, and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., and Thordal-Christensen, H. (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol. Biol.* 36, 101-112.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 449-455.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14, 1937-51.
- Wiermer, M., Feys, B.J., and Parker, J.E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opin. Plant Biol.* 8, 383-389.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T.X., Coleman, M., and Turner, J.G. (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* 291, 118-120.
- Xiao-Yi, S.; Zhi-Long, W., and Daoxin, X. (2007). Jasmonate Signal Pathway in *Arabidopsis*. *J.Int. Plant Biol.* 49, 81-86.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2, 642-652.

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D. (2002). The SCFCOII ubiquitin–ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* *14*, 1919-1935.

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D., and Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* *15*, 706-718.

Yoshioka, H., Shiraishi, T., Yamada, K., Ichinose, Y., and Oku H. (1990). Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* *31*, 1139-1146.

Yun, M.H., Torres, P.S., El Oirdi, M., Rigano, L.A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Dankert, M.A., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiol.* *141*, 178-187

Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inzé, D., Delledonne, M., and Van Breusegem, F. (2006). Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* *141*, 404-411.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* *101*, 25-33.

Zeidler, D., Zaehring, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Jutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 15811-15816.

Zhang, B., Chen, W., Foley, R.C., Buttner, M., and Singh, K.B. (1995). Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *Plant Cell* *7*, 2241-2252.

Zhang, W., He, S.Y., and Assmann S.M. (2008). The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J.* *56*, 984-96.

Zhao, J., Davis, L.C., and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* *23*, 283-333

Zhou, F., Zhang, Z., Gregersen, P.L., Mikkelsen, J.D., de Neergaard, E., Collinge, D.B., and Thordal-Christensen H. (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* *117*, 33-41.

Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2751-27