

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Matthieu TOUCHARD

Le 13 Décembre 2019

**Caractérisation de la perception racinaire et de la résistance systémique
induite par les rhamnolipides et leurs précurseurs chez *Arabidopsis thaliana***

Thèse dirigée par **FABIENNE BAILLIEUL, STÉPHAN DOREY ET SYLVAIN CORDELIER**

JURY

Mme Élodie Gaulin	Maître de Conférences HDR, Université de Toulouse III	Rapporteur
Mme Monica Höfte	Professeur, Université de Ghent	Rapporteur
M. Benoît Poinssot	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Mme Fabienne Baillieul	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Directeur de thèse
M. Stéphan Dorey	Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-encadrant
M. Sylvain Cordelier	Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-encadrant

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Matthieu TOUCHARD

Le 13 Décembre 2019

**Caractérisation de la perception racinaire et de la résistance systémique
induite par les rhamnolipides et leurs précurseurs chez *Arabidopsis thaliana***

Thèse dirigée par **FABIENNE BAILLIEUL, STÉPHAN DOREY ET SYLVAIN CORDELIER**

JURY

Mme Élodie Gaulin	Maître de Conférences HDR, Université de Toulouse III	Rapporteur
Mme Monica Höfte	Professeur, Université de Ghent	Rapporteur
M. Benoît Poinssot	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
Mme Fabienne Baillieul	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Directeur de thèse
M. Stéphan Dorey	Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-encadrant
M. Sylvain Cordelier	Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-encadrant

Caractérisation de la perception racinaire et de la résistance systémique induite par les rhamnolipides et leurs précurseurs chez *Arabidopsis thaliana*

Dans leur environnement, les plantes sont fréquemment soumises à des attaques de microorganismes pathogènes. Pour leur faire face, elles mettent en place des mécanismes de défense activés suite à la détection du microorganisme via des motifs moléculaires ou IPs (Invasion Patterns). Les rhamnolipides (RLs) sont des molécules glycolipidiques amphiphiles produites par des bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Ces molécules sont capables d'induire, au niveau foliaire chez différentes plantes, une résistance locale contre des microorganismes phytopathogènes. L'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0), le constituant de base de la partie lipidique des RLs, active aussi une réponse immune dans la partie aérienne de la plante *Arabidopsis thaliana*. Cette réponse immune est déclenchée suite à sa perception par le récepteur kinase S-lectine LORE. Les travaux menés au cours ce projet de thèse ont permis de mettre en évidence que le 3-OH-C10:0 est perçu au niveau racinaire par LORE, conduisant à l'activation d'une réponse immune innée et à la mise en place d'une résistance systémique (ISR) efficace contre le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. D'autre part, ces travaux ont révélés que les RLs sont aussi perçus au niveau racinaire et activent une ISR contre *B. cinerea* n'impliquant pas le récepteur LORE. L'ensemble de ces résultats montrent que les RLs ainsi que le 3-OH-C10:0, sont deux IPs reconnus par *A. thaliana* au niveau racinaire via des mécanismes indépendants et tous deux conduisant à l'activation d'une résistance systémique.

Immunité végétale, Rhamnolipides, mc-3-OH-FA, Perception racinaire, Résistance systémique induite, *Arabidopsis thaliana*

Characterization of root perception and induced systemic resistance by rhamnolipids and their precursors in *Arabidopsis thaliana*

In their environment, plants are frequently challenged by pathogenic microorganisms. Plants are able to trigger an innate immune response to fight against the infection. This immune response is activated after perception of the microorganisms through Invasion Patterns (IPs). Rhamnolipids (RLs) are amphiphilic glycolipidic molecules produced by some bacterial species including *Pseudomonas* and *Burkholderia*. RLs are able to induce an immune response in the aerial part of several plant which is effective against phytopathogens. 3-hydroxydecanoic acid (3-OH-C10:0), a lipid building block from RLs, is known to trigger *Arabidopsis thaliana* immune responses in leaves after its perception by the bulb-type lectin receptor kinase LORE. In the present work, we showed that the 3-OH-C10:0 is also sensed by roots through LORE, triggering local immune responses and a systemic induced resistance (ISR) effective against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. In addition, this work revealed that RLs are also recognized by root cells, activating a LORE-independent ISR against *B. cinerea*. This work shows that RLs and 3-OH-C10:0 are different IPs independently recognized by *A. thaliana* roots but both inducing a systemic resistance in plants.

Plant immunity, Rhamnolipids, mc-3-OH-FA, Root perception, Induced systemic resistance, *Arabidopsis thaliana*

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

Unité de Recherche Résistance Induite et Bio-protection des Plantes - EA 4707

Campus du Moulin de la Housse – Bâtiment 18

BP 1039 – 51687 Reims Cedex 2, France

Table des matières

ABREVIATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
PREAMBULE	11
INTRODUCTION	17
PARTIE 1 - LES DEFENSES DES PLANTES.....	19
I- Les défenses constitutives	19
1) Les défenses physiques	19
2) Les défenses biochimiques	21
II- Les défenses induites	25
1) Perception	25
a. Le modèle en Zig-Zag.....	25
b. Perception membranaire	27
2) Activation de réponses immunitaires précoces.....	29
a. Influx calcique et production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène	29
b. Activation de cascades de phosphorylations	31
c. Fermeture des stomates	33
3) Signalisation hormonale	33
4) Mise en place de mécanismes de défense durables	39
a. Les protéines « Pathogenesis-Related ».....	39
b. Les phytoalexines	39
c. Renforcement de la paroi par apposition de callose.....	41
d. Résistance locale et HR	41
III- Résistance Systémique Acquisée (SAR).....	43
PARTIE 2 - CAS PARTICULIER DES DEFENSES SOUTERRAINES	49
I- Les défenses constitutives des racines.....	51
1) Les défenses physiques	51
2) Les défenses biochimiques	51
II- Les défenses racinaires induites	53
III- Compartimentalisation de la réponse racinaire	57
1) Protection de la zone d'élongation.....	57
2) Protection de la zone méristématique	59
IV- Contournement de la réponse immunitaire racinaire	61
V- Rôle du microbiome rhizosphérique	67
1) Des microorganismes bénéfiques.....	67
a. Effets directs.....	69
b. Effets indirects.....	69
2) Résistance Systémique Induite (ISR).....	71
3) Priming	75
a. Modifications moléculaires	75
b. Modifications épigénétiques	77
c. Héritabilité du priming	79
PARTIE 3 - DES IPS AMPHIPHILES.....	81
I- Les lipopeptides (LPs)	81
II- Les lipopolysaccharides (LPS)	83
III- Les Rhamnolipides (RLs)	85
1) Biosynthèse et activités biologiques des rhamnolipides	85
2) Utilisations des RLs	89
3) Les RLs induisent l'immunité végétale.....	90
IV- Les acides gras à chaînes moyennes (mc-3-OH-FAs), une brique commune aux LPs, LPS et RLs.....	91
OBJECTIFS DE LA THESE	95

CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DE LA REPONSE RACINAIRE A L'ACIDE 3-HYDROXYDECANOÏQUE CHEZ A. THALIANA ET MISE EN EVIDENCE DE L'INDUCTION D'UNE ISR CONTRE B. CINEREA	99
CONTEXTE	101
PUBLICATION	103
CONCLUSION	157
EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES – RESULTATS ET DISCUSSION	159
I- Effet dose du 3-OH-C10:0 sur les racines d'A. thaliana	159
II- Implication du facteur de transcription AtMYB72 dans l'ISR induite par le 3-OH-C10:0	159
III- Expression de gènes	161
IV- Visualisation de l'effet racinaire du 3-OH-C10:0 par microscopie	161
V- L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 se traduit-elle par des réponses foliaires de défense?	165
VI- Le HAA-C10:10 active une ISR contre B. cinerea et des dépôts de callose au niveau racinaire	167
VII- Conclusion	169
CHAPITRE 2 – PERCEPTION RACINAIRE DES RHAMNOLIPIDES ET INDUCTION D'UNE ISR	171
CONTEXTE	173
RESULTATS	173
I- Le Di-RL active une ISR contre B. cinerea	173
II- Activation d'évènements de signalisation de l'immunité	173
1) Production extracellulaire de ROS	175
2) Phosphorylation des MAPK	175
3) Dépôts racinaires de callose	175
4) Augmentation de la conductivité extracellulaire	177
III- Modifications du transcriptôme	177
IV- Implications de voies de signalisations hormonales, de PAD3 et de MYB72 dans l'ISR induite par le Di-RL	177
V- Induction d'une ISR contre Pst DC3000 ?	179
VI- Tests de protection sur tomates contre B. cinerea	179
DISCUSSION	183
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	191
MATERIEL ET METHODES	203
LE MATERIEL BIOLOGIQUE	205
I- Le matériel végétal	205
1) A. thaliana	205
a. Culture hydroponique	205
b. Culture in vitro	205
c. Culture sur terreau	205
2) Tomate	207
a. Culture hydroponique	207
b. Culture sur terreau	207
II- Les agents pathogènes	207
1) Botrytis cinerea	207
2) Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000	207
LES ELICITEURS	207
LES TESTS DE PROTECTION	209
I- Tests de protection contre Botrytis cinerea	209
1) Sur A. thaliana	209
2) Sur tomate	209
II- Tests de protection contre Pst DC3000	211
MESURE DE LA PRODUCTION DE ROS	211
PHOSPHORYLATION DES MAPK (MAPK3 ET MAPK6)	213

VISUALISATION DES DEPOTS DE CALLOSE.....	213
TEST DE CONDUCTIVITE (MORT CELLULAIRE).....	213
QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE GENES.....	215
I- Séquençage RNAseq.....	215
II- Analyse qRT-PCR.....	215
COLORATION GUS.....	217
VISUALISATION DE LA PRODUCTION DE ROS PAR MICROSCOPIE.....	217
ANALYSES STATISTIQUES	219
BIBLIOGRAPHIE	221
ANNEXE 1 : APOPLASTIC INVASION PATTERNS TRIGGERING PLANT IMMUNITY: PLASMA MEMBRANE SENSING AT THE FRONTLINE	249
ANNEXE 2 : COMPOSITION DU RLSEC.....	267

Abréviations

3-OH-C10:0 : Acide 3-hydroxydécanoïque

A

ABA : Acide Abscissique

ACC : 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNex : ADN extracellulaire

AGP : *Arabinogalactans Proteins*

AIA : Acide Indole Acétique

ARN : Acide RiboNucléique

AzA : Acide Azaléïque

B

BABA : Acide β -Amino-Butyrique

BAK1 : *Brassinosteroid receptor Associated Kinase 1*

BC : *Border Cells*

BIK1 : *Botrytis-Induced Kinase 1*

BLC : *Border-Like Cells*

BSMT1 : *Benzoic acid / SA carboxyl MethylTransferase 1*

C

CaM : Calmoduline

CBL : *Calcineurin B-Like protein*

Cd : Cadmium

cDNA : ADN complémentaire

CDPK : *Calcium-Dependent Protein Kinase*

CFU : *Colony Forming Unit*

CoA : Coenzyme A

COI1 : *Coronatine Insensitive 1*

COR : Coronatine

COS : Core OligoSaccharidique

CWDE : *Cell Wall Degrading Enzymes*

CYP : Cytochrome P450

D

DAMPs : *Damage-Associated Molecular Pattern*

DAPG : 2,4-diacétylphloroglucinol
DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane
DHCA : Acide dihydrocamalexique
di-RL : Di-rhamnolipide
DIR1 : *Defective in Induced Resistance 1*
dTDP : Désoxythymidine diphosphate

E

ERF : *Ethylene-Responsive element binding Factor*
ET : Éthylène
ETI : *Effector-Triggered Immunity*
ETS : *Effector-Triggered Susceptibility*
exDNase : Désoxyribonucléase extracellulaire

F

FA : *Fatty Acid*
FGP1 : *Fungal Glucan-Binding 1*
FMO1 : *Flavin-Dependent-Monoxygenase 1*

G

G3P : Glycérol-3-Phosphate
GECI : *Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators*
GIPC : Glycosylinositol phosphorylcéramide
GSL5 : *Glucan Synthesis-Like 5*

H

HAA : Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque
HAMP : *Herbivore-Associated Molecular Pattern*
HDA : Histones DéAcétylase
HIR : *Herbivory Induced Resistance*
HR : *Hypersensitive Response*

I

IAN : Indole-3-AcétONitrile
IAOx : Indole-3-AcétalDOxime
ICS1/SID2 : Isochorismate Synthase 1
IP : *Invasion Pattern*
IPR : *Invasion Pattern Receptor*
ISR : *Induced Systemic Resistance*

J

JA : Acide Jasmonique

JA-Ile : JA-Isoleucine

JAZ : *Jasmonate ZIM Domain*

L

LORE : *LipoOligosaccharide-specific Reduced Elicitation*

LOX : Lipoxygénase

LPs : Lipopeptides

LPS : Lipopolysaccharides

M

MAMP : *Microbe-Associated Molecular Pattern*

MAP : *Mitogen-Activated Protein*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAPKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*

MAPKKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*

MAR : Méristème Apical Racinaire

mc-3-OH-FA : acide gras 3-hydroxy à chaîne moyenne

MeJA : méthyl-jasmonate

MES : Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique

MeSa : Salicylate de méthyle

MKS1 : *MPK4 Substrate 1*

mono-RL : Mono-rhamnolipide

MS : *Murashige and Skoog medium*

MTI : *MAMP-Triggered Immunity*

N

NAMP : *Nematode-Associated Molecular Pattern*

NET : *Neutrophil Extracellular Trap*

NHP : acide N-HydroxyPipécolique

Ni : Nickel

NLP : *Necrosis and ethylene-inducing Peptide 1-Like*

NLR : *Nucleotide-binding site Leucine-rich Repeat*

NO : Monoxyde d'azote

NPR1 : *Non-expresser of PR genes 1*

NRPS : *Non-Ribosomal Peptide Synthetase*

O

OPDA : Acide 12-oxo-phytodienoïque

OPS : O-PolySaccharide

P

PA : Acide Phosphatidique

PAD3 : *Phytoalexin-Deficient 3*

PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase

PCD : *Programmed Cell Death*

PDA : *Potato Dextrose Agar*

PGIP : *Polygalacturonase-Inhibiting Protein*

PGN : Peptidoglycane

PGPF : *Plant Growth Promoting Fungus*

PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

Pip : Acide pipécolique

PM : Plasmodesme

PR : *Pathogenesis-Related*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

Pst DC3000 : *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

Q

qRT-PCR : *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

R

RBOHD : *Respiratory Burst Oxidase Homolog D*

RK : *Receptor Kinase*

RL : Rhamnolipide

RLP : *Receptor-Like Protein*

RLU : *Relative Light Units*

RLsec : Sécrétome de *Pseudomonas aeruginosa* enrichi en RLs

ROS : *Reactive Oxygen Species*

S

SA : Acide Salicylique

SABP2 : *SA-Binding Protein 2*

SAR : *Systemic Acquired Resistance*

SARD4 : *SAR-deficient 4*

SDP : Stimulateur de Défense des Plantes

SE : Erreur Standard

SRB : *Synthetic Rhamnolipid Bolaform*

T

TIPK : *Trichoderma-Induced Protein Kinase*

W

WT : *Wild Type*

Table des illustrations

Figure In-1 : Représentation du modèle en Zig-Zag décrit par Jones et Dangl (2006).	24
Figure In-2 : Représentation schématique des événements précoces et tardifs induits par la perception d'un IP.	28
Figure In-3 : Voie de biosynthèse de la camalexine.	40
Figure In-4 : Modèle représentant les événements moléculaires conduisant à la mise en place de la SAR.	44
Figure In-5 : Coupes Transversales (CT) de racines colorées au carmin-vert d'iode.	50
Figure In-6 : Quatre zones racinaires.	56
Figure In-7 : Modèle d'expression cellulaire et tissulaire du récepteur FLS2 chez <i>A. thaliana</i> .	58
Figure In-8 : Des cellules bordantes participent à la protection de la zone méristématique.	58
Figure In-9 : Modèle schématique représentant les voies de transduction de la SAR, induite par des agents pathogènes, et de l'ISR, induite par des microorganismes PGPR ou PGPF, chez <i>A. thaliana</i> . Figure adaptée de Pieterse <i>et al.</i> (2002).	70
Figure In-10 : Structure de Lipopeptides de <i>Bacillus subtilis</i> .	80
Figure In-11 : Structure de LPS de bactéries Gram négatif (ici <i>P. aeruginosa</i>).	82
Figure In-12 : Voie de biosynthèse des RLs chez <i>P. aeruginosa</i> proposé par Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> (2014).	86
Figure In-13 : Modèle proposé par Nickzad et Déziel (2014) représentant l'implication des rhamnolipides dans les différents stades de développement du biofilm.	86
Figure In-14 : Les RLs augmentent l'efficacité de traitements phytosanitaires.	88
Figure In-15 : Modèle représentant les voies hormonales induites par les RLs impliquées dans la résistance d' <i>A. thaliana</i> contre des agents pathogènes biotrophes, hémibiotrophes et nécrotrophes.	90
Figure In-16 : L'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0), une brique commune aux LPS, LPs et RLs.	90
Figure In-17 : Modèle de perception du sécrétome enrichi en RLs de <i>P. aeruginosa</i> chez <i>A. thaliana</i> . Figure issue de Schellenberger, 2019.	92
Figure C1-1 : Différentes concentrations de 3-OH-C10:0 induisent des dépôts de callose sur les racines d' <i>A. thaliana</i> .	158
Figure C1-2 : Effet dose du 3-OH-C10:0 sur la phosphorylation des MAPK.	158
Figure C1-3 : L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 est dépendante du facteur de transcription AtMYB72.	160
Figure C1-4 : Le 3-OH-C10:0 n'induit pas de modification précoce de l'expression du gène AtMYB72 dans les racines.	160
Figure C1-5 : Le 3-OH-C10:0 induit la sur-régulation LORE-dépendante du gène AtCYP71A12.	160
Figure C1-6 : Visualisation au microscope optique de l'expression du gène reporter GUS des lignées d' <i>A. thaliana</i> transgéniques AtCYP71A12 _{pro} :GUS, AtMYB51 _{pro} :GUS et AtWRKY11 _{pro} :GUS.	162
Figure C1-7 : Visualisation de la production racinaire de ROS en microscopie.	162
Figure C1-8 : L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 se traduit-elle par l'induction de l'expression de gènes de défense au niveau foliaire ?	164
Figure C1-9 : Le HAA-C10:0 induit chez <i>A. thaliana</i> une ISR contre <i>B. cinerea</i> .	166
Figure C1-10 : Le HAA-C10:10 induit des dépôts de callose sur les racines d' <i>A. thaliana</i> .	166
Figure C2-1 : Un RLsec induit chez <i>A. thaliana</i> une ISR contre <i>B. cinerea</i> .	172
Figure C2-2 : Le Di-RL induit chez <i>A. thaliana</i> une ISR contre <i>B. cinerea</i> .	172
Figure C2-3 : Les RLs n'induisent pas de production de ROS sur les racines d' <i>A. thaliana</i> .	174
Figure C2-4 : Le RLsec active la phosphorylation LORE-dépendante des MAPK6 chez <i>A. thaliana</i> .	174
Figure C2-5 : Le Di-RL induit des dépôts de callose sur les racines d' <i>A. thaliana</i> .	174
Figure C2-6 : Les RLs à forte concentration induisent une augmentation de la conductivité extracellulaire sur racines d' <i>A. thaliana</i> .	176
Figure C2-7 : Le Di-RL n'induit pas de modifications du transcriptôme des racines.	176
Figure C2-8 : L'ISR induite par le Di-RL est dépendante des voies de signalisation du SA et du JA et des gènes PAD3 et MYB72.	178
Figure C2-9 : Le 3-OH-C10:0, le RLsec et le Di-RL n'induisent pas d'ISR contre <i>Pst</i> DC3000.	178

Figure C2-10 : Le 3-OH-C10:0 et les RLs n'induisent pas d'ISR contre <i>Pst</i> DC3000 sur des plants d' <i>A. thaliana</i> cultivés sur terreau.....	180
Figure C2-11 : Les RLs induisent chez la tomate une ISR contre <i>B. cinerea</i> , ce qui n'est pas le cas du 3-OH-C10:0.	180
Figure CP-1 : Résumé des principaux résultats. Les RLs et leurs constituants lipidiques, perçus selon deux mécanismes distincts, activent chez <i>A. thaliana</i> une ISR contre <i>B. cinerea</i>	200
Figure Mm-1 : Culture hydroponique de tomates et réalisation de tests de protection.	208
Tableau In-1 : Diversité des protéines PR et leurs propriétés (Sels et al., 2008; Van Loon et al., 2006; Van Loon and Van Strien, 1999).....	38
Tableau Mm-1 : Composition des solutions nutritives Flora Series (GHE, France).....	204
Tableau Mm-2 : Liste des amorces utilisées pour le suivi de gènes par qRT-PCR.....	216

Préambule



De tout temps, l'agriculture a joué un rôle prépondérant dans le développement des civilisations. Avec l'accroissement et la densification des populations, le besoin d'augmenter et de maîtriser les rendements des productions agricoles est devenu un enjeu vital. Les plantes, organismes fixés, sont en effet la cible de nombreux organismes ravageurs et agents pathogènes, responsables de pertes de rendements, ou même, dans les cas les plus extrêmes, de destruction totale des récoltes. Du soufre aurait ainsi été utilisé dès l'an 1000 avant J.-C en Grèce comme agent de fumigation (son usage est mentionné dans les œuvres d'Homère). La découverte des propriétés toxiques, notamment insecticides, de plantes comme l'aconit ou le tabac a marqué une avancée importante en matière de contrôle des ravageurs des plantes. L'essor de la chimie minérale au XIX^{ème} siècle a permis l'apparition de pesticides à base de cuivre, comme la très connue « bouillie bordelaise » pour lutter contre le mildiou de la vigne, mais aussi à base de mercure, utilisés pour le traitement des semences, ou encore des insecticides à base d'arsenic comme l'arséniate de plomb ! Une nouvelle étape est franchie pendant l'entre-deux guerres avec le développement de la chimie organique et la conception de nombreux pesticides de synthèse, dont le coût est relativement faible. Le DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) fut ainsi utilisé massivement pour ses propriétés insecticides contre divers insectes vecteurs de maladies (comme le paludisme ou la peste bubonique) et ravageurs de plantes (comme le doryphore qui fait des ravages sur les cultures de pommes de terre). Son utilisation a été interdite dans les années 1970 en raison de son impact sanitaire et environnemental considérable et de sa persistance dans les milieux, on en retrouve encore malgré tout aujourd'hui dans les sols (Silva et al., 2019). Durant la Seconde Guerre Mondiale un herbicide dérivé d'une hormone végétale est synthétisé, l'Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Cet herbicide sélectif des Dicotylédones permet alors de désherber les cultures céréalières sans risque pour les cultures. Il sera aussi utilisé par l'armée américaine pour ses propriétés défoliantes comme arme chimique lors de la Guerre du Viêt Nam. De nombreux autres pesticides de synthèse existent et sont encore massivement utilisés aujourd'hui. Depuis les années 1960, grâce à l'usage massif de produits phytosanitaires, de fertilisants, de l'irrigation... les rendements mondiaux en blé, riz et maïs ont plus que doublé (Oerke, 2006). Aujourd'hui, dans le monde 3 milliards de tonnes de produits phytosanitaires sont consommées chaque année, pour un marché total de 40 milliards de dollars (Silva et al., 2019).

À l'échelle européenne, la France est au premier rang par la surface agricole utile devant l'Espagne et l'Allemagne, et développe la plus importante production au niveau européen dont la valeur s'élève à 71 milliards d'euros, soit 19 % de la production européenne. En termes de quantités de substances actives vendue, la France se situe au deuxième rang européen (*Plan EcoPhyto II+*, 2018). Malgré les avantages procurés par les produits phytosanitaires en termes de rendements, leur utilisation massive pose de nombreux problèmes de santé publique et environnementaux. La plupart de ces produits sont très toxiques pour l'homme. Il est estimé que les patients atteints de cancer suite à un empoisonnement aux pesticides représentent 10 % du nombre total des patients atteints d'un cancer (Zhang et al., 2011).

Afin de réduire les risques liés à la consommation de produits phytosanitaires, un plan d'action national a été lancé en 2008, le Plan EcoPhyto I, qui avait pour objectif de réduire de 50 % l'usage des produits phytosanitaires dans un délai de 10 ans. Cet objectif n'ayant pas été atteint, il est réaffirmé en 2015 avec le Plan EcoPhyto II qui vise désormais à atteindre une réduction de 25 % à l'horizon 2020, puis une réduction de 50 % à l'horizon 2025 (*Plan EcoPhyto II+*, 2018). Pour atteindre

cet objectif, le Plan EcoPhyto II envisage de favoriser la recherche et le recours à des techniques innovantes de protection des cultures. Parmi ces pistes, le biocontrôle constitue l'une des plus prometteuses. Le biocontrôle est défini comme « un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels » (www.agriculture.gouv.fr). Les agents de biocontrôle sont classés en quatre catégories :

- Les macroorganismes (insectes, nématodes)
- Les microorganismes (virus, bactéries, champignons)
- Les médiateurs chimiques (phéromones)
- Les substances naturelles d'origine minérale, végétale ou animale.

Les stimulateurs de défense des plantes (SDP) sont ainsi des substances, molécule ou mélange de molécules, d'origine naturelle ou synthétique, organique ou minérale, ou des microorganismes non pathogènes capables de stimuler la résistance de plantes traitées à des bio-agresseurs (www.elicitra.org). Ces molécules stimulent pour cela les capacités de défense naturelles de la plante, lui permettant d'accroître sa capacité de résistance. Certains SDP sont aussi efficaces que des fongicides, comme c'est le cas par exemple contre l'oïdium du blé, mais généralement leur efficacité est encore bien inférieure à celle des produits phytopharmaceutiques « classiques » (Pierucci and Ridet, 2015). De nombreuses voies sont à l'étude pour identifier des leviers permettant d'optimiser l'efficacité des SDP. Les produits phytopharmaceutiques sont eux-mêmes souvent associés à des adjuvants comme des surfactants afin d'en améliorer l'efficacité. Ces composés améliorent la solubilité dans l'eau des substances actives (souvent hydrophobes), facilitent leur adhésion aux surfaces foliaires (Liu et al., 2016) et améliorent leur stabilité dans le temps (Castro et al., 2013). Les biosurfactants, sont des surfactants d'origine naturelles. Ils présentent l'avantage d'être moins toxiques que des surfactants de synthèse et d'être biodégradables. L'adjonction de biosurfactants à la formulation de SDP pourrait ainsi être une alternative intéressante en vue d'améliorer l'efficacité de ces composés sans y ajouter de substance de synthèse. D'autre part, des biosurfactants sont connus pour leur capacité propre à stimuler les défenses des plantes. C'est le cas des rhamnolipides, biosurfactants produits par des bactéries, qui stimulent la résistance de plusieurs plantes, notamment des plantes d'intérêt agronomique, la vigne (*Vitis vinifera*) (Varnier et al., 2009) et le colza (*Brassica napus*) (Monnier et al., 2018), contre des agents pathogènes. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction des défenses par ces rhamnolipides pourra permettre d'optimiser leurs propriétés élicitrices et d'améliorer leur efficacité au champ.

Dans ce contexte ma thèse fait suite au projet RhamnoproT qui visait à identifier et caractériser les protéines impliquées dans la perception foliaire des rhamnolipides chez la plante modèle de laboratoire *Arabidopsis thaliana*.

Mon projet de thèse, financé par le région Grand-Est et le Fond Européen de Développement Régional (FEDER), vise quant à lui à caractériser la réponse racinaire et à identifier les mécanismes impliqués dans la réponse de la racine à ces molécules.

Introduction



Partie 1 - Les défenses des plantes

Par leur mode de vie fixé, les plantes sont exposées en continu à de nombreuses sources de stress, biotiques et/ou abiotiques. Les plantes sont des organismes autotrophes qui produisent leur propre énergie grâce à la réaction de photosynthèse à partir de l'énergie lumineuse. Elles sont ainsi à la base des régimes trophiques. Les organismes hétérotrophes herbivores ne peuvent produire leur propre énergie. Ils consomment donc les molécules organiques produites par les organismes autotrophes, et constituent eux-mêmes la source d'énergie de réseaux trophiques supérieurs.

Les stress biotiques soumis aux plantes sont donc provoqués par les organismes hétérotrophes qui utilisent la plante comme source d'énergie.

Au cours de l'évolution, les plantes ont donc développé diverses stratégies pour se défendre face à ces agresseurs. Contrairement aux mammifères, elles ne possèdent pas de cellules mobiles de défense. Leur défense repose donc sur l'immunité innée de chaque cellule et sur des signaux moléculaires diffusant systématiquement à partir du site d'infection. Elles sont ainsi capables, au niveau cellulaire, de percevoir une attaque d'agent pathogène, ou de ravageur et de répondre en activant des mécanismes de défense. Cependant, l'activation de ces mécanismes de défense à un coût important pour la plante, provoquant une réduction de sa biomasse et de sa production de graines (Bacete et al., 2018). Par conséquent, les mécanismes de défense des plantes sont divisés en 2 catégories, les défenses constitutives, qui sont toujours présentes et dont le coût pour la survie est faible, et les défenses induites, qui ne sont activées que lorsqu'un bio-agresseur est détecté et qui présentent un coût important. Ces différents mécanismes sont détaillés par la suite.

I- Les défenses constitutives

Les défenses constitutives constituent la première ligne de défense de la plante contre ses attaquants. Leur objectif est de limiter le nombre d'attaquants possibles, puisque seuls ceux capables de pénétrer ces défenses poseront de réels problèmes à la plante, et de retarder la pénétration des tissus par des organismes compatibles, accordant dans certains cas un délai nécessaire à la mise en place des défenses induites.

1) Les défenses physiques

La surface des plantes est recouverte d'une couche tissulaire, l'épiderme dont le rôle est de protéger la plante contre le milieu extérieur et contre des attaques d'organismes phytophages. Cet épiderme est souvent recouvert d'une cuticule constituée de cires, de cutine, de métabolites secondaires qui augmente la tolérance de la plante à la dessiccation, aux UV et empêche la pénétration d'agents pathogènes dans les tissus (Fernández et al., 2017; Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

L'épiderme comporte souvent des structures particulières comme des épines protégeant la plante contre des organismes herbivores, ou des poils, des trichomes qui limitent l'accès des insectes à la surface des feuilles, limitent leurs déplacements ou empêchent la ponte (Xing et al., 2017). Certaines plantes possèdent des trichomes glanduleux qui portent des glandes productrices de composés volatiles ou non volatiles pouvant avoir un rôle direct sur les insectes, par leur toxicité ou leur viscosité (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Certaines espèces de plantes appartenant notamment à la famille des Euphorbiacées et des Papaveracées possèdent des canaux lactifères dans lesquels sont stockés des latex. Les latex sont des fluides laiteux plus ou moins épais qui contiennent de nombreux composés de défense, des terpénoïdes, des alcaloïdes comme la morphine, le principal alcaloïde du latex du pavot somnifère (*Papaver somniferum*) ou des inhibiteurs de protéases. Ces composés sont toxiques, antinutritionnels pour les herbivores ou simplement collants. La blessure de la plante et la rupture des canaux lactifères expose les organismes herbivores à ces composés (Agrawal and Konno, 2009; Mithöfer and Boland, 2012).

La paroi des cellules végétales elle-même constitue une barrière qui empêche la pénétration d'agents pathogènes. L'altération de la composition de la paroi, de sa teneur en pectines, celluloses, hémicelluloses, affecte la sensibilité de la plante à ses agresseurs (Bacete et al., 2018). Les agents pathogènes adaptés sécrètent alors des enzymes, des CWDE (*Cell Wall Degrading Enzymes*) pour dégrader les constituants de la paroi, leur permettant ainsi de pénétrer les tissus végétaux (Kubicek et al., 2014).

La cellule est capable de percevoir de diverses manières les altérations de sa paroi provoquées par un agent pathogène. Les cellules d'arabette (*Arabidopsis thaliana*) sont ainsi dotées de canaux mécano-sensibles permettant la perception de stimuli mécaniques ou la chute de la pression de turgescence, nécessaires pour l'induction de réponses induites par des dommages à la paroi (Bacete et al., 2018; Basu and Haswell, 2017; Hamilton et al., 2015).

Enfin, la paroi est aussi un réservoir de composés antimicrobiens dont certains sont libérés lors de sa dégradation (Miedes et al., 2014). Parmi les composés antimicrobiens présents de manière constitutive dans la paroi on peut citer les protéines PGIP (*Polygalacturonase-Inhibiting Protein*), capables de se lier spécifiquement à des polygalacturonases produites par des agents pathogènes ce qui a pour effet d'inhiber ces enzymes de dégradation des pectines de la paroi (Liu et al., 2017). Les défensines sont un autre exemple de composés antimicrobiens de la paroi, capables d'inhiber la croissance d'un large spectre de champignons phytopathogènes (Thomma et al., 2002).

2) Les défenses biochimiques

La plante est aussi capable de produire constitutivement des métabolites secondaires pour se défendre contre les organismes qui l'attaquent.

Ces molécules, appelées phytoanticipines, sont présentes dans la plante avant l'attaque ou produites après uniquement à partir de constituants préexistants (VanEtten et al., 1994). Elles peuvent être toxiques ou avoir des propriétés antinutritionnelles. Elles ont un spectre d'action plus ou moins large, certaines sont efficaces contre une large diversité d'organismes alors que d'autres sont spécifiques à un type d'attaquant.

Les molécules toxiques contre une grande diversité d'organismes sont souvent aussi toxiques contre la plante elle-même. Afin de réduire les risques d'auto-intoxication, de nombreux composés de défense sont alors stockés dans la vacuole des cellules (Doughari, 2015; Mithöfer and Boland, 2012; Piasecka et al., 2015). C'est le cas par exemple des alcaloïdes qui, pour la plupart, sont toxiques pour les vertébrés et les insectes herbivores. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés dans les racines et s'accumulent dans les parties aériennes de la plante. La caféine, produite par le caféier (*Coffea arabica*) est un exemple d'alcaloïde de défense qui présente un effet paralysant sur les insectes consommant la plante et un effet stimulant sur les vertébrés (Doughari, 2015). La colchicine, produite

par *Colchicum autumnale*, est un autre exemple d'alkaloïde toxique en raison de ses propriétés inhibitrices sur la mitose cellulaire (Mithöfer and Boland, 2012). D'autres alkaloïdes comme la nicotine se fixent sur des neurotransmetteurs et ont des effets neurotoxiques sur les insectes herbivores et les vertébrés. Les saponines sont un autre exemple de phytoanticipines. Ce sont des hétérosides, à propriétés notamment antifongiques, largement distribuées dans le règne végétal. Elles peuvent être réparties en trois catégories selon la nature de leur portion non-glucidique, qui peut être un triterpénoïde, un stéroïde ou un glycoalcaloïde stéroïdal (Osbourn, 1996).

D'autres composés antimicrobiens de défense présents constitutivement sont biologiquement inactifs. L'attaque de la plante par un agent pathogène provoque alors l'activation de ces composés et la production de dérivés toxiques. Les glucosinolates, molécules notamment produites par des plantes de la famille des Brassicacées, n'ont ainsi qu'une activité biologique limitée et nécessitent d'être activés par des enzymes appelées myrosinases (Bones and Rossiter, 1996). Mais ces enzymes sont spatialement séparées de leur substrat, ce qui protège la plante de la toxicité des produits de dégradation des glucosinolates. Les glucosinolates s'accumulent préférentiellement dans certains tissus, l'épiderme, les graines et au voisinage des vaisseaux phloémiens tandis que les myrosinases s'accumulent dans la vacuole de cellules particulières dispersées, les cellules dites « à myrosine » (Burow and Halkier, 2017). La blessure de la plante, sous l'action d'un organisme herbivore, provoque la mise en contact des enzymes et de leurs substrats. Les myrosinases hydrolysent alors les glucosinolates en intermédiaires instables qui forment spontanément divers composés actifs, principalement des nitriles et des isothiocyanates. Ces derniers sont parmi les produits de dégradation des glucosinolates les plus actifs et ont une activité biocide contre un large spectre d'organismes phytophages (Mithöfer and Boland, 2012). Il est intéressant de noter que les racines de certaines Brassicacées exsudent des glucosinolates dans la rhizosphère (Burow and Halkier, 2017). Les glucosinolates libérés dans le sol peuvent alors être dégradés en isothiocyanates. Le concept de biofumigation propose d'utiliser cette propriété des Brassicacées à produire des glucosinolates dans le sol pour réduire l'impact de microorganismes telluriques sur les cultures (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Pour cela, des cultures intermédiaires de ces plantes pourraient être implantées comme engrais vert avant une culture d'intérêt pour réduire la population d'organismes telluriques présents dans le sol qui auraient un effet négatif sur la culture suivante. Cette utilisation de Brassicacées comme engrais verts semble être une alternative prometteuse à l'utilisation de produits phytosanitaires de fumigation, hautement toxiques pour le milieu naturel comme pour les applicateurs. Les glucosides cyanogènes sont un autre exemple de composés constitutivement inactifs lorsqu'ils sont stockés dans la vacuole. L'exposition de ces composés à des glucosidases présentes dans le cytoplasme, suite à des dommages provoqués par exemple par un herbivore, provoque leur hydrolyse. Les produits de dégradation de ces glycosides cyanogènes sont instables et se décomposent en cyanure d'hydrogène (HCN), très toxique pour les herbivores car inhibant une enzyme clé du catabolisme mitochondrial (Sun et al., 2018). Certaines saponines produites constitutivement sont également biologiquement inactives. C'est le cas des avénacosides, saponines stéroïdales de l'avoine. Lors de l'attaque de la plante, une enzyme est produite, une avénacosidase, responsable de la dégradation de la molécule et la production d'un dérivé à propriété antifongique (Osbourn, 1996).

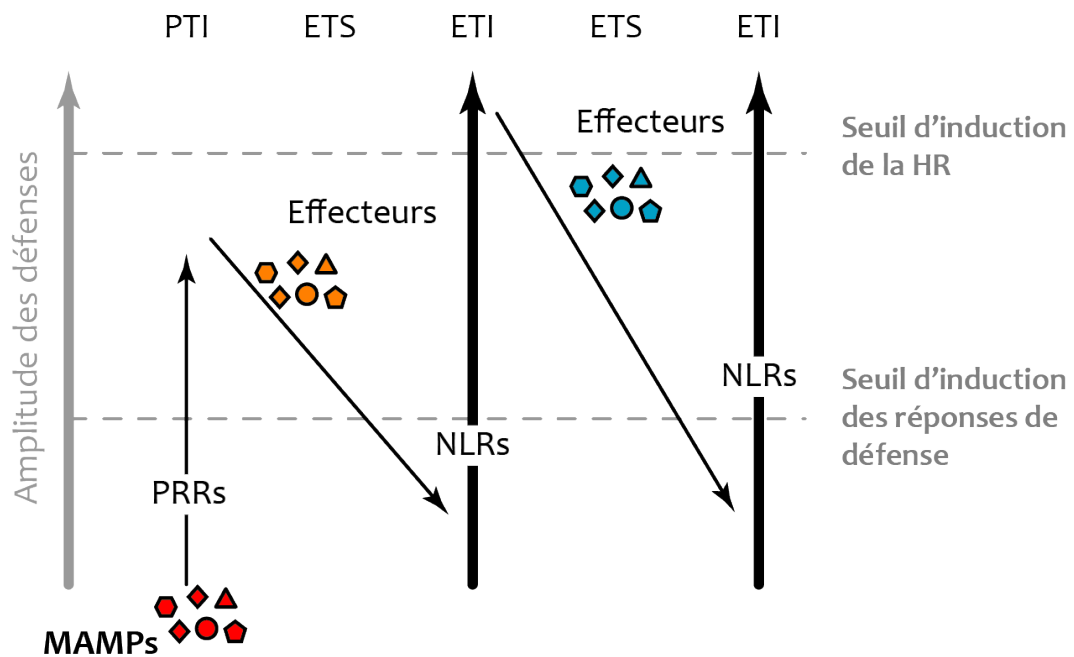


Figure In-1 : Représentation du modèle en Zig-Zag décrit par Jones et Dangl (2006).

Les MAMPs sont perçus par des PRRs et induisent la réaction de MTI se traduisant par l'induction de mécanismes de défense de faible amplitude. Au cours de l'évolution, les agents pathogènes ont acquis des effecteurs pour contourner la MTI et induire l'ETS. La plante a développé des NLR capables de percevoir les effecteurs et d'induire l'ETI. Les défenses induites ont alors une amplitude supérieure et peuvent notamment conduire à une HR. D'autres effecteurs peuvent ensuite bloquer l'ETI et rétablir l'ETS, et peuvent à leur tour être perçus par d'autres NLR et induire une nouvelle ETI. (Jones and Dangl, 2006).

II- Les défenses induites

1) Perception

a. *Le modèle en Zig-Zag*

La première ligne de défense de la plante formée par les défenses constitutives est facilement contournée par des organismes herbivores ou phytopathogènes. La diversité des stratégies de contournement de ces défenses est très importante ; certains organismes produisent des CWDE pour dégrader la paroi des cellules végétales et pénétrer dans les tissus, d'autres sont capables de détoxifier les composés antimicrobiens libérés lors de l'attaque de la plante.

En réponse à ces adaptations, les plantes ont élaboré au cours de l'évolution un système immunitaire basé sur la perception de molécules spécifiques de ces organismes ravageurs.

Le système immunitaire des plantes est souvent décrit suivant le modèle en zig-zag proposé en 2006 par Jones et Dangl (Figure In-1) (Jones and Dangl, 2006). Selon ce modèle, l'immunité végétale est divisée en trois phases. La première, appelée MTI pour *Microbe-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity* est basée sur la reconnaissance par la plante de signatures moléculaires spécifiques des microorganismes, les MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*). Ces MAMPs sont des molécules absentes de la plante mais très répandues chez les microorganismes, qu'ils soient pathogènes ou non, et qui sont nécessaires à leur survie (Boller and Felix, 2009). Le MAMP le mieux caractérisé est le peptide Flg22, l'épitope N-terminal de la flagelline qui est le monomère constituant le flagelle bactérien. Ce flagelle est une structure vitale pour la bactérie puisqu'il lui permet de se déplacer dans son milieu et de se fixer à la surface de ses cellules hôtes, ce qui en fait une cible privilégiée pour le système immunitaire des plantes.

Des signaux similaires aux MAMPs peuvent être issus de la plante elle-même en raison de dommages provoqués par une attaque d'organisme phytophage, les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), ou encore être issus d'insectes herbivores (HAMPs, *Herbivore-Associated Molecular Patterns*) ou de nématodes (NAMPs, *Nematode-Associated Molecular Patterns*) (Boller and Felix, 2009).

Ces éliciteurs (MAMPs, DAMPs, HAMPs ou NAMPs) sont reconnus par les cellules végétales grâce à des récepteurs membranaires, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). De nombreux PRRs ont déjà été mis en évidence pour leur capacité à fixer des MAMPs (Boutrot and Zipfel, 2017) (détaillés dans la Revue n°1 en annexe ; Schellenberger et al., 2019). La reconnaissance de ces molécules par les PRRs conduit à la mise en place d'une réponse de défense active qui tient en échec les agents pathogènes non adaptés. Les mécanismes moléculaires conduisant à la mise en place de cette immunité seront décrits par la suite.

Pour survivre et proliférer, les agents pathogènes doivent contourner cette première ligne de défense active. Les agents pathogènes adaptés ont ainsi développé la capacité à bloquer les réactions de défenses de la MTI grâce à la production de molécules appelées effecteurs (Bialas et al., 2017; Varden et al., 2017). À la différence des éliciteurs, présents chez une grande diversité d'organismes, les effecteurs sont généralement spécifiques d'une espèce ou d'une souche (Couto and Zipfel, 2016; Thomma et al., 2011). Ces molécules ont divers effets sur la cellule végétale. Certaines permettent à l'agent pathogène de détourner le métabolisme de la plante hôte, induisant l'activation ou

l'inhibition de processus cellulaires, d'autres ont pour effet de masquer l'agent pathogène, par exemple en séquestrant un MAMP prévenant ainsi sa détection par le/les PRR correspondants. L'effecteur HopM1 de *Pseudomonas syringae* est ainsi capable d'induire l'humidification de l'apoplaste en provoquant la dégradation de la protéine MIN7. Cette augmentation de la quantité d'eau dans l'apoplaste contribue à favoriser l'infection de la plante par la bactérie (Beattie, 2016). L'effecteur Ecp6 produit par le champignon pathogène de la tomate *Cladosporium fulvum*, est quant à lui capable de séquestrer la chitine, le polysaccharide majeur de la paroi fongique, empêchant ainsi la perception de ce MAMP par la plante (Paulus and van der Hoorn, 2018; Sánchez-Vallet et al., 2013). Cette seconde phase du modèle en zig-zag est appelée ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) puisqu'elle traduit la sensibilité de la plante à l'agent pathogène qui l'attaque par le biais d'effecteurs.

Poursuivant cette course à l'armement, la plante a développé de nouveaux récepteurs (généralement appelés « protéines de résistance ») capables de percevoir les effecteurs. Les effecteurs sont alors perçus par des NLR (*Nucleotide-binding site Leucine-rich Repeat*) cytosoliques (X. Zhang et al., 2017). Ces protéines de résistance activent alors l'ETI (*Effector-Triggered Immunity*) c'est-à-dire une réaction immunitaire déclenchée par les effecteurs. C'est le cas du NLR périphérique de la membrane plasmique d'*A. thaliana* RPM1. Ce NLR perçoit l'état de phosphorylation de la protéine RIN4 associée à la membrane plasmique qui est la cible d'effecteurs bactériens dont AvrB de *P. syringae*. RIN4 étant un régulateur négatif du système immunitaire, sa phosphorylation suite à la libération d'AvrB dans la cellule par plusieurs kinases limite l'activation du système immunitaire et favorise ainsi l'infection de la plante (Liu et al., 2011; Xu et al., 2017). La perception de l'altération de RIN4 par RPM1 restaure la résistance de la plante à la bactérie pathogène. En retour, l'agent pathogène peut contourner de nouveau cette résistance et restaurer l'ETS. Ce modèle en zig-zag prédit une coévolution continue au cours de laquelle la plante restaure l'ETI en acquérant de nouvelles protéines de résistance suivie par un nouveau contournement de cette résistance par l'agent pathogène.

Bien que ce modèle soit largement accepté par la communauté scientifique, il ne tient pas compte de tous les mécanismes de l'immunité des plantes décrits à ce jour. Notamment, certains effecteurs sont reconnus par des PRRs au lieu d'être perçus par des NLR cytosoliques (De Wit, 2016). En 2015, Cook *et al.* ont proposé un nouveau modèle de l'immunité des plantes basé sur la perception d'une attaque microbienne *via* la reconnaissance de facteurs d'invasion appelés *Invasion Patterns* (IPs), incluant éliciteurs (MAMPs, DAMPs, HAMPs et NAMPs) et effecteurs (Cook et al., 2015; Kanyuka and Rudd, 2019). Selon ce modèle, la MTI et l'ETI constituent un seul et même processus impliquant la perception des IPs par des IPRs (*Invasion Patterns Receptors*) et conduisant à l'induction de réponses de défense (*cf.* Revue n°1 en annexe). Afin d'éviter toute ambiguïté, nous utiliserons par la suite le terme général d'IP pour désigner toute molécule perçue par la plante comme signal de danger.

b. Perception membranaire

La plupart des IPs apoplastiques identifiés à ce jour sont perçus par des PRRs. Cette interaction entre un IP et un ou plusieurs PRR spécifiques est la première étape conduisant à la mise en place de la réponse immunitaire.

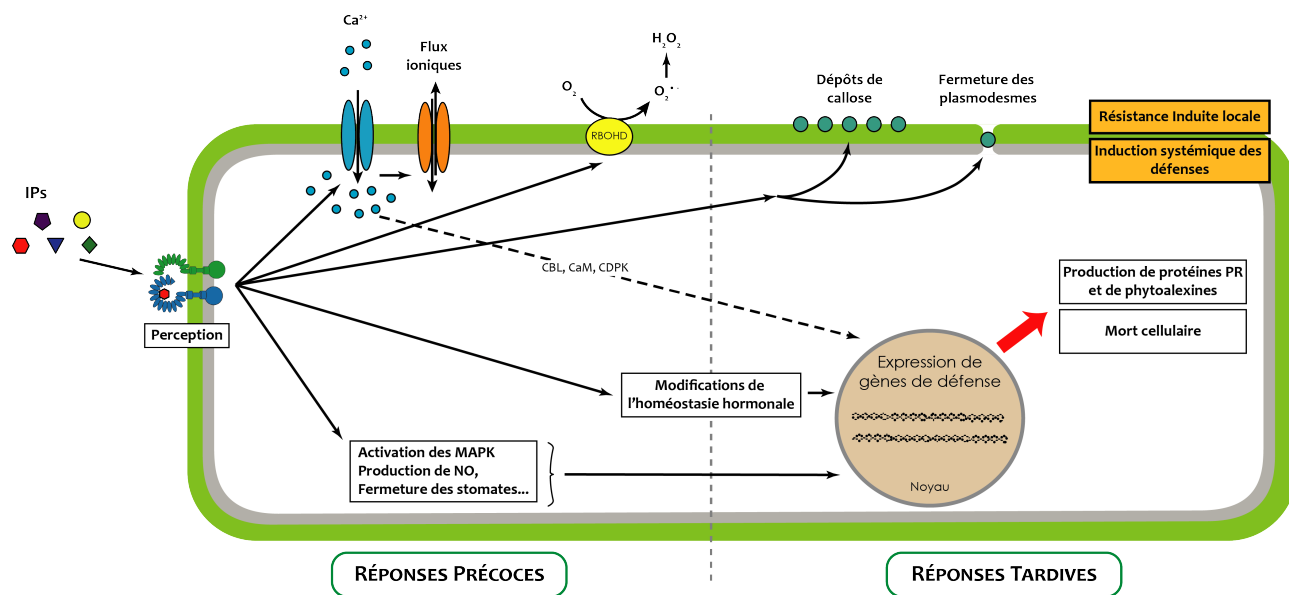


Figure In-2 : Représentation schématique des événements précoces et tardifs induits par la perception d'un IP.

Deux types de PRRs sont caractérisés, les *Receptor Kinases* (RKs) constitués d'un domaine extracellulaire capable de fixer l'IP correspondant, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytosolique présentant une activité kinase, et les *Receptor-Like Proteins* (RLPs) qui ne possèdent pas ce domaine cytosolique. De plus, la perception des IPs par les PRRs implique généralement des corécepteurs RK impliqués dans la transduction du signal (Couto and Zipfel, 2016). Par exemple, chez *A. thaliana*, le PRR spécifique de Flg22, FLS2, s'associe, en présence de son ligand Flg22, à un corécepteur appelé BAK1 (*Brassinosteroid receptor Associated Kinase 1*). L'association de ces deux protéines permet la phosphorylation de la kinase cytoplasmique BIK1 (*Botrytis-Induced Kinase 1*) qui elle-même phosphoryle le complexe FLS2/BAK1. Ce complexe est alors activé et BIK1 est libérée dans le cytoplasme, ce qui participe à l'activation de mécanismes moléculaires conduisant à la mise en place de la défense immunitaire (Chinchilla et al., 2007).

Ce mode de perception des IPs apoplastiques par des protéines membranaires ne semble pas être exclusif. Ces dernières années, un nombre croissant d'études met en effet en évidence un rôle des lipides membranaires dans la reconnaissance d'IPs par les cellules végétales. C'est le cas par exemple des protéines NLP (*Necrosis and ethylene-inducing Peptide 1-Like*), des toxines produites par des bactéries, des champignons et des oomycètes, qui facilitent l'infection des dicotylédones par ces microorganismes. Il a récemment été montré que ces protéines sont notamment perçues, chez les dicotylédones, par une interaction avec des lipides de la membrane plasmique, les GIPC (glycosylinositol phosphorylcéramides). Les NLPs se lient à la portion glucidique extracellulaire, provoquant une modification conformationnelle de la toxine (Lenarčič et al., 2017; Van den Ackerveken, 2017). D'autres cas d'interactions entre IPs et lipides membranaires ont été reportés et sont listés dans la Revue n°1 (Annexe 1).

2) Activation de réponses immunitaires précoces

Les réponses cellulaires qui découlent de la perception des IPs par les PRRs sont nombreuses. La plupart sont précoces et se mettent en place dans les minutes ou dans les heures suivant la perception d'un IP. Ces réponses précoces conduisent à la mise en place de mécanismes de défense plus tardifs et plus durables comme la production de composés antimicrobiens de défense (Figure In-2).

De nombreuses études portant sur les voies de signalisation conduisant à la mise en place des réponses immunitaires ont été menées sur la plante modèle de laboratoire *A. thaliana*. Sauf indication contraire, les mécanismes présentés par la suite sont donc ceux qui ont été décrits chez cette plante modèle.

a. Influx calcique et production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène

La première réponse cellulaire faisant suite à la perception d'un IP est un influx d'ion calcium (Ca^{2+}) dans le cytosol. L'influx commence avec un délai de 30 à 40 secondes et atteint son maximum en 2 à 6 minutes. L'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} peut être due à une entrée d'ions Ca^{2+} en provenance de l'apoplaste ou par une mobilisation de Ca^{2+} stocké dans les organites cellulaires (Seybold et al., 2014; Yu et al., 2017). Les mécanismes permettant cet influx calcique sont encore relativement peu connus. Le Ca^{2+} libre dans le cytosol est alors perçu par des protéines à motif EF-hand capables de capter ce calcium, comme les CBL (*Calcineurin B-Like protein*), les CaM (Calmoduline) et les CDPK (*Calcium-Dependant Protein Kinase*) permettant ainsi la transduction du

message calcique (Aldon et al., 2018; Boudsocq and Sheen, 2013; Marcec et al., 2019; Ranty et al., 2016). Aussi, cet influx calcique induit l'ouverture d'autres canaux ioniques, conduisant à des influx de protons et des efflux de K^+ , Cl^- et NO_3^- , ce qui provoque une alcalinisation du milieu extracellulaire et la dépolarisation de la membrane plasmique en 1 à 3 minutes après élicitation (Bigeard et al., 2015; Yu et al., 2017).

La production apoplastique d'intermédiaires réactifs de l'oxygène, ROS (*Reactive Oxygen Species*) est une autre réponse précoce, mise en place 4 à 5 minutes après la perception d'un IP ou d'un agent pathogène. Chez *A. thaliana*, les ROS liés à l'immunité sont principalement produits par la NADPH oxydase membranaire RBOHD (*Respiratory Burst Oxidase Homolog D*) (Kadota et al., 2015). Cette enzyme produit le radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) dans l'apoplaste où il est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par des superoxyde dismutases (Bigeard et al., 2015; Marcec et al., 2019; Yu et al., 2017). Les ROS peuvent agir directement dans la réaction de défense par leurs propriétés antibiotiques, ou indirectement en induisant la réticulation de composés de la paroi ce qui a pour effet de la renforcer. Ce sont également des molécules signal impliquées dans l'induction de diverses réponses immunitaires (Boller and Felix, 2009). L'influx calcique et la production de ROS sont deux processus cellulaires interconnectés ; l'élévation de la concentration de Ca^{2+} est nécessaire à l'induction de la production de ROS et les ROS induisent à leur tour l'influx calcique (Marcec et al., 2019).

Outre le Ca^{2+} et les ROS, d'autres molécules sont impliquées dans les réponses précoces à la perception d'un IP. C'est le cas du monoxyde d'azote (NO), un gaz dont la production est détectée quelques minutes après un traitement avec des IPs (Scheler et al., 2013). Il a été montré que ce composé régule des protéines impliquées dans la défense de la plante comme RBOHD ou NPR1 (*Non-expresser of PR genes 1*) un régulateur clé de l'expression de gènes de défense. Le NO est également impliqué dans la synthèse d'acide phosphatidique (PA) qui est un important intermédiaire de synthèse des lipides et qui est aussi une molécule signal régulant de nombreux processus physiologiques (Bigeard et al., 2015). Cette molécule est aussi impliquée dans l'immunité des plantes en régulant notamment la production de ROS, l'activation des MAP (*Mitogen-Activated Protein*) kinases ou encore des voies de signalisation hormonales (Li and Wang, 2019).

b. *Activation de cascades de phosphorylations*

L'activation des MAPK est un autre événement précoce de réponse à un IP. Ces protéines sont activées par phosphorylation par des MAPK Kinase (MAPKK), elles-mêmes activées par phosphorylation par des MAPKK Kinase (MAPKKK) (Bi et al., 2018; Thulasi Devendrakumar et al., 2018). Au moins deux cascades de phosphorylation par MAPK, MAPKKK1/MAPKKK-MAPKK4/MAPKK5-MAPK3/MAPK6 et MAPKKK1-MAPKK1/MAPKK2-MAPK4, sont connues pour avoir un rôle dans l'immunité chez *A. thaliana* (Kong et al., 2012; Pecher et al., 2014). Les cascades de phosphorylations par MAPK sont impliquées dans la régulation de l'expression de gènes de défense par la phosphorylation de facteurs de transcription. Les MAPK activées cibleraient en effet notamment des protéines à motifs VQ capables d'interagir avec des facteurs de transcription WRKY activateurs ou répresseurs d'expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Pecher et al., 2014; Wang et al., 2015). Par exemple, chez *A. thaliana*, le facteur de transcription WRKY33 est une cible des MAPK3/MAPK6 ainsi que de la MAPK4 (par l'intermédiaire de MKS1 (*MPK4 Substrate 1*)). L'activation de WRKY33 induit sa fixation sur le promoteur du gène codant

pour PAD3, *Phytoalexin-Deficient 3*, une enzyme impliquée dans la synthèse d'un composé antimicrobien de défense, la camalexine (Meng and Zhang, 2013). D'autres facteurs de transcription sont également activés par phosphorylation par des MAPK. C'est le cas de certains ERF (*Ethylene-Responsive element binding Factor*) comme ERF104 phosphorylé par les MAPK3 et MAPK6. Ces facteurs de transcription ERF ont la particularité de se fixer sur une séquence spécifique du promoteur de gènes impliqués dans des voies de signalisation hormonales (Meng and Zhang, 2013).

c. Fermeture des stomates

Enfin, dans l'heure suivant la perception d'un agent pathogène, la plante ferme ses stomates (Melotto et al., 2006). Les stomates sont des pores répartis sur l'épiderme des feuilles qui permettent les échanges gazeux entre la plante et son milieu extérieur. L'ouverture et la fermeture des stomates est régulée par deux cellules de garde dépendamment de leur état de turgescence. Ces pores sont aussi des points d'entrée majeurs d'organismes pathogènes. Il est donc essentiel pour la plante de contrôler la fermeture des stomates lors d'une attaque d'agent pathogène. Les mécanismes moléculaires conduisant à la fermeture des stomates lors d'un stress abiotique sont de mieux en mieux connus et impliquent l'acide abscissique (ABA), mais restent peu clairs dans le cas d'une fermeture induite par des agents pathogènes (Yu et al., 2017).

3) Signalisation hormonale

Des phytohormones sont aussi impliquées dans les réponses immunitaires des plantes. Les principales hormones impliquées dans les mécanismes de défense sont l'acide salicylique (SA), les jasmonates, incluant l'acide jasmonique (JA), et l'éthylène (ET). La production de ces trois hormones intervient rapidement après la perception d'un IP et celles-ci déclenchent diverses voies de signalisation immunitaires chez *A. thaliana*. Il est considéré que le SA est impliqué dans la résistance à des agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, tandis que le JA et l'ET sont impliqués dans la résistance à des agents pathogènes nécrotrophes et à des insectes herbivores. La dichotomie SA et JA/ET n'est cependant pas aussi marquée ; la voie du SA est ainsi requise pour la résistance contre certains nécrotrophes et celle du JA/ET pour la résistance contre certains biotrophes (Denancé et al., 2013). De nombreuses interactions existent par ailleurs entre ces deux voies de signalisation hormonales.

Longtemps étudiées pour leurs rôles dans la croissance et le développement des plantes, il a été mis en évidence ces dernières années que l'ABA, les auxines, les brassinostéroïdes et les cytokinines jouent également des rôles dans les interactions entre la plante et ses agents pathogènes (Robert-Seilanianz et al., 2011; Yu et al., 2018). L'intervention de ces hormones dans la réponse immunitaire des plantes étant moins bien caractérisée, elle ne sera pas détaillée par la suite.

Le SA est un composé phénolique dont la synthèse commence 3 à 6 heures suite à l'attaque d'un agent pathogène. Deux voies de synthèse permettent cette production de SA. Suivant une première voie, le SA est synthétisé par l'isochorismate synthase 1 (ICS1/SID2) à partir d'isochorismate. Le chorismate peut également être converti en SA par une série de réactions enzymatiques impliquant notamment la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) (Vos et al., 2013). NPR1 est le régulateur fondamental des réponses de défense induites par le SA. Cette protéine est présente

dans le cytosol sous une forme oligomérique inactive. La modification de l'équilibre redox de la cellule, notamment sous l'effet du SA, conduit à la réduction de NPR1 de sa forme inactive à sa forme monomérique active (Fu and Dong, 2013; Spoel, 2019; Tada et al., 2008). Ces monomères de NPR1 sont alors transloqués dans le noyau où ils interagissent avec des facteurs de transcription TGA et WRKY conduisant à l'activation de gènes codant pour des protéines PR (*Pathogenesis-Related*) (Spoel and Dong, 2012; Zhang and Li, 2019). Lors de son interaction avec les facteurs de transcription dans le noyau, NPR1 est phosphorylé, puis ubiquitiné par une E3 ubiquitine ligase, ce qui provoque sa dégradation par le protéasome (Zamioudis and Pieterse, 2012). Deux autres récepteurs au SA ont aussi été identifiés, NPR3 et NPR4. Lorsque les niveaux de SA sont faibles, ces protéines répriment l'expression de gènes de défense. Avec l'augmentation de la concentration de SA lors de l'infection de la plante par un agent pathogène, la fixation du SA sur NPR3 et NPR4 inhibe leur activité ce qui promeut l'expression des gènes de défense précédemment réprimés (Ding et al., 2018; Zhang and Li, 2019).

Le JA est également produit dans les 24h suivant l'exposition à certains IPs, comme Pep-13, un IP issu d'oomycètes du genre *Phytophthora* (Halim et al., 2009). Cette molécule est une oxylipine qui s'accumule rapidement dans la cellule en réponse à une blessure, une attaque d'insecte ou une attaque d'agent pathogène nécrotrophe. La synthèse du JA commence dans les chloroplastes où un acide gras des membranes chloroplastiques (l'acide α -linoléique) est métabolisé en précurseur de JA l'acide 12-oxo-phytodienoïque (OPDA). Ce précurseur est ensuite transporté dans le péroxysome où il subit plusieurs cycles de β -oxydation pour former l'acide jasmonique. Une fois dans le cytosol, le JA peut être méthylé en méthyl-jasmonate (MeJA) ou conjugué à des acides aminés comme l'isoleucine formant le JA-Isoleucine (JA-Ile) qui est la forme de JA la plus active biologiquement (Fonseca et al., 2009). En l'absence de stress, des protéines JAZ (*Jasmonate ZIM Domain*) sont liées à des facteurs de transcription activateurs de la réponse au JA et inhibent leur activité. Ces protéines JAZ recrutent aussi, directement ou non, des histones déacétylases (HDA) qui provoquent la modification de la chromatine et ainsi la répression des gènes de la réponse au JA (L. Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2005). La protéine COI1 (*Coronatine Insensitive 1*) est le régulateur clé de la réponse au JA (Yan et al., 2009). Dans des cellules stimulées, le JA se lie à cette protéine et aux protéines JAZ, provoquant la libération des facteurs de transcription activateurs et l'expression des gènes de la réponse au JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). Le JA active ainsi une importante reprogrammation transcriptionnelle par deux catégories de facteurs de transcription, les MYC et les ERF (L. Zhang et al., 2017). La première catégorie de facteurs de transcription est activée par le JA en réponse à une blessure ou à une attaque d'insecte herbivore. Les ERF sont quant à eux activés en réponse à une attaque d'agent pathogène nécrotrophe (Lorenzo et al., 2004; L. Zhang et al., 2017). L'ET a également un rôle dans cette activation des facteurs de transcription ERF. L'ET produit conjointement au JA lors d'une attaque d'agent pathogène nécrotrophe, agit en synergie avec le JA pour activer ces facteurs de transcription ERF alors qu'il antagonise l'activation des facteurs de transcription MYC. Cet effet de l'ET permet l'activation d'une réponse de défense spécifique à l'agent pathogène (Bürger and Chory, 2019).

D'importantes interconnexions existent entre ces voies de signalisation hormonales. De nombreuses études ont montré un effet antagoniste de la voie du SA sur la voie du JA, et inversement, même si des interactions neutres ou même synergiques entre ces deux voies ont aussi été rapportées (Mur et al., 2006; Pieterse et al., 2012). La répression de la voie du JA par le SA

implique divers composés dont la protéine NPR1 cytosolique et des facteurs de transcription qui vont inhiber l'expression de gènes de la réponse au JA. La protéine NPR1 cytosolique semble ainsi être en mesure de séquestrer des facteurs de transcription activateurs régulés par le JA dans le cytoplasme, ce qui empêcherait leur transfert dans le noyau et l'activation de l'expression des gènes qu'ils contrôlent (Caarls et al., 2015; Spoel et al., 2003). L'activation de la voie du JA, inhibe quant à elle l'accumulation de SA dans la cellule, par l'activation de l'expression de facteurs de transcription NAC. Ces derniers comprennent des répresseurs du gène de l'ICS1/SID2 impliquée dans la synthèse du SA, et des activateurs du gène de la méthyl-transférase BSMT1 (*Benzoic acid / SA carboxyl MethylTransferase 1*) responsable de la méthylation du SA (L. Zhang et al., 2017; Zheng et al., 2012) en salicylate de méthyle (MeSA), biologiquement inactif.

Ce fort antagonisme entre les voies du JA et du SA est par ailleurs exploité par certains organismes pathogènes pour contourner la résistance mise en place par la plante. L'exemple le plus connu de contournement de cette résistance implique la toxine coronatine (COR) produite par certaines bactéries phytopathogènes de l'espèce *P. syringae*, dont la structure chimique ressemble beaucoup au JA-Ile. La ressemblance entre ces deux molécules est telle que COR se fixe sur les récepteurs COI1-JAZ, ciblés par le JA-Ile. L'activation de la voie du JA qui en résulte conduit à la suppression de la voie du SA, efficace contre ce type d'agents pathogènes et permet à la bactérie de se développer dans sa plante hôte (Zheng et al., 2012). Cet exemple de manipulation de l'antagonisme JA/SA n'est pas le seul, d'autres bactéries produisent des composés similaires à COR, ou des protéines activant la voie du JA. C'est le cas de l'effecteur HopZ1a de la bactérie pathogène *P. syringae* qui cible directement le complexe récepteur du JA et provoque l'acétylation du domaine ZIM des protéines JAZ, ce qui provoque leur dégradation par le protéasome et donc la dérégulation des gènes de la réponse au JA (Jiang et al., 2013). De même, des champignons et des oomycètes peuvent également manipuler les voies de signalisation hormonales de leurs hôtes à leur avantage (Han and Kahmann, 2019; L. Zhang et al., 2017).

Ces trois hormones sont également impliquées dans l'induction systémique de résistance, notamment *via* la SAR (*Systemic Acquired Resistance*) et l'ISR (*Induced Systemic Resistance*). Ces mécanismes seront détaillés par la suite.

Les études ayant conduit à améliorer la compréhension des mécanismes de signalisation hormonale impliqués dans le système de défense des plantes ont surtout été réalisées sur des plantes dicotylédones et en particulier chez *A. thaliana*. Cependant, des études réalisées sur la plante modèle monocotylédone, le riz (*Oryza sativa*), révèlent que chez ces plantes, les rôles des phytohormones dans la défense sont loin d'être similaires à ceux décrits chez les dicotylédones. Une des différences majeures concerne l'interaction des voies du SA et du JA. Ainsi chez le riz, bien qu'une forme d'antagonisme semble également exister, contrairement à ce qui est habituellement observé chez les dicotylédones, ces deux phytohormones semblent contribuer à la résistance de la plante à la fois contre des agents pathogènes nécrotrophes et contre des agents pathogènes biotrophes (De Vleeschauwer et al., 2014, 2013). Malgré d'importants progrès, les connaissances relatives aux rôles des phytohormones dans la régulation des mécanismes de défense du riz sont parcellaires et de nombreuses études restent nécessaires pour prendre l'ampleur de la complexité des interactions hormonales chez les monocotylédones.

Tableau In-1 : Diversité des protéines PR et leurs propriétés (Sels et al., 2008; Van Loon et al., 2006; Van Loon and Van Strien, 1999).

Famille	Propriétés
PR-1	Inconnue
PR-2	β -1,3 glucanase
PR-3	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Chitinase type I, II
PR-5	Thaumatococcus-like
PR-6	Inhibiteur de protéinase
PR-7	Endoprotéinase
PR-8	Chitinase type III
PR-9	Péroxydase
PR-10	Ribonucléase-like
PR-11	Chitinase type I
PR-12	Défensine
PR-13	Thionine
PR-14	Lipid-transfer protein
PR-15	Oxalate oxydase
PR-16	Oxalate oxydase-like
PR-17	Inconnue

4) Mise en place de mécanismes de défense durables

a. Les protéines « Pathogenesis-Related »

L'activation de ces réponses précoces et des voies de signalisation hormonales conduit à une reprogrammation transcriptionnelle drastique de la cellule. L'expression d'un large panel de gènes est ainsi régulée par des facteurs de transcription, eux-mêmes régulés par les événements précoces de l'immunité déclenchés suite à la perception d'un IP ou d'un agent pathogène.

Les gènes codant pour des protéines PR, sont parmi les gènes les plus sur-exprimés en réponse à la perception d'un IP (Sels et al., 2008). Ces protéines PR sont des protéines non ou peu produites de manière constitutive par la plante, mais dont l'accumulation est déclenchée par une attaque d'agent pathogène. Des protéines PR ont été identifiées chez un grand nombre d'espèces végétales, appartenant à des familles différentes, ce qui suggère un rôle fondamental de ces protéines dans l'adaptation des plantes aux stress biotiques. 17 familles de protéines PR, séparées en fonction de leur structure, de leurs fonctions et de leurs activités biologiques, ont été identifiées (Tableau In-1) (Sels et al., 2008; Van Loon et al., 2006). Certaines protéines PR sont des chitinases, ou des glucanases et ont des propriétés antifongiques directes sur l'attaquant. D'autres sont des inhibiteurs de protéases, réduisant l'activité d'enzymes lytiques impliquées dans la dégradation de composés de la paroi végétale ou d'enzymes impliquées dans la nutrition de l'agent pathogène (Sels et al., 2008). Certaines protéines PR sont produites en réponse à l'activation de voies de signalisation hormonales. Par exemple, les glucanases PR-1 et PR-2, sont produites en réponse à la production d'acide salicylique. Les chitinases PR-3, PR-4, et la défensine PDF1.2, présentant une activité antifongique, sont quant à elles produites en réponse à la voie de signalisation médiée par le JA et l'ET (Ali et al., 2018; Sels et al., 2008).

b. Les phytoalexines

D'autres types de composés antimicrobiens de défense sont également produits en réponse à la perception d'un IP ou d'un agent pathogène. Les phytoalexines sont des composés présents chez de nombreuses espèces végétales qui montrent une activité biologique contre un large spectre d'agents pathogènes (Ahuja et al., 2012). La camalexine est une phytoalexine des Brassicacées, dérivée du tryptophane, et qui présente des propriétés antibactériennes et antifongiques. C'est la phytoalexine majeure de la plante modèle *A. thaliana*. Sa synthèse est fortement induite par un large spectre d'agents pathogènes et d'IPs. La synthèse de la camalexine à partir du tryptophane requiert plusieurs réactions enzymatiques impliquant entre autres des enzymes appartenant à la famille du cytochrome P450 (CYP) (Figure In-3). Le tryptophane est d'abord converti en indole-3-acétaldoxime (IAOx) par CYP79B2 et son homologue CYP79B3. Cet intermédiaire IAOx est aussi un intermédiaire de synthèse des glucosinolates indoliques et d'une auxine, l'acide indole-3-acétique. Ensuite, l'IAOx est converti en indole-3-acétonitrile (IAN) par un autre CYP, CYP71A13 et son homologue CYP71A12. Enfin, différentes étapes impliquant notamment PAD3, évoquée précédemment et qui est un autre membre de la famille des CYP, conduisent à l'obtention de la camalexine (Ahuja et al., 2012; Piasecka et al., 2015). La régulation de cette voie de biosynthèse est complexe et fait notamment intervenir des cascades de phosphorylations par MAPK, notamment les MAPK3, MAPK6 et MAPK4. Ces MAPK activent le facteur de transcription WRKY33, activant à son tour l'expression de gènes codant pour

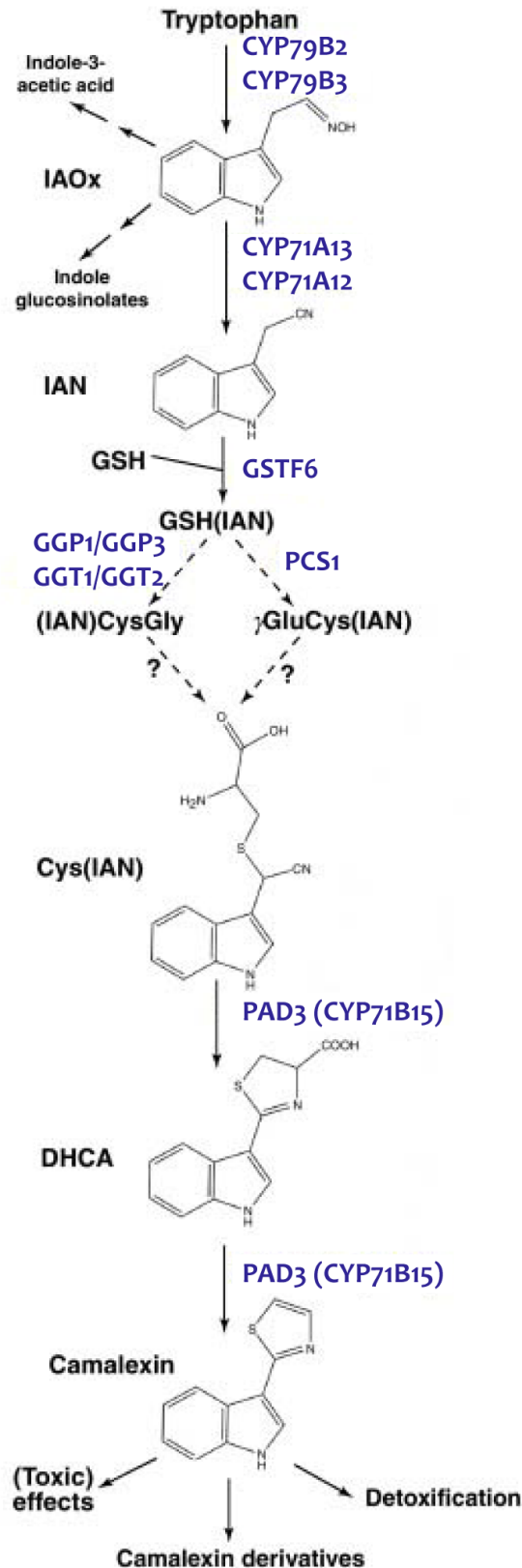


Figure In-3 : Voie de biosynthèse de la camalexine.

Abréviations : CYP, cytochrome P450 ; DHCA, Acide dihydrocamalexique ; GGP1/3, γ-glutamyl peptidases 1 et 3 ; GGT1/2, γ-glutamyl transpeptidase 1 et 2 ; GSH, glutathione ; GSTF6, glutathione S-transférase F6 ; IAN, indole-3-acétonitrile ; IAOx, indole-3-acétaldoxime ; PAD3, *Phytoalexin-Deficient 3* ; PCS1, phytochélatine synthase 1. Figure adaptée de Ahuja *et al.*, 2012.

des enzymes impliquées dans cette synthèse de la camalexine dont PAD3 et CYP71A13 (Ahuja et al., 2012).

Outre leurs fonctions dans la défense des plantes, les phytoalexines sont très étudiées pour leurs propriétés médicinales. Par exemple le resvératrol, une phytoalexine de la vigne (*Vitis vinifera*), est ainsi très intéressante pour ses propriétés anti-vieillessement, antioxydantes, cardioprotectrices et antitumorales (Tisserant et al., 2016).

c. Renforcement de la paroi par apposition de callose

La mise en place des défenses induites se traduit également par la synthèse de callose (β -1,3 glucane) dont le maximum est atteint 24h après la perception d'un IP (Ellinger and Voigt, 2014). La callose est un polymère glucosidique qui est déposé entre la membrane plasmique et la paroi des cellules. Le rôle de ces dépôts est de renforcer la paroi, formant ainsi une barrière physique contre la pénétration des tissus par des agents pathogènes. La callose sert aussi de matrice dans laquelle des composés antimicrobiens peuvent être déposés, ce qui permet de concentrer l'excrétion de ces composés aux sites d'infection (Luna et al., 2010). Chez *A. thaliana*, la synthèse de ce composé est notamment liée à la callose synthase GSL5 (*Glucan Synthase-Like 5*). Il a été montré que les ROS apoplastiques produits en réponse à la perception d'un IP ou d'un agent pathogène sont nécessaires à la mise en place de ces dépôts ; des mutants déficients en RBOHD, l'enzyme impliquée dans la production apoplastique de ROS, ne présentent plus de dépôts de callose après traitement avec un IP (Luna et al., 2010). Des dépôts de callose sont également mis en place au niveau des plasmodesmes (PM) lors d'une infection d'agent pathogène (Ellinger and Voigt, 2014). Les PM sont des canaux cytoplasmiques qui relient les cellules adjacentes entre elles. Ce sont des structures dynamiques pouvant se dilater, permettant le transport de cellule à cellule de macromolécules comme des protéines et des ARNs. Des agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes sont capables d'exploiter ces connexions cellulaires pour se déplacer de cellule à cellule et atteindre notamment les vaisseaux phloémiens leur permettant de se disperser dans la plante. En réponse à une infection d'agent pathogène, la plante peut alors fermer ses PM par l'apposition réversible de callose au niveau du col des PM (Lee and Lu, 2011). Chez *A. thaliana*, des IPs comme la chitine et le peptide Flg22 induisent la fermeture des PM en stimulant le dépôt de callose au niveau de ces canaux (Faulkner et al., 2013).

d. Résistance locale et HR

Tous ces éléments constituent la réponse immunitaire de la plante. Dans le cas d'une interaction dite incompatible, la plante met en place son arsenal de défense en réponse à une infection d'agent pathogène, ce qui a pour effet de bloquer la progression de cet l'agent pathogène et l'arrêt de l'interaction (Boutrot and Zipfel, 2017). On parle alors de résistance locale puisqu'elle est restreinte au site d'infection.

Dans certains cas, l'infection de la plante par un agent pathogène peut conduire à une résistance locale extrême qui se traduit une mort cellulaire programmée (*Programmed Cell Death*, PDC) localisée au site d'infection. Lorsqu'elle est attaquée par des agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes, c'est-à-dire qui se nourrissent de tissus vivants, la plante induit une HR (*Hypersensitive Response*), une forme de PCD qui va permettre de limiter le développement de l'agent pathogène et sa dispersion dans les tissus (Huysmans et al., 2017). Les agents pathogènes

nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts, possèdent quant à eux une grande diversité de toxines et d'enzymes lytiques pouvant conduire à la formation d'une nécrose. Dans ce cas, la mort cellulaire est défavorable pour la plante puisqu'elle favorise la propagation de l'agent pathogène (Huysmans et al., 2017; Kabbage et al., 2017).

III- Résistance Systémique Acquisée (SAR)

En supplément des réponses immunitaires de la MTI et de l'ETI qui agissent et sont activées localement au point d'infection, la plante peut activer une autre ligne de défense appelée résistance systémique. Cette résistance systémique peut être activée par une attaque d'agent pathogène ou d'insecte herbivore, mais aussi par des microorganismes bénéfiques comme des champignons mycorhiziens ou des bactéries PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). À la différence de la MTI et de l'ETI, la résistance systémique est efficace sur un large spectre d'agents pathogènes et agit systémiquement, protégeant des parties de la plantes éloignées du point d'infection primaire. Plusieurs types de résistances systémiques ont été caractérisés (Pieterse et al., 2014) :

- la SAR (*Systemic Acquired Resistance*) déclenchée par une attaque d'agent pathogène
- la HIR (*Herbivore-Induced Resistance*) déclenchée par une blessure ou une attaque d'insecte herbivore
- l'ISR (*Induced Systemic Resistance*) déclenchée par la colonisation des racines par un microorganisme bénéfique (sera abordée dans la seconde partie de cette introduction).

La SAR est la première forme de résistance systémique à avoir été identifiée. En réponse à une première infection localisée, ce phénomène se traduit par la résistance accrue de parties saines de la plante à une attaque ultérieure d'agent pathogène (Fu and Dong, 2013). Cette résistance est efficace contre un large spectre d'agents pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et oomycètes, mais semble être principalement fonctionnelle contre des organismes biotrophes et hémibiotrophes (van der Ent et al., 2018).

La SAR implique la génération d'un signal mobile dans les tissus infectés consécutive à l'activation d'une réaction de MTI ou d'ETI par la perception d'un agent pathogène. Ce mécanisme implique ensuite le transport de ce signal dans les autres tissus sains de la plante par les vaisseaux phloémiens. Puis la perception de ce signal et l'activation des réactions de défense de la SAR dans les tissus sains, permet une protection de ces tissus contre de futures infections (van der Ent et al., 2018).

L'élément déclencheur de la SAR n'a pas, à ce jour, été clairement identifié. Des études récentes sur *A. thaliana* semblent néanmoins montrer l'importance d'un dérivé de l'acide aminé Lysine, l'acide pipécolique (Pip), dans ce processus. Pip s'accumule rapidement dans les cellules exposées à une attaque d'agent pathogène ainsi que dans les tissus distants du site d'infection (Návarová et al., 2012; Pálfi and Dézsi, 1968). Aussi, cette molécule induit l'accumulation de SA et l'activation de gènes contrôlés par cette hormone (Kachroo and Robin, 2013). Lors d'une attaque d'agent pathogène, la Lysine est convertie en Pip notamment par l'aminotransférase ALD1 et l'enzyme SARD4 (*SAR-deficient 4*), qui est fondamentale pour la production de Pip et pour l'établissement de la SAR (Ding et al., 2016; Hartmann et al., 2017; Návarová et al., 2012). L'accumulation de Pip dans les feuilles qui résulte de l'activation de ce processus est nécessaire à

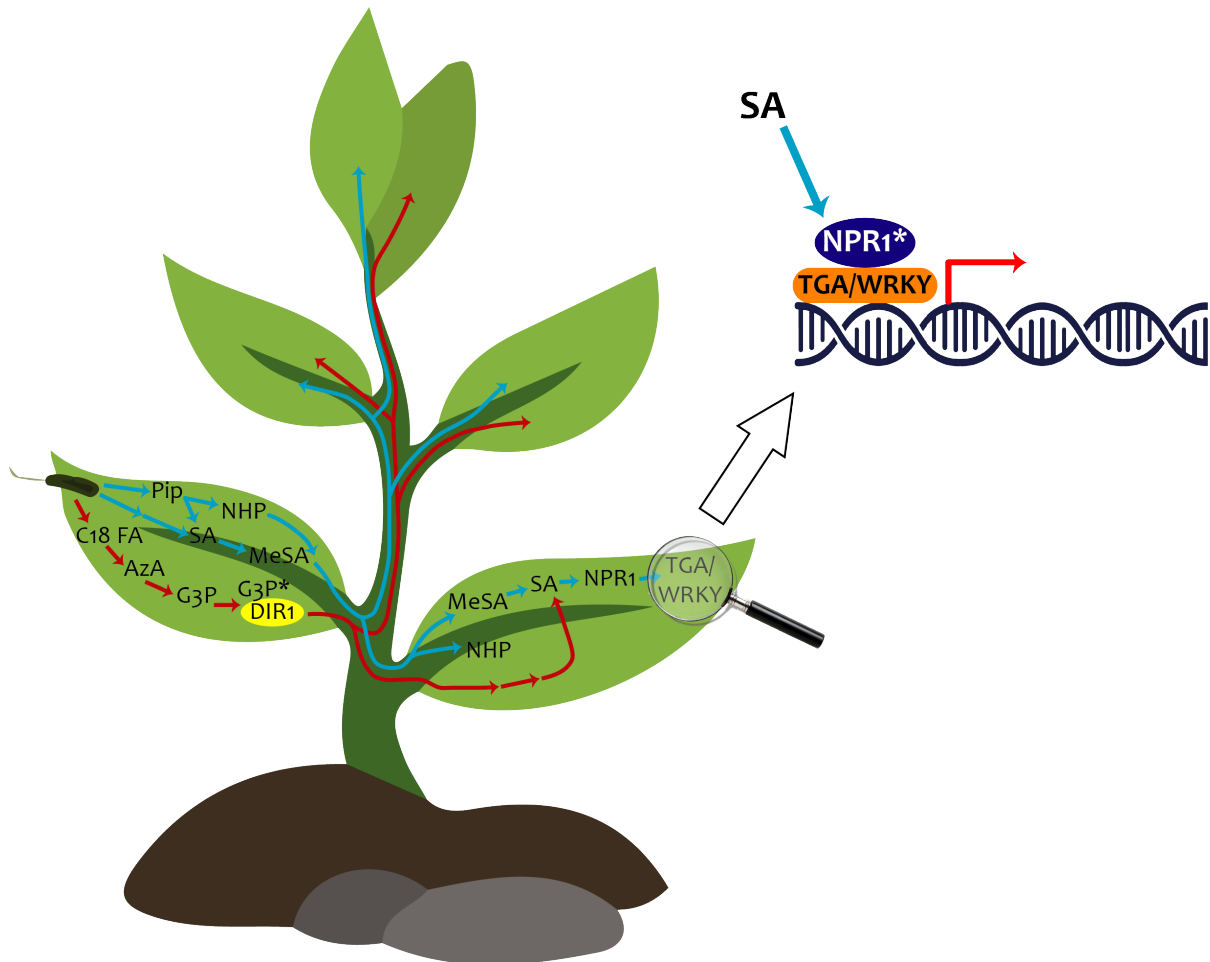


Figure In-4 : **Modèle représentant les événements moléculaires conduisant à la mise en place de la SAR.**

L'infection de la plante par un agent pathogène provoque la libération d'acides gras insaturés à 18 atomes de carbone (C18 FA) des membranes lipidiques et leur conversion en Acide Azélaïque (Aza) qui en retour induit la synthèse de glycérol-3-phosphate (G3P). Un dérivé lipidique du G3P (G3P*) serait alors produit et pris en charge par la protéine DIR1 (*Defective in Induced Resistance 1*) et ce complexe circulerait dans les vaisseaux conducteurs pour induire la résistance systémique de la plante. L'infection par l'agent pathogène induit aussi l'accumulation d'un dérivé de l'acide aminé Lysine, l'acide pipécolique (Pip), qui induit l'accumulation de SA. Pip est aussi converti en acide N-hydroxypipécolique (NHP) par la pipécolate hydroxylase FMO1 (*Flavin-Dependent-Monooxygenase 1*). Cette molécule semble transportée dans les tissus sains où elle contribuerait à l'induction de la SAR selon un mécanisme qui reste à identifier. Par l'activité d'une méthyl transférase, le SA est converti localement en Salicylate de méthyle (MeSA) qui est supposé diffuser systématiquement dans la plante. En atteignant les tissus sains, le MeSA, est reconvertit en SA par la MeSA estérase SABP2 (*SA-binding protein 2*) et active la protéine régulatrice NPR1. Les protéines NPR1 activées (NPR1*) sont alors transloquées dans le noyau des cellules et interagissent avec des facteurs de transcription TGA et WRKY conduisant à l'activation de l'expression de gènes de défense. Figure adaptée de Kachroo et Robin (2013).

l'induction de la SAR (Návarová et al., 2012). Les MAPK3 et MAPK6 sont impliquées dans l'induction de la production de Pip. En effet, l'activation locale de ces MAPK conduit, *via* l'activation du facteur de transcription WRKY33, à l'induction de l'expression du gène codant pour l'enzyme ALD1, ce qui se traduit par l'accumulation de Pip (Wang et al., 2018). Il a récemment été découvert que Pip est converti en acide N-hydroxypipécolique (NHP) par une pipécolate hydroxylase, FMO1 (*Flavin-Dependent-Monooxygenase 1*). Dans des lignées mutantes déficientes en cette enzyme l'application de Pip n'induit pas la SAR alors que l'application de NHP restaure l'induction de ce mécanisme (Chen et al., 2018; Hartmann et al., 2018). Cette molécule s'accumule systémiquement dans les feuilles en réponse à une attaque d'agent pathogène ; elle peut être transportée des tissus infectés jusqu'aux tissus sains ou générée *de novo* dans les tissus sains à partir de Pip (Kachroo and Kachroo, 2018). Le rôle du NHP dans l'activation systémique de la SAR reste cependant à déterminer.

Au niveau systémique, la SAR se traduit par une accumulation de SA et par une importante reprogrammation transcriptionnelle des cellules. Le régulateur de la réponse au SA, la protéine NPR1, intervient dans ce processus en interagissant avec des facteurs de transcription TGA et WRKY permettant l'activation de l'expression de gènes de défense, notamment des protéines PR (Fu and Dong, 2013).

Malgré ce rôle crucial du SA dans la SAR, cette molécule ne semble pas être le signal mobile qui permet l'activation systémique des défenses. En effet, l'infection d'un porte greffe déficient en SA conduit malgré tout à l'induction d'une SAR dans un greffon « normal » (Vernooij et al., 1994). Ces dernières années, la recherche, chez *A. thaliana*, du signal mobile permettant l'activation systémique de la SAR a permis d'identifier plusieurs molécules candidates, dont le MeSA, l'acide azélaïque (AzA), le dihydroabétinal et le glycérol-3-phosphate (G3P). Ces molécules induisent en effet une résistance systémique lorsqu'elles sont appliquées localement et sont produites relativement rapidement en réponse à une infection d'agent pathogène (Bürger and Chory, 2019; Kachroo and Robin, 2013).

En particulier le MeSA semble être un candidat particulièrement prometteur. Au site d'infection, le SA est converti en MeSA par l'activité d'une méthyl transférase. Le MeSA produit est transporté dans les vaisseaux phloémiens. En atteignant les tissus sains, le MeSA, biologiquement inactif, est reconverti en SA par la MeSA estérase SABP2 (*SA-binding protein 2*) (Ádám et al., 2018). Le SA ainsi re-produit active l'expression de gènes de la réponse au SA dont ceux codant pour des protéines PR (Figure In-4) (Ádám et al., 2018; Kachroo and Robin, 2013; Park et al., 2007).

La volatilité du MeSA remet cependant en question l'implication réelle de cette molécule dans la transduction du signal de la SAR (Fu and Dong, 2013). De nombreuses autres études montrent une implication potentielle de l'AzA et du G3P dans l'activation de la SAR. L'AzA est produit par l'hydrolyse d'acides gras insaturés à 18 carbones comme l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linolénique (Kachroo and Robin, 2013). La voie de biosynthèse de l'AzA n'est pas encore connue, mais les ROS et le NO semblent avoir un rôle dans cette synthèse (Bürger and Chory, 2019). En effet, des mutants incapables de produire des ROS en réponse à une infection produisent moins d'AzA et ne sont pas capables d'induire la SAR (Gao et al., 2015). L'AzA induit la synthèse de G3P en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de cette molécule. L'application locale de G3P induit une SAR mais dont l'intensité est relativement réduite. En revanche, l'application locale simultanée de G3P et de la protéine DIR1 (*Defective in Induced Resistance 1*), probablement impliquée dans le transport de lipides et qui est l'un des principaux régulateurs de la SAR, conduit à l'activation d'une SAR plus efficace. Aucune interaction directe n'a été détectée entre ces deux molécules. Cependant, le G3P

est un précurseur de la biosynthèse de composés lipidiques. Il est donc probable qu'un dérivé lipidique du G3P soit pris en charge par DIR1 et soit ainsi transporté dans les vaisseaux phloémiens jusque dans les tissus sains de la plante (Gao et al., 2015; Kachroo and Robin, 2013).

La SAR est un mécanisme complexe qui implique divers composés et de nombreuses molécules. Au moins deux voies de signalisation distinctes conduisant à l'activation de la SAR semblent ainsi coexister. Une première voie implique le SA et le régulateur clé de la réponse au SA, NPR1. La seconde, indépendante du SA, implique entre autres acteurs, les radicaux libres ROS et NO, puis l'AzA et le G3P (Gao et al., 2015). Ces deux voies sont présentées sur la Figure In-4. Malgré ces informations, des incertitudes existent encore et d'autres molécules intermédiaires restent à identifier pour compléter la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de la SAR (Bürger and Chory, 2019).

Partie 2 - Cas particulier des défenses souterraines

Le système racinaire constitue la partie souterraine de la plante. Cet organe assure les fonctions vitales d'ancrage dans le sol et d'absorption de l'eau et des sels minéraux. Dans le sol, les racines des plantes sont constamment en contact avec une importante communauté microbienne tellurique. Ces organismes peuvent être soit bénéfiques pour la plante comme les PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) et les PGPF (*Plant Growth Promoting Fungus*) ou pathogènes. Les maladies dites telluriques, résultant de l'infection des racines par ces organismes, sont responsables de pertes de rendements considérables des productions agricoles (Attard et al., 2010). Ces maladies peuvent conduire à des fontes de semis, à une inhibition du développement du système racinaire, à des retards de croissance, au flétrissement des parties aériennes et à la mort de la plante infectée. Il est difficile de contrôler le développement de ces maladies telluriques. En effet, les organismes pathogènes qui en sont responsables présentent souvent un large spectre d'hôtes et persistent longtemps dans le sol sous la forme de structures de conservation, comme des sclérotés ou des oospores (De Coninck et al., 2015). Des traitements chimiques existent pour lutter contre ces agents pathogènes mais restent relativement peu efficaces et extrêmement toxiques.

Les organismes pathogènes telluriques les plus importants sont des champignons, notamment des genres *Fusarium*, *Verticillium* ou *Rhizoctonia*, et des oomycètes comme ceux appartenant aux genres *Phytophthora*, *Aphanomyces* et *Pythium*. Ces agents pathogènes sont responsables de multiples maladies affectant des centaines d'espèces végétales et notamment des cultures d'intérêt agronomique (De Coninck et al., 2015; Gaulin et al., 2007). Par exemple *Phytophthora infestans*, l'agent du mildiou de la pomme de terre, fut responsable de la grande famine qui frappa l'Irlande de 1845 à 1852 en détruisant la quasi-totalité des cultures de pommes de terre qui était alors l'aliment de base des paysans irlandais. De même, *Aphanomyces euteiches*, l'agent causal de la pourriture racinaire du pois (*Pisum sativum*), est responsable de lourdes pertes de rendement de ces cultures, et peut survivre de nombreuses années dans le sol (Gaulin et al., 2007). Des bactéries sont également responsables de maladies telluriques comme *Ralstonia solanacearum*, responsable du flétrissement bactérien de la tomate, ou des bactéries du genre *Agrobacterium* dont certaines espèces sont responsables de la formation de tumeurs à la base de la tige de nombreuses espèces végétales, cultivées ou non (Anand et al., 2008; Peeters et al., 2013). Enfin, de nombreux insectes herbivores, à leurs stades larvaires ou adultes, se nourrissent de racines, ainsi que des nématodes, des vers microscopiques phytoparasites (Kandath and Mitchum, 2013; Rasmann and Agrawal, 2008). Ces derniers sont responsables d'importantes pertes économiques et certaines espèces sont d'ailleurs considérées comme « Organismes de quarantaine » aux États-Unis.

Comme les feuilles, les racines présentent des ouvertures naturelles facilitant la pénétration des tissus par les agents pathogènes telluriques. Des fissures peuvent ainsi se former dans l'épiderme lors de l'émergence des racines latérales. Ces zones de faiblesse à la jonction de la racine principale et des racines latérales en croissance constituent des points d'entrée majeurs pour les agents pathogènes (Perrine-Walker et al., 2007). De même, les jeunes racines en croissance sont des cibles d'infection privilégiées en raison de l'absence de paroi secondaire. De nombreux organismes pathogènes sécrètent également des enzymes permettant la dégradation de la paroi des cellules épidermiques racinaires.

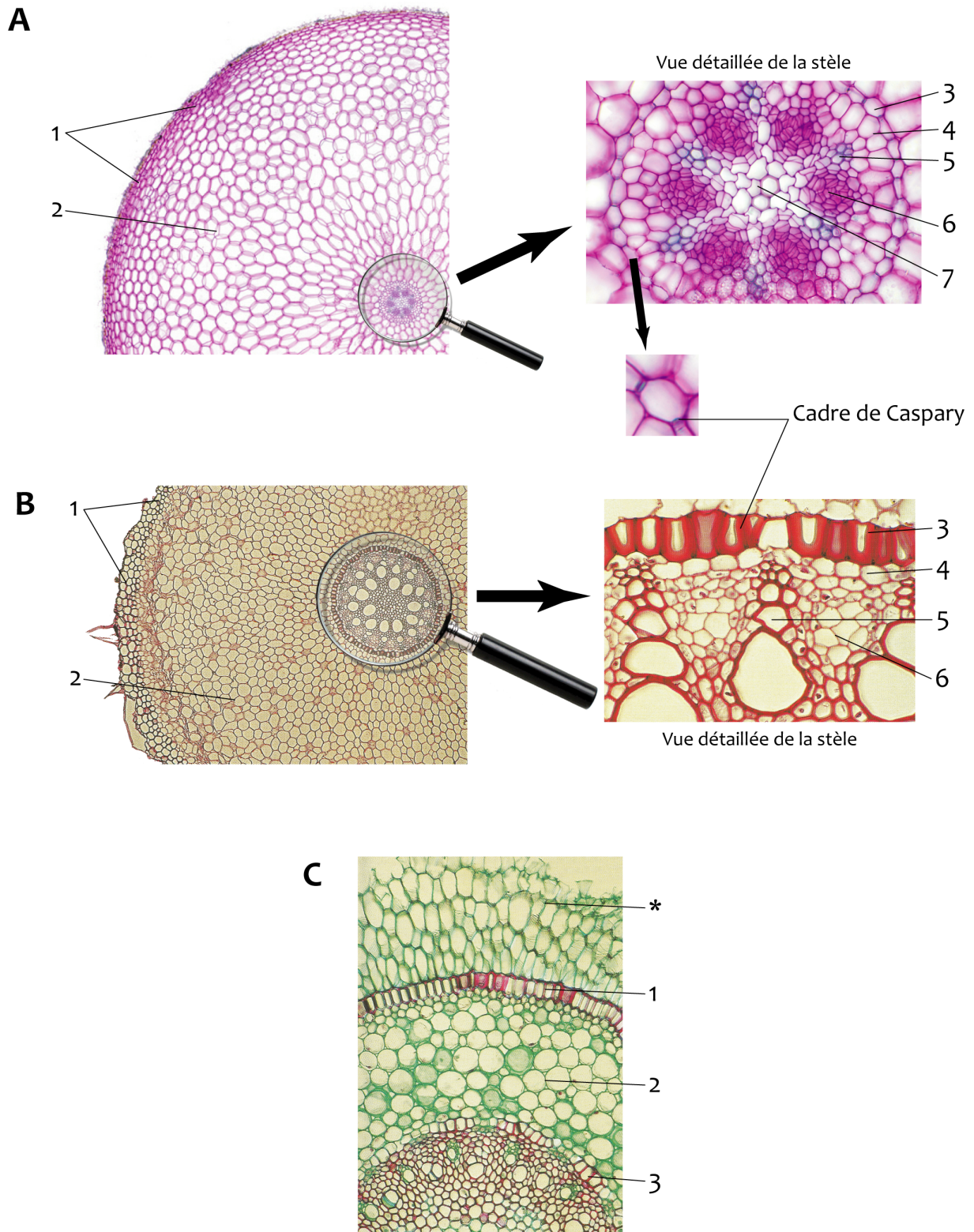


Figure In-5 : **Coupes Transversales (CT) de racines colorées au carmin-vert d'iode.**

1 = Exoderme (mono ou pluri-stratifié), 2 = Parenchyme cortical, 3 = Endoderme, 4 = Péricycle, 5 = Xylème I, 6 = Phloème I et 7 = Parenchyme médullaire. **A-** CT de jeune racine de ficaria (*Ranunculus ficaria*, Dicotylédone) et vue détaillée de la stèle avec un gros plan sur l'endoderme et les dépôts de subérine du cadre de Caspary qui ceinture les cellules. Photos issues de Labrot (2016). **B-** CT de racine mature d'Iris (Monocotylédone) et vue détaillée de la stèle. Remarque : la forme de l'endoderme en U est une caractéristique des Monocotylédones. Photos issues de Bowes *et al.* (2012). **C-** CT d'une racine aérienne de l'orchidée épiphyte *Dendrobium* (Monocotylédone). L'exoderme est constitué d'une seule assise cellulaire disposée sous un *velamen* (*), constitué de plusieurs assises de cellules mortes renforcées par des dépôts cellulodiques. Photo issue de Bowes *et al.* (2012).

Bien que les racines soient la cible d'une multitude d'organismes phytophages, responsables d'importantes pertes économiques, la plupart des études portant sur les défenses des plantes ont été conduites au niveau foliaire. Peu de recherches sont dédiées aux mécanismes de défense du système racinaire. Néanmoins, comme les feuilles, les racines présentent un système immunitaire incluant tant des défenses constitutives que des défenses induites suite à la perception d'un organisme pathogène.

I- Les défenses constitutives des racines

1) Les défenses physiques

À la différence des feuilles, les racines ne possèdent pas de cuticule. Elles sont en revanche dotées de couches cellulaires distinctes agissant comme des barrières physiques de protection, l'endoderme et l'exoderme (Meyer et al., 2008). L'endoderme, une unique assise cellulaire, sépare le péricycle du parenchyme cortical et l'exoderme, souvent multistratifié, sépare le parenchyme cortical du rhizoderme (Meyer et al., 2008) (Figure In-5). Alors que l'endoderme est une caractéristique des plantes vasculaires, l'exoderme n'est présent que chez certaines espèces végétales (il est par exemple présent chez le maïs mais pas chez *A. thaliana*) (Nawrath et al., 2013). La particularité de ces couches cellulaires est la présence de dépôts de composés hydrophobes, contenant notamment de la lignine et de la subérine, sur des zones très localisées de la paroi primaire de ces cellules. Dans le cas de l'endoderme, ces dépôts forment ainsi un cadre, appelé cadre de Caspary (du nom du botaniste Allemand qui l'a découvert), qui ceinture les cellules (Meyer et al., 2008). La différenciation de l'endoderme se traduit aussi par le dépôt d'une paroi secondaire hydrophobe de subérine entre la paroi primaire et la membrane plasmique qui recouvre totalement la surface de certaines cellules de l'endoderme. Avec ces deux barrières isolant les cellules corticales des cellules de la stèle (et les cellules rhizodermiques des cellules corticales dans le cas de l'exoderme), les flux apoplastiques d'eau, de nutriments ou d'hormones sont bloqués. Ces molécules sont alors essentiellement transférées *via* le cytoplasme de ces cellules (Robbins et al., 2014). Endoderme et Exoderme constituent également un obstacle à la colonisation de la racine par des microorganismes. La sensibilité du soja à l'agent pathogène *Phytophthora sojae* est ainsi dépendante de la quantité de subérine déposée dans l'épiderme et dans l'endoderme des racines. Une plus grande quantité de subérine au niveau de ces couches cellulaires retarde en effet la pénétration puis la colonisation des tissus racinaires par *P. sojae* accordant ainsi à la plante un délai pour la mise en place de réactions de défenses contre cet organisme pathogène (Ranathunge et al., 2008).

2) Les défenses biochimiques

Comme les feuilles, les racines possèdent des défenses constitutives biochimiques. La plupart des composés de défense présents de manière constitutive dans les feuilles le sont également dans les racines. Les glucosinolates notamment sont présents aussi bien dans les feuilles que dans les racines des Brassicacées dans des proportions relativement similaires (Rasmann and Agrawal, 2008). Certaines plantes produisent aussi des composés antimicrobiens au niveau racinaire différents de ceux produits au niveau foliaire. C'est le cas des saponines de l'avoine. Les principales saponines produites dans les parties aériennes de l'avoine sont des stéroïdes, les avénacosides, tandis que les racines produisent au niveau des cellules épidermiques des saponines triterpénoïdes, les avénacines.

Ces dernières ont un rôle particulièrement important dans la défense de la plante contre plusieurs champignons pathogènes telluriques (Osbourn, 1996).

Les racines produisent aussi de manière constitutive des protéines à propriétés antimicrobiennes comme des protéines PR. Par exemple, des β -glucanases (PR-2) et des chitinases (PR-3) sont produites constitutivement dans les racines du tabac mais ne sont pas détectées dans les feuilles de plantes saines (Broekaert et al., 2000; De Coninck et al., 2015).

Une caractéristique essentielle des racines présentant un rôle fondamental dans la défense des plantes est leur capacité à sécréter divers composés dans la rhizosphère, la zone du sol directement influencée par les racines et les microorganismes qui leur sont associés. Les racines exsudent ainsi des composés à faible poids moléculaire comme des acides aminés, des acides organiques, des sucres et des métabolites secondaires, ainsi que des composés à poids moléculaire plus élevé comme des polysaccharides et des protéines (Bais et al., 2006). Ces exsudats représentent donc un coût énergétique important pour la plante. Leur rôle n'est pas complètement connu, mais de nombreux composés exsudés interviennent dans d'importants processus biologiques. Des composés dits allélopathiques peuvent être sécrétés dans la rhizosphère pour inhiber ou limiter la croissance de plantes voisines, accordant un avantage compétitif à la plante. D'autres composés exsudés ont des rôles dans la défense de la plante contre des attaques d'organismes telluriques. La sécrétion de protéines antimicrobiennes, comme les PR-2 et PR-3 exsudées dans la rhizosphère par les racines d'*A. thaliana*, ou de phytoanticipines peut ainsi inhiber la propagation d'organismes potentiellement pathogènes au voisinage immédiat de la racine (De-la-Peña et al., 2010; De Coninck et al., 2015). Le rhizathalène A, est un exemple de phytoanticipine produite et sécrétée par les racines d'*A. thaliana* conférant à la plante une plus grande résistance contre les larves d'un insecte herbivore se nourrissant de ses racines (Baetz and Martinoia, 2014).

Enfin, certains composés exsudés ont des rôles attractifs ou répulsifs sur des organismes bénéfiques ou pathogènes. L'attraction de microorganismes bénéfiques peut réduire ou supprimer la propagation d'agents pathogènes, soit directement par effet antimicrobien, soit indirectement, par compétition pour les ressources du milieu ou en stimulant les défenses de la plante. La plante est ainsi capable de moduler la communauté microbienne avec laquelle elle partage le milieu (De Coninck et al., 2015; Yu et al., 2019).

II- Les défenses racinaires induites

La perception d'IPs ou d'agents pathogènes se traduit dans la racine, comme au niveau foliaire, par la mise en place d'une réponse immunitaire. Il a été montré que la racine est capable de répondre à de nombreux éliciteurs, comme l'épitope Flg22 de la flagelline ou les peptidoglycanes (PGN), constituants de la paroi bactérienne, ou encore la chitine, principal composant de la paroi de champignons (Millet et al., 2010). En particulier, un traitement de racines d'*A. thaliana* avec Flg22, conduit à la production extracellulaire de ROS, à la phosphorylation de MAPK et à l'apposition de dépôts de callose sur l'épiderme de la racine (Millet et al., 2010; Wyrsh et al., 2015). L'expression de nombreux gènes impliqués dans la défense comme *CYP71A12* et celui codant pour le facteur de transcription MYB51, impliqué dans la régulation de la synthèse des glucosinolates indoliques, est également activée en réponse à Flg22 (Millet et al. 2010 ; Stringlis et al., 2018a).

Ces deux gènes sont aussi induits dans la racine d'*A. thaliana* en réponse à une attaque de nématodes (Teixeira et al., 2016). De même, il a récemment été montré chez *A. thaliana*, qu'un IP d'origine végétale (DAMP), AtPep1, induit au niveau racinaire la production extracellulaire de ROS, la phosphorylation des MAPK ainsi que l'induction de l'expression de gènes de défense (Poncini et al., 2017). Il est intéressant de noter que ces marqueurs de la MTI sont bien plus fortement induits par ce DAMP que par des IPs comme la flagelline ou la chitine, issus de microorganismes, qui sont naturellement présents en abondance au sein de la rhizosphère. Un DAMP semble donc être perçu par la racine comme un signal de danger plus fort que ne l'est un MAMP (Poncini et al., 2017).

Des composés antimicrobiens sont aussi produits par la racine en réponse à cette perception d'un IP ou d'un agent pathogène. Les flavonoïdes sont parmi les métabolites secondaires les plus représentés dans les exsudats racinaires, et des dérivés de ces molécules comme la pisatine, une phytoalexine du pois (*P. sativum*), sont ainsi produits et exsudés par la racine en réponse à une attaque d'agent pathogène (Baetz and Martinoia, 2014). Cette phytoalexine est connue pour inhiber *in vitro* la croissance de l'agent pathogène *A. euteiches* (Cannesan et al., 2011). D'autres composés à forte activité antimicrobienne comme des glucosinolates ou des métabolites secondaires dérivés du tryptophane comme la camalexine, sont également produits dans les racines et exsudés dans la rhizosphère. La camalexine est ainsi produite dans des racines infectées par *Verticillium longisporum* (Iven et al., 2012). Cette phytoalexine est également sécrétée dans la rhizosphère en réponse à une infection par l'oomycète *Pythium sylvaticum* ou à un traitement avec Flg22 (Bednarek et al., 2005; Millet et al., 2010).

Des phytohormones incluant le SA, le JA et l'ET, sont aussi impliquées dans la défense des racines contre des agents pathogènes. Cependant, les interactions antagonistes souvent décrites au niveau foliaire entre le SA et le JA, ne semblent pas être toujours valables au niveau racinaire (Attard et al., 2010). Les gènes de défense régulés par ces différentes hormones semblent par ailleurs différer entre les organes aériens et les organes souterrains, comme cela a été montré chez *Brassica rapa* (Papadopoulou et al., 2018). De plus, chez *A. thaliana*, des gènes de défense connus pour être induits au niveau foliaire en réponse à une attaque d'agent pathogène, comme *PR-1* (considéré comme un marqueur de réponse au SA), *PDF1.2* (considéré comme un marqueur de réponse au JA), ou *CYP79B2* (codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de glucosinolates) ne sont que peu ou pas induits dans les racines (Chuberre et al., 2018).

Enfin, l'activation de la MTI dans les racines conduit à l'expression de gènes codant pour des protéines PR. C'est le cas des protéines PR-1 et PR-10 rapidement induites au niveau racinaire chez le riz en réponse à une infection par le champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* (Chuberre et al., 2018). Il est cependant intéressant de noter que ces mêmes protéines PR sont induites durablement au niveau foliaire alors que cette induction n'est que transitoire au niveau racinaire et n'intervient que lors des stades précoces de l'infection. Cette différence d'induction de gènes de défense semble liée au régime trophique qu'adopte le champignon. En effet, *M. oryzae* est un hémibiotrophe lorsqu'il attaque les tissus foliaires de sa plante hôte. En revanche Marcel *et al.* (2010), ont montré que ce champignon n'adopte qu'un régime trophique biotrophe lors de l'infection des racines et se disperse dans ce tissu sans y provoquer de dommage. L'aspect transitoire de la réponse de défense observée

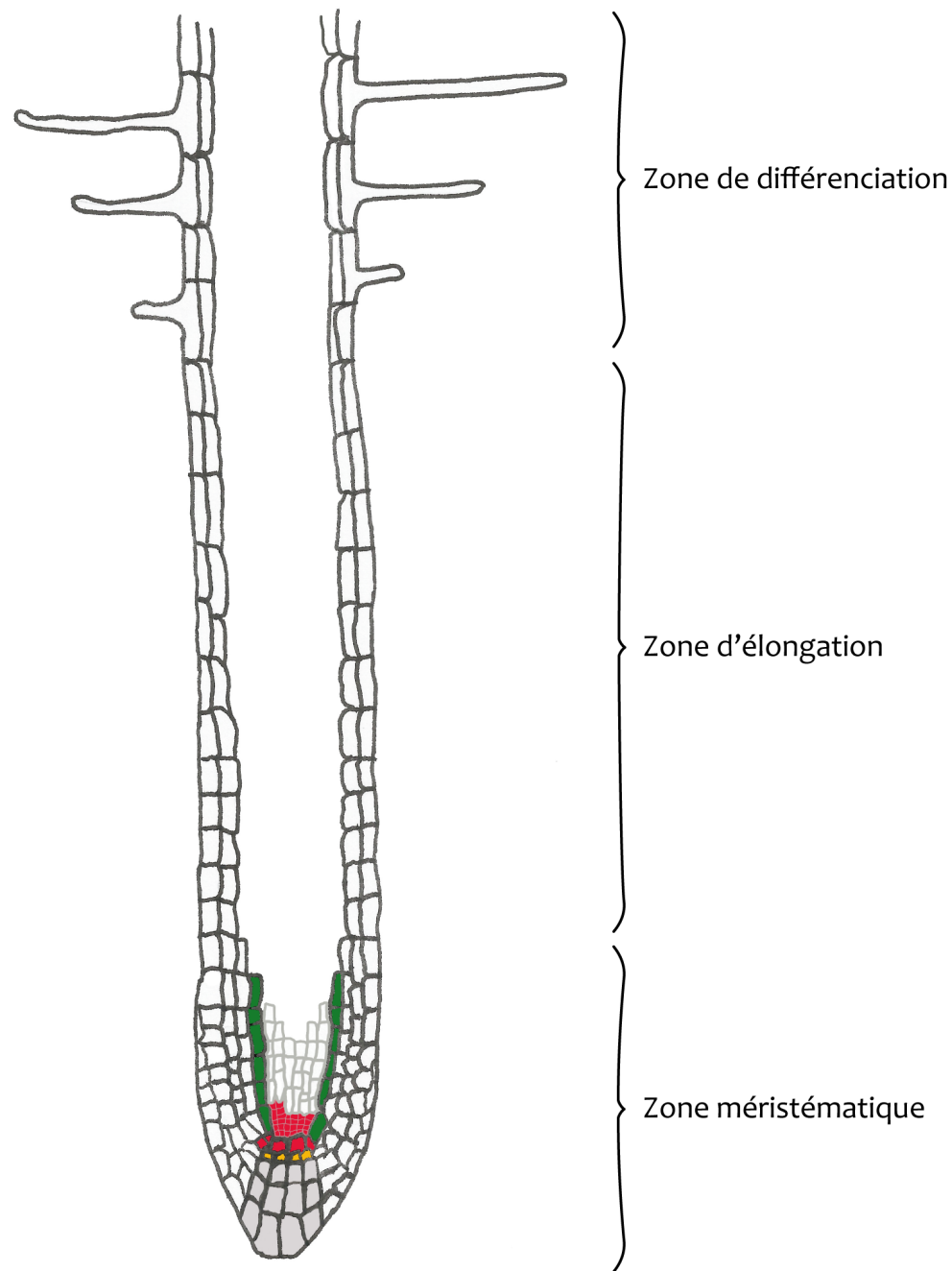


Figure In-6 : **Quatre zones racinaires.**

La racine est divisée en quatre zones distinctes ; la zone de ramification qui est la partie la plus âgée de la racine et qui porte les racines latérales (non montrée sur ce schéma), la zone de différenciation qui comporte la zone subéreuse, imperméable, et la zone pilifère responsable de l'absorption de l'eau et des sels minéraux, la zone d'élongation qui est responsable de la croissance en longueur de la racine et la zone méristématique où se trouve le Méristème Apical Racinaire (MAR, en rouge sur le schéma) et la coiffe (cellules grisées) et son méristème d'entretien (cellules orange). L'assise cellulaire endodermique est représentée par les cellules vertes et les cellules centrales claires représentent les cellules de la stèle (incluant péricycle, parenchyme médullaire et vaisseaux conducteurs).

au niveau racinaire semble donc pouvoir être expliquée par la suppression de la réponse immunitaire par le champignon pour permettre son développement dans la racine (Marcel et al., 2010).

III- Compartimentalisation de la réponse racinaire

Malgré des différences de voies de signalisation hormonales et de régulations génétiques, les réactions de défense déclenchées au niveau racinaire semblent être assez similaires à celles déclenchées au niveau foliaire en réponse à un agent pathogène ou à un éliciteur. Cependant, ces dernières années, plusieurs études ont montré une spécificité tissulaire de la réponse immunitaire de la racine.

Quatre zones racinaires

La racine peut être divisée en 4 zones - Figure In-6 (Meyer et al., 2008) ;

- ◆ La zone de ramification qui est la partie la plus âgée de la racine et qui porte les racines latérales
- ◆ La zone de différenciation, incluant la zone subéreuse, imperméable car dotée d'une assise subéreuse (encore appelée exoderme subérifié) formée à partir de l'assise externe du parenchyme cortical, et la zone pilifère, contenant les trichomes, ces cellules rhizodermiques piliformes responsables de l'absorption de l'eau et des sels minéraux
- ◆ La zone d'élongation, où les jeunes cellules s'allongent verticalement, permettant la progression de la racine dans le sol
- ◆ La zone méristématique (ou apex), zone où se trouve le méristème apical racinaire (MAR), où les cellules, indifférenciées, se multiplient rapidement, et qui est dotée d'une coiffe, enveloppe qui termine la racine et protège la zone méristématique en empêchant l'érosion de ses cellules dans le sol.

1) Protection de la zone d'élongation

Beaucoup d'agents pathogènes telluriques infectent les racines de leur hôte *via* des zones précises de la racine. Par exemple chez le pois l'oomycète *A. euteiches* infecte dans un premier temps les cellules de la zone d'élongation, mais beaucoup moins les cellules de la zone de différenciation tandis que les cellules de la pointe racinaire restent saines (Cannesan et al., 2011). Ces différences de colonisation semblent notamment liées à la présence de la phytoalexine pisatine, qui s'accumule davantage dans les zones de la racine où l'infection est limitée (la zone de différenciation et la zone méristématique) (Cannesan et al., 2011). De même, il a été montré que le champignon *Nectria haematococca* infecte en trois jours après inoculation les racines du pois au niveau de la zone d'élongation, alors que les zones matures et la pointe racinaire ne montrent alors aucun signe visible de l'infection (Gunawardena and Hawes, 2002).

Dans leur étude de l'immunité de la racine, Millet *et al.* (2010) ont ainsi montré que certains IPs, Flg22 et les PGN, déclenchent une forte réponse immunitaire chez *A. thaliana* localisée au niveau de la zone d'élongation. C'est également au niveau de cette zone racinaire que semble restreinte la

pFLS2 expression

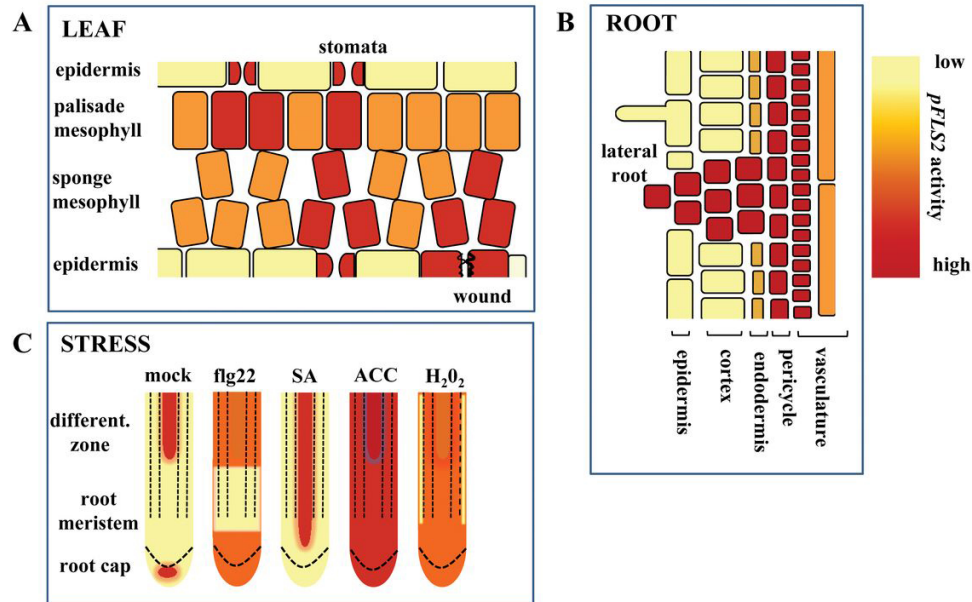


Figure In-7 : **Modèle d'expression cellulaire et tissulaire du récepteur FLS2 chez *A. thaliana*.**

Les schémas représentent l'activité du promoteur du gène *FLS2* dans les feuilles (A) et dans les racines (B et C). C : activité du promoteur dans les racines après un stress par application de Flg22, de SA, d'1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) ou de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Figure issue de Beck *et al.* (2014).

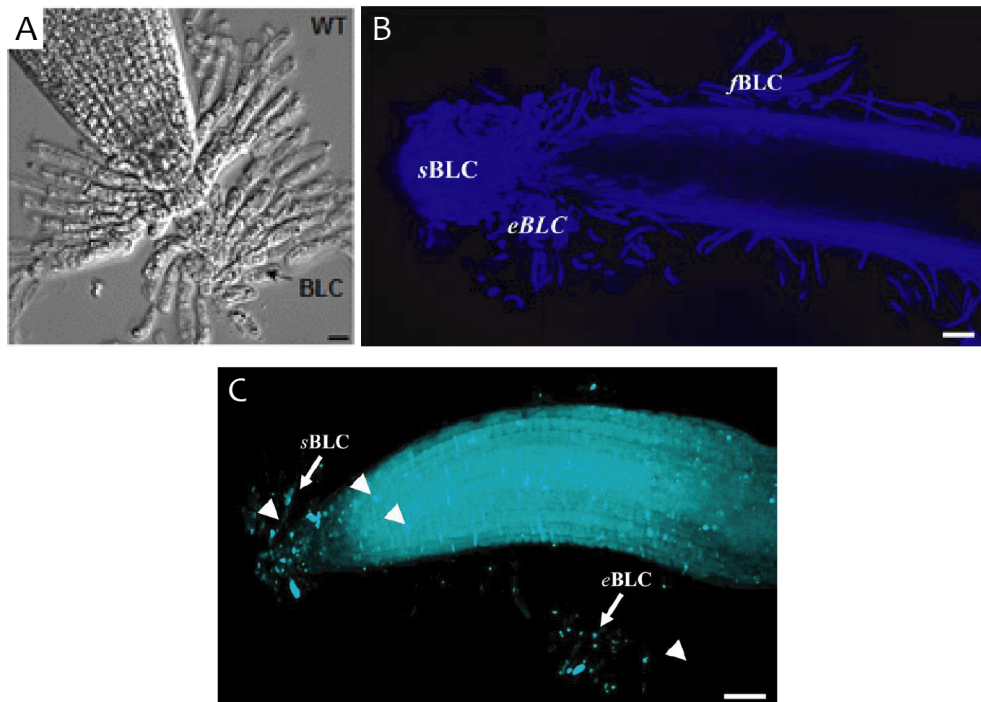


Figure In-8 : **Des cellules bordantes participent à la protection de la zone méristématique.**

Organisation des cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC) d'*A. thaliana* (A, photo issue de Driouich *et al.*, 2010) et de lin (*Linum usitatissimum*) colorées au calcofluor (B, photo issue de Plancot *et al.*, 2013). C, Dépôts de callose colorés à l'aniline blue sur la racine et les cellules apparentées aux cellules bordantes de lin 48h après traitement avec le peptide Flg22 (Plancot *et al.*, 2013). sBLC = BLC sphériques, eBLC = BLC allongées et fBLC = BLC filamenteuses. Échelle : A = 20 µm, B = 100 µm, C = 50 µm.

réponse immunitaire induite par l'exposition de la racine d'*A. thaliana* à des nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne* (Teixeira et al., 2016).

Dans le cas de la perception racinaire de la flagelline, il a récemment été montré que le gène codant pour le récepteur FLS2 impliqué dans la perception de Flg22 est exprimé préférentiellement au niveau de sites vulnérables à l'entrée de bactéries, comme les racines latérales, et les cellules de la stèle (Figure In-7) (Beck et al., 2014). En condition de stress, et suite à l'application de Flg22, l'expression de ce récepteur FLS2 s'étend dans les cellules corticales et épidermiques de la racine, ce qui accroît la capacité de la plante à percevoir la flagelline (Beck et al., 2014; Wyrsh et al., 2015). Cependant, même si FLS2 peut être présent dans tous les tissus de la racine, les réponses induites par Flg22 semblent plus prononcées dans la stèle (à l'intérieur de la barrière endodermique) que dans les tissus externes (Wyrsh et al., 2015).

La plante semble donc bien restreindre l'expression de récepteurs d'IPs dans des zones tissulaires précises, et en particulier au niveau de sites potentiels d'infection. Cette stratégie lui permet de limiter ou de supprimer efficacement la colonisation par l'activation localisée de la réponse immunitaire.

2) Protection de la zone méristématique

Si les cellules de la zone d'élongation, qui n'ont pas achevé leur différenciation, sont plus vulnérables que d'autres cellules racinaires à des attaques d'agents pathogènes, les cellules de la zone méristématique, cellules indifférenciées qui subissent d'intenses divisions mitotiques, ne sont pas pour autant encore plus sensibles. Ces cellules sont en effet protégées par une structure particulière de la racine, la coiffe.

La coiffe protège le MAR en empêchant l'érosion de ses cellules par la pénétration de la racine dans le sol. Exposées aux agressions du milieu, les cellules les plus apicales de la coiffe desquament, contribuant ainsi à la formation d'une gangue mucilagineuse protégeant la zone méristématique. Pour perdurer, la coiffe est donc en constant renouvellement grâce au méristème d'entretien situé sous le MAR. Enfin, la coiffe contient aussi des cellules particulières, les statocytes, qui sont responsables de la perception de la gravité et permettent la bonne orientation de la racine dans le sol (Meyer et al., 2008).

Cette organisation de la coiffe a longtemps fait consensus au sein du monde scientifique. Cependant ces dernières années des preuves que les cellules longtemps considérées comme en desquamation sont en réalité des cellules vivantes détachées de la coiffe se sont accumulées. Ces cellules bordantes (BC, *Border cells*) sont en effet des cellules se détachant de la coiffe au contact de l'eau et qui sont ainsi libérées individuellement dans la rhizosphère (Hawes et al., 2000). La production et la libération de ces cellules sont variables dans le règne végétal. Certaines plantes notamment des Brassicacées comme le colza ou *A. thaliana* ne libèrent pas de cellules bordantes mais des cellules qui leur sont apparentées (BLC, *Border-Like Cells*). Ces BLC ont la particularité de rester attachées en files de cellules superposées contrairement aux cellules bordantes qui sont libérées individuellement (Figure In-8) (Hawes et al., 2000). Les cellules bordantes ont un rôle fondamental de contrôle des interactions des racines avec les microorganismes résidant dans la rhizosphère.

De nombreuses études ont montré que ces cellules, tant les BC que les BLC, participent activement à la protection de la racine contre des attaques d'organismes pathogènes (Cannesan et al., 2012 ;

Hawes et al., 2016, 2000; Plancot et al., 2013). Il a ainsi été montré que les cellules bordantes du pois ont la capacité d'attirer des nématodes phytoparasites. Après 30 minutes au contact des BC, les nématodes attirés réduisent leur activité puis deviennent inertes (Hawes et al., 2000). Cette attraction chimiotactique d'agents pathogènes par les BC a aussi été montrée sur des zoospores. Ces zoospores pénètrent alors dans les BC mais la croissance de l'agent pathogène cesse définitivement suite à la pénétration de la cellule (Hawes et al., 2016). De même, les BC semblent stimuler la germination des spores du champignon *N. haematococca*. Le champignon se développe sans pénétrer les BC, puis sa croissance s'arrête, laissant la zone méristématique libre de toute infection (Driouich et al., 2013; Gunawardena and Hawes, 2002).

Les BC synthétisent également et sécrètent dans la rhizosphère des composés antimicrobiens, comme des phytoalexines, des glycoprotéines, des enzymes antimicrobiennes (dont des chitinases, des peptidases et des glucanases) et des protéines de défense (Cannesan et al., 2012, 2011; Wen et al., 2007). Cannesan *et al.* (2012) ont montré une stimulation de la production de BC ainsi qu'une production accrue de pisatine en réponse à une attaque d'agent pathogène chez le pois. Dans les exsudats des BC se trouvent aussi des glycoprotéines de type AGP (*Arabinogalactans proteins*). Les AGP produits par les BC du pois attirent ainsi les zoospores d'*A. euteiches* par chimiotactisme, et stimulent leur enkystement, évènement qui se traduit notamment par la perte de la mobilité de ces zoospores. Ces glycoprotéines semblent donc contribuer à éviter l'infection de la pointe racinaire en provoquant l'enkystement des zoospores à sa périphérie (Cannesan et al., 2012). Plancot *et al.* (2013) ont également montré que les BLC d'*A. thaliana* sont capables de percevoir des IPs comme Flg22 et les PGN et de générer une réponse immunitaire incluant production extracellulaire de ROS, dépôts de callose et activation de gènes de défense.

Enfin, des ADN extracellulaires (ADNex), et des protéines capables de s'y fixer comme l'histone H4, ont été trouvés dans le sécrétome de cellules bordantes. Ces ADNex contribuent à la défense de la racine en piégeant des agents pathogènes telluriques. Par exemple, il a été montré qu'un traitement de la pointe racinaire du pois avec une DNase I (qui dégrade les ADN) accélère la formation de nécroses provoquées par le champignon *N. haematococca* (F. Wen et al., 2009). La sécrétion d'ADNex par les BC rappelle un système de défense déployé par les neutrophiles chez les animaux. Ce système, appelé *Neutrophil Extracellular Trap* (NET), composé d'une matrice d'ADN associée à des composés antimicrobiens comme des protéases, des histones... permet de piéger/tuer les bactéries et les champignons pathogènes. L'ADNex est lui-même directement bactéricide car il chélate les cations et perturbe l'intégrité des membranes bactériennes (Tran et al., 2016). Chez les plantes, les BC piègent ainsi des organismes pathogènes (incluant nématodes, champignons ou bactéries), dans les minutes qui suivent leur perception. Les composés antimicrobiens contenus dans le sécrétome des BC interviennent ensuite pour détruire ces organismes et protéger la zone méristématique de leur attaque (Hawes et al., 2016).

IV- Contournement de la réponse immunitaire racinaire

Pour maintenir leur capacité à coloniser les racines des plantes, beaucoup d'organismes pathogènes peuvent supprimer les défenses induites par la racine suite à leur perception. Ainsi,

comme cela a été montré au niveau foliaire, la coronatine supprime la MTI déclenchée au niveau racinaire chez *A. thaliana* par un traitement avec Flg22 (Millet et al., 2010). Ce processus de suppression de la MTI racinaire diffère cependant de celui qui a été décrit au niveau foliaire. Pour rappel, dans les feuilles, la protéine COR supprime la MTI en exploitant l'antagonisme existant entre les voies de signalisation hormonales du JA et du SA. L'activation de la voie du JA par COR a pour effet d'inhiber la voie du SA et permet à la bactérie de contourner les défenses mises en place par la plante. Au niveau racinaire, Millet *et al.* (2010) ont montré que la suppression de la MTI par COR dépend bien de COI1, le régulateur de la réponse au JA, mais également du facteur de transcription MYC2. L'activation de MYC2 par COR semblerait réguler négativement les dépôts de callose induits par les IPs sur la racine en réprimant le facteur de transcription MYB51, un des éléments clé de cette réponse racinaire (Millet et al., 2010). En revanche, contrairement à ce qui a été montré au niveau foliaire, la suppression de la MTI racinaire par COR est indépendante de la voie du SA. De même, certains champignons pathogènes telluriques produisent diverses formes de jasmonates (dérivés du JA). C'est le cas de l'agent hémibiotrophe *Fusarium oxysporum* qui sécrète une vingtaine de jasmonates différents dont une majorité de JA-Ile. Il semble ainsi probable que ce champignon, comme d'autres organismes pathogènes telluriques, suppriment la MTI par le détournement des voies de signalisation hormonales (Gimenez-Ibanez et al., 2016; Millet et al., 2010).

Récemment, de nouveaux facteurs de virulence permettant à des organismes phytopathogènes telluriques de contourner les défenses des racines de leurs plantes hôtes ont été identifiés. Ces facteurs de virulence sont des DNase extracellulaires (exDNase), sécrétées dans le milieu par ces agents pathogènes et capables de dégrader les ADNex produits par les cellules bordantes de l'apex racinaire. Des bactéries *R. solanacearum* mutantes, déficientes en gènes codant pour des exDNase, sont ainsi moins virulentes que la souche sauvage contre sa plante hôte, le pois (Tran et al., 2016). De même, des exDNase sont nécessaires au champignon *Cochliobolus heterostrophus* pour coloniser tant les feuilles que les racines du maïs (Park et al., 2019).

Mais les racines des plantes ne sont pas seulement exposées à des agents pathogènes. De nombreux organismes bénéfiques, résident dans la rhizosphère, interagissent avec les racines et certains sont capables de coloniser les tissus racinaires.

Il a été montré que ces organismes bénéfiques sont, dans un premier temps, reconnus par la racine comme potentiellement pathogènes, ce qui provoque l'induction d'une réponse de défense transitoire incluant production de ROS et dépôts de callose (Yu et al., 2019). Il est donc nécessaire que ces organismes bénéfiques, comme certains organismes pathogènes le font, suppriment la réponse de défense qu'ils déclenchent dans la racine.

Certains organismes bénéfiques adoptent une stratégie d'évitement qui leur permet de ne pas être perçu par les cellules racinaires. Par exemple, les racines du lotier corniculé (*Lotus japonicus*), une fabacée bénéficiant d'interactions symbiotiques avec des bactéries rhizobiales, génèrent une forte réponse immunitaire à Flg22. En revanche, celles-ci ne répondent pas à la flagelline issue de son partenaire symbiotique *Mesorhizobium loti* (Lopez-Gomez et al., 2012). Ces bactéries rhizobiales montrent en effet une importante variabilité dans la séquence N-terminale, normalement très conservée, de la flagelline, ce qui explique l'absence de perception de ces formes de flagelline par la plante (Lopez-Gomez et al., 2012). Des observations similaires ont été réalisées entre la vigne et la bactérie PGPR *Burkholderia phytofirmans*. Chez la vigne le récepteur VvFLS2 reconnaît

différentiellement des épitopes de Flg22 dérivés de diverses bactéries. Ainsi, un peptide Flg22 issu de la bactérie PGPR *B. phytofirmans*, n'induit qu'une faible réponse immunitaire en comparaison de la réponse induite par des peptides Flg22 dérivés de bactéries pathogènes. Ces résultats indiquent une évolution de la flagelline de la bactérie PGPR pour éviter le système immunitaire de la vigne (Trda et al., 2014). Le champignon endophyte *Piriformospora indica* est un PGPF qui colonise les cellules épidermiques et corticales de la racine d'un grand nombre de plantes dont l'orge, *Hordeum vulgare*, et *A. thaliana*. Comme la plupart des champignons, *P. indica* possède dans sa paroi des polysaccharides, incluant des β -glucanes, qui sont les plus représentés, et qui sont reconnus par les cellules végétales comme des IPs. Pour éviter la stimulation de l'immunité des racines de ses plantes hôtes liée à la perception des β -glucanes, ce champignon produit une petite protéine FGB1 (*Fungal Glucan-Binding 1*). Cette protéine se lie aux β -glucanes, altérant ainsi la composition de la paroi fongique et empêchant l'induction de la MTI déclenchée par la perception de ces IPs (Wawra et al., 2016).

D'autres organismes bénéfiques suppriment activement la réponse de défense de la racine (Yu et al., 2019). Des racines d'*A. thaliana* colonisées par le champignon *P. indica* perdent leur capacité à induire des réponses de défense à des IPs comme Flg22 et la chitine. Un prétraitement des racines avec ces IPs limite d'ailleurs la colonisation des racines par *P. indica* (Jacobs et al., 2011). Les mécanismes permettant à ce champignon de supprimer la réponse immunitaire de son hôte sont encore méconnus mais semblent impliquer la voie de signalisation hormonale du JA qui supprime les défenses dépendantes du SA (Jacobs et al., 2011). Comme certains agents pathogènes, des microorganismes bénéfiques sont susceptibles de délivrer des effecteurs capables d'interférer avec le système immunitaire de leurs plantes hôtes. Par exemple il a été montré chez le tabac que l'effecteur NopM sécrété par la bactérie PGPR *Sinorhizobium sp.* NGR234, essentiel à la formation normale des nodules chez la plante hôte *Lablab purpureus*, supprime la production de ROS induite par Flg22 (Xin et al., 2012).

Récemment, une étude transcriptomique complète a été réalisée sur des racines d'*A. thaliana* inoculées avec la bactérie PGPR *Pseudomonas simiae* WCS417 (Stringlis et al., 2018a). L'objectif de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la bactérie PGPR stimule la croissance et les défenses de son hôte, sans pour autant déclencher de réaction immunitaire qui aurait alors des effets néfastes sur la croissance de la plante (Hacquard et al., 2017). Pour cela, les réponses précoces de la racine à la bactérie et à des IPs purifiés, notamment deux peptides Flg22, Flg22⁴¹⁷ dérivé de cette bactérie bénéfique et Flg22^{Pa} issu de la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ont été comparées. Cette étude révèle que la réponse racinaire précoce aux peptides Flg22⁴¹⁷ et Flg22^{Pa}, dont les séquences diffèrent de 5 acides aminés, sont très similaires. Aussi, les gènes impliqués dans la réponse à la bactérie *P. simiae* WCS417 sont relativement similaires à ceux impliqués dans la réponse à Flg22⁴¹⁷. La réponse racinaire précoce à la bactérie bénéfique semble donc être largement provoquée par les IPs portés par cette bactérie. En revanche, près de la moitié des gènes activés en réponse à Flg22⁴¹⁷ ne répondent pas à *P. simiae* WCS417. Cette étude suggère ainsi que la bactérie bénéfique supprime activement une part importante de la réponse racinaire induite par ces IPs (Stringlis et al., 2018a).

La suppression de l'immunité racinaire est ainsi probablement un élément clé permettant la colonisation des racines par des organismes bénéfiques.

V- Rôle du microbiome rhizosphérique

Comme abordé précédemment, les plantes interagissent au niveau racinaire avec de nombreux microorganismes bénéfiques. Ces interactions bénéfiques sont par exemple mises en évidence par le concept de sol suppressif. Les sols suppressifs sont des sols dans lesquels des plantes présentent naturellement une résistance accrue à un ou des organismes phytopathogènes. Dans ces sols, des agents pathogènes ne s'établissent ou ne persistent pas ou provoquent des maladies dont les dégâts sur la plante sont limités ou diminuent au cours des successions culturales (Pieterse et al., 2014; Raaijmakers and Mazzola, 2016). L'effet protecteur de ces sols sur les cultures s'explique par la présence de populations microbiennes spécifiques qui antagonisent certains agents pathogènes. Les sols de la vallée de la Durance à Châteaurenard sont un exemple très connu de sols suppressifs. Des melons cultivés dans ces sols montrent une résistance naturellement accrue à des fusarioses vasculaires. Cette résistance semble liée à la présence dans le sol de champignons bénéfiques du genre *Fusarium* qui limitent le développement de *Fusarium* pathogènes, notamment par compétition pour les ressources trophiques du milieu (Alabouvette et al., 1984). La manipulation du microbiome rhizosphérique et la création de sols suppressifs « artificiels » enrichis en microorganismes bénéfiques est une voie d'étude très intéressante dans le cadre de la recherche de pratiques culturales alternatives permettant de réduire l'usage de produits phytosanitaires en protection des plantes (Mauchline and Malone, 2017).

1) Des microorganismes bénéfiques

Les microorganismes bénéfiques pour les plantes incluent des bactéries PGPR, comprenant surtout des bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, des rhizobactéries à nodosités, responsables de symbioses rhizobiennes chez les Fabacées, des champignons GPFP comme ceux appartenant au genre *Trichoderma* ou l'endophyte *P. indica*, ainsi que des champignons mycorhiziens. Les interactions symbiotiques entre plantes et bactéries ou champignons bénéfiques sont très importantes. Plus de 80% des plantes vasculaires bénéficient ainsi d'interactions symbiotiques avec des champignons mycorhiziens (Reimer-Michalski and Conrath, 2016). L'établissement de ces symbioses mycorhiziennes et rhizobiennes est bien documenté. Elles commencent par des échanges de signaux chimiques entre la racine et son futur partenaire. La racine sécrète dans la rhizosphère diverse molécules, notamment des strigolactones et des flavonoïdes. Les strigolactones sont perçues par les champignons mycorhiziens qui produisent alors des facteurs Sym permettant l'établissement de la symbiose avec la racine (Oldroyd et al., 2009). Les flavonoïdes sont quant à eux perçus par les bactéries rhizobiales qui produisent en retour des facteurs Nod. La plante perçoit ces facteurs Nod et initie la formation de structures spécialisées sur les racines, les nodules, qui seront le siège de la symbiose bactérienne. Lors de leur formation, les nodules englobent les bactéries rhizobiales, qui se retrouvent ainsi piégées à l'intérieur (Oldroyd et al., 2009). Les bactéries et champignons bénéfiques non symbiotiques semblent interagir avec les racines de leurs plantes hôtes via des dialogues moléculaires similaires. Les mécanismes par lesquels ces microorganismes bénéfiques stimulent la croissance et la défense des plantes ont été très étudiés ces dernières années pour leurs applications agricoles potentielles. Ils ont ainsi des effets directs sur la croissance de leurs plantes hôtes, par fixation d'azote, solubilisation de minéraux, biosynthèse de phytohormones... et

des effets indirects, par la production de composés antibiotiques, d'enzymes hydrolytiques ou par l'induction d'une résistance systémique (Kim and Anderson, 2018).

a. Effets directs

De nombreux microorganismes bénéfiques augmentent la disponibilité de nutriments pour la plante. Un exemple très connu est représenté par l'interaction des Fabacées avec les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, les rhizobiums, au sein des nodosités (Meyer et al., 2008). Des bactéries du genre *Pseudomonas* contribuent aussi à l'accroissement de la nutrition de la plante. Ces bactéries sécrètent notamment dans le sol des sidérophores qui forment des complexes avec les ions Fe^{3+} . La complexation de ces ions les rend plus solubles dans la solution du sol et les rend plus facilement assimilables par la plante (Jin et al., 2014; Tomasi et al., 2013).

Certains microorganismes bénéfiques stimulent la croissance des plantes par modification de la balance hormonale. Par exemple, l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase, qui est produite par de nombreuses bactéries et champignons, dégrade l'ACC, précurseur de synthèse de l'ET (Gupta and Pandey, 2019; Singh et al., 2015). La réduction de la concentration d'ET diminue ainsi l'effet inhibiteur de cette hormone sur la croissance. D'autres composés microbiens ciblent la voie de l'AIA (Acide Indole Acétique). En stimulant la voie de l'AIA dans la plante, ils provoquent la prolifération de racines latérales, ce qui a pour effet de stimuler la croissance de la plante en permettant une meilleure exploration du sol et donc une plus forte absorption d'eau et de nutriments (Kim and Anderson, 2018).

Par la stimulation de la croissance des plantes, ces microorganismes bénéfiques améliorent la tolérance de leurs plantes hôtes à des stress abiotiques (Gupta and Pandey, 2019). L'utilisation de microorganismes bénéfiques est particulièrement intéressante dans le contexte de réchauffement climatique actuel dans lequel les plantes seront de plus en plus fréquemment exposées à des stress thermiques, hydriques, salins... (IPCC, 2019)

b. Effets indirects

Les microorganismes bénéfiques agissent également de manière indirecte, notamment en contrôlant le développement d'organismes pathogènes. Certaines bactéries bénéfiques produisent ainsi des composés antibiotiques qui ont la propriété d'inhiber la croissance d'organismes pathogènes. C'est le cas du 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) qui est un composé antibiotique produit par *Pseudomonas fluorescens* qui présente un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance du champignon pathogène tellurique *Sclerotinia rolfii*. De même la zwittermicine, produite par *Bacillus subtilis* présente des propriétés antibiotiques contre plusieurs agents pathogènes telluriques (Saraf et al., 2014). D'autres bactéries bénéfiques sécrètent dans la rhizosphère des enzymes hydrolytiques, des protéases, des glucanases, des chitinases... qui dégradent des composés pariétaux de champignons et d'oomycètes pathogènes (Mhlongo et al., 2018). Plusieurs bactéries PGPR, comme celles appartenant au genre *Bacillus*, produisent des lipopeptides (LPs) qui présentent des propriétés antibiotiques (Hashem et al., 2019). Les LPs sont synthétisés par des complexes multienzymatiques non-ribosomiaux. Ils sont constitués d'une portion peptidique cyclisée et d'une portion lipidique. Ces molécules amphiphiles présentent des effets antagonistes sur un large spectre de microorganismes incluant bactéries et champignons (Ongena and Jacques, 2008). Cet antagonisme peut aussi être assuré par compétition pour des ressources du milieu. Ainsi, la production de sidérophores

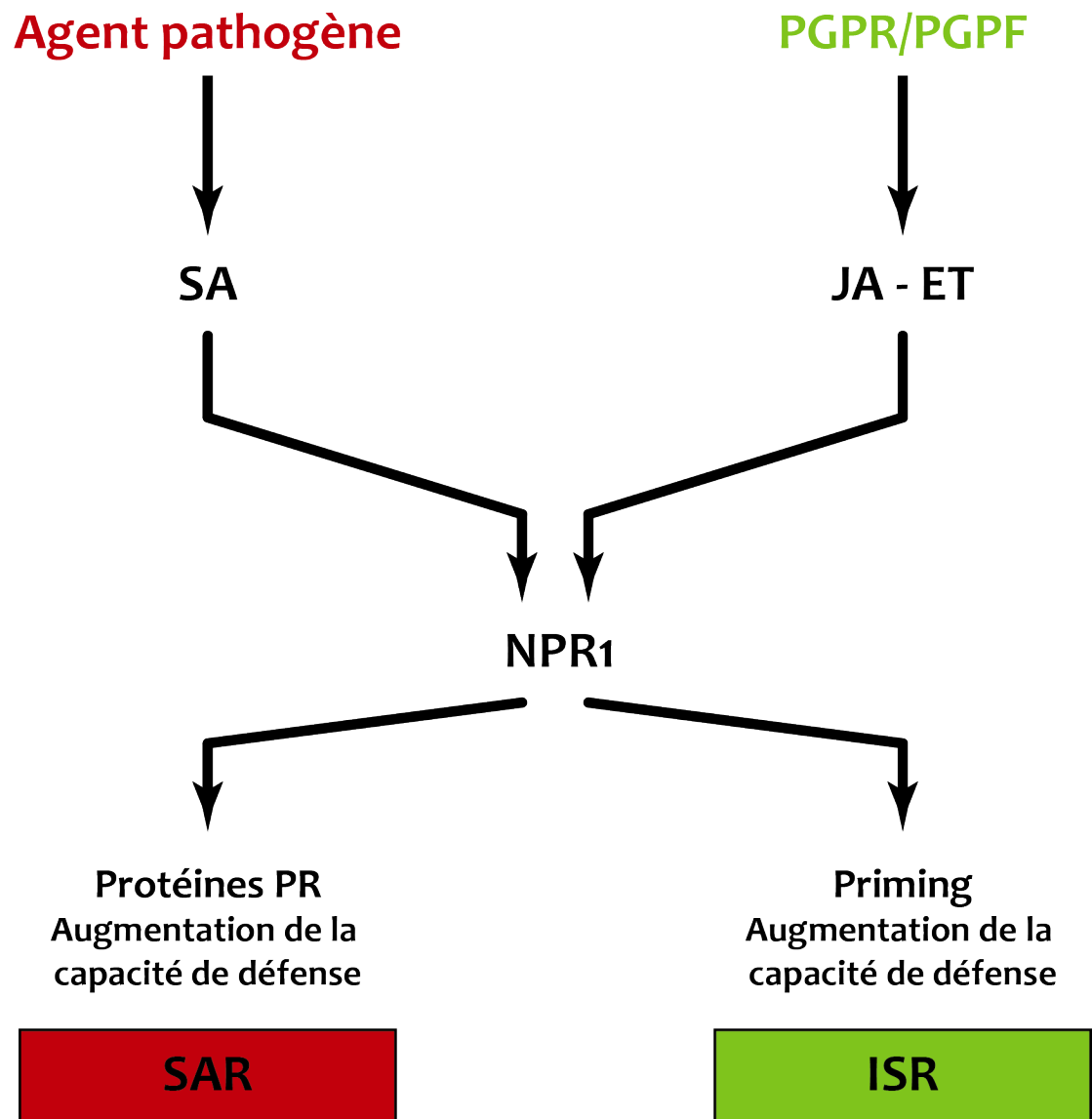


Figure In-9 : Modèle schématique représentant les voies de transduction de la SAR, induite par des agents pathogènes, et de l'ISR, induite par des microorganismes PGPR ou PGPF, chez *A. thaliana*. Figure adaptée de Pieterse *et al.* (2002).

antagonise le développement d'organismes pathogènes telluriques en réduisant la quantité de fer disponible pour ces agents pathogènes (Patil et al., 2014).

Enfin, beaucoup de microorganismes bénéfiques sont connus pour leur capacité à induire dans la plante une résistance systémique. Dans les années 1990, il a été montré que la colonisation du système racinaire de l'œillet par la bactérie PGPR *P. fluorescens* WCS417r se traduit par un niveau de résistance accru des parties aériennes de la plante contre le champignon pathogène *F. oxysporum* (Peer et al., 1991). Depuis, de nombreuses études ont montré la capacité de microorganismes bénéfiques (PGPR et PGPF) à stimuler la défense des plantes de manière systémique par un mécanisme dit de Résistance Systémique Induite (ISR, *Induced Systemic Resistance*) qui est détaillé dans la partie suivante.

2) Résistance Systémique Induite (ISR)

L'ISR est une autre forme de résistance systémique, déclenchée cette fois par l'interaction des racines avec des microorganismes bénéfiques (Figure In-9). Comme la SAR, l'ISR est efficace contre un large spectre d'agents pathogènes. Mais à la différence de la SAR, l'ISR est aussi efficace contre des microorganismes nécrotrophes (van der Ent et al., 2018) et contre des insectes herbivores (Pieterse et al., 2014). Aussi, elle n'implique pas l'accumulation de protéines PR dans les tissus distants du site d'infection ce qui est une caractéristique de la SAR. Des arabettes présentant une ISR par l'interaction au niveau racinaire avec la bactérie PGPR *P. fluorescens* WCS417r montrent une résistance accrue au niveau foliaire contre des agents pathogènes sans pour autant que cette résistance ne se traduise par l'accumulation systémique des protéines PR-1, PR-2 et PR-5 considérées comme des marqueurs de la SAR (van der Ent et al., 2018).

Par ailleurs, grâce à l'utilisation de lignées mutantes d'*A. thaliana* affectées dans les voies de signalisation hormonales du SA, du JA et de l'ET, il a été montré que les mécanismes impliqués dans l'ISR sont indépendants du SA et reposent plutôt sur les voies du JA et de l'ET (Nie et al., 2017; Pieterse et al., 2014). Le régulateur clé de la réponse au SA, NPR1, est néanmoins requis pour l'établissement de l'ISR. Dans la voie de signalisation du SA, NPR1 agit au niveau nucléaire comme activateur de l'expression de gènes de la réponse au SA. Cependant, d'après plusieurs études, ce serait plutôt la protéine NPR1 cytosolique qui interviendrait dans l'induction des voies de signalisations du JA et de l'ET lors de l'ISR (Stein et al., 2008; Withers and Dong, 2016). La compréhension de l'intervention précise de cette protéine dans l'établissement de l'ISR reste malgré tout incomplète.

Certaines bactéries PGPR comme *Paenibacillus alvei* K165 ou *P. fluorescens* SS101 et certains trichodermes PGPF impliquent cependant une ISR dépendante du SA qui ressemble à une SAR (Pieterse et al., 2014).

La recherche du signal initial conduisant à l'activation de l'ISR a permis de mettre en évidence que des IPs issus de microorganismes bénéfiques peuvent induire par eux même une ISR. C'est le cas du flagelle de la bactérie *Pseudomonas putida* WCS358. Un traitement des racines d'*A. thaliana* avec une solution contenant du flagelle isolé de cette bactérie PGPR conduit en effet à l'induction d'une ISR contre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) (Meziane et al., 2005). Il est cependant intéressant de remarquer qu'un traitement racinaire avec ce flagelle n'active pas d'ISR chez la tomate contre le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Meziane et al., 2005).

Au contraire, un traitement racinaire avec des LPs induit une ISR sur tomate et haricot contre *B. cinerea* (Ongena et al., 2007). D'autres IPs capables d'induire une ISR ont été identifiés, comme des lipopolysaccharides, des molécules antibiotiques incluant le DAPG et des pyocyanines, des exopolysaccharides, des biosurfactants... (De Vleeschauwer and Höfte, 2009; Ongena et al., 2007; Wu et al., 2018). De plus, des souches mutantes de bactéries PGPR déficientes en certains IPs, flagelle, fengycine, surfactine, ou altérées dans la production de lipopolysaccharides restent capables d'induire une ISR (Meziane et al., 2005; Wu et al., 2018). Ces bactéries PGPR possèdent donc de multiples IPs contribuant à l'induction de l'ISR.

La reconnaissance d'IPs du microorganisme bénéfique par la racine semble donc être l'évènement initiateur de l'ISR. Cette perception d'IPs déclencherait alors dans la racine l'émission d'un signal se dispersant systématiquement dans les tissus végétaux et conduisant à l'augmentation de la capacité de défense de la plante contre des infections par des agents pathogènes.

Contrairement à la SAR qui se traduit par une importante reprogrammation transcriptionnelle des cellules, des plantes inoculées avec un microorganisme bénéfique au niveau racinaire ne montrent que de faibles modifications transcriptionnelles au niveau foliaire. Lors d'une attaque ultérieure d'agent pathogène ou d'insecte herbivore, les feuilles montrent malgré tout une amplification des réactions de défense conduisant à une résistance accrue impliquant l'expressions de gènes notamment associés à la réponse au JA et à l'ET (Pieterse et al., 2014). Au contraire, suite à l'inoculation de microorganisme bénéfique au niveau racinaire, les racines montrent d'importantes altérations de l'expression de gènes. Le gène codant pour le facteur de transcription MYB72 est ainsi l'un des gènes les plus significativement induits dans les racines d'*A. thaliana* en réponse à la colonisation des racines avec plusieurs bactéries bénéfiques dont *P. simiae* WSC417r (Stringlis et al., 2018a). Dans des plantes non inoculées, MYB72 est faiblement exprimé dans les cellules de la stèle, mais lors de l'inoculation avec *P. simiae* WSC417r, il s'exprime très fortement dans l'épiderme et dans les cellules corticales de la racine (Pieterse et al., 2014). Des mutants d'*A. thaliana*, déficients en ce gène sont incapables de mettre en place une ISR par l'inoculation des racines avec *P. simiae* WSC417r (Van der Ent et al., 2008). MYB72 est également nécessaire à l'ISR activée par la colonisation des racines d'*A. thaliana* avec des champignon PGPF du genre *Trichoderma* (Stringlis et al., 2018b). Ce facteur de transcription MYB72 apparaît ainsi comme un régulateur central de l'ISR.

Outre son rôle dans l'établissement de l'ISR, MYB72 est impliqué dans la réponse de la plante à des conditions de déficit en fer. Il est nécessaire à la survie de la plante dans des sols où la disponibilité en fer est limitée. En effet, chez *A. thaliana*, MYB72 est requis pour la biosynthèse de composés phénoliques, des coumarines, sécrétées dans la rhizosphère et permettant une meilleure assimilation des ions Fe^{3+} par la plante. La scopolétine est la coumarine principale sécrétée par *A. thaliana* dans la rhizosphère sous la dépendance de MYB72. Cette coumarine possède par ailleurs des propriétés antibiotiques qui inhibent sélectivement la croissance de champignons pathogènes telluriques alors que cette molécule ne présente pas d'effet inhibiteur sur des rhizobactéries bénéfiques (Stringlis et al., 2018b).

De nombreuses études restent nécessaires pour comprendre les différentes étapes conduisant à la mise en place de l'ISR et les mécanismes moléculaires sous-jacents. Malgré une importance cruciale des hormones JA et ET dans ce processus, l'ISR activée par la colonisation de

racines d'*A. thaliana* par des bactéries PGPR ne se traduit pas par la production de ces hormones. L'ISR ne se traduit pas non plus par l'induction de l'expression de gènes associés à la réponse au JA et à l'ET dans les tissus foliaires jusqu'à l'attaque d'un agent pathogène. L'ISR serait plus associée à une augmentation de la sensibilité à ces hormones plutôt qu'à une augmentation de leur synthèse (Pieterse et al., 2014, 2000). Des plantes développant une ISR répondent plus rapidement et plus fortement à une attaque ultérieure d'agent pathogène ou d'insecte herbivore. L'expression de gènes de la réponse au JA et à l'ET est ainsi potentialisée au niveau foliaire dans ces plantes (Pieterse et al., 2014). Cet accroissement de la capacité de la plante à mettre en place des réponses de défense est appelé priming.

3) Priming

Le priming est un mécanisme clé des différentes formes de résistance systémique. Il peut être induit tant par des microorganismes bénéfiques que par des agents pathogènes ou des insectes herbivores ainsi que par des traitements chimiques, par exemple avec du SA, du JA, du BABA (Acide β -amino-butyrique) ou du benzothiadiazole (composé synthétique imitant le SA) (Gourbal et al., 2018). Dans les plantes potentialisées, c'est-à-dire dans lesquelles le priming est activé, les réponses de défense ne sont pas directement activées mais leur mise en place est accélérée suite à la perception d'un stress biotique ou abiotique, conduisant à un niveau de résistance accru (dans le cas de la SAR, des réponses de défenses sont déjà activées suite à la première exposition à un agent pathogène et sont amplifiées lors d'une exposition ultérieure par le processus de priming) (Pieterse et al., 2014). Par exemple, des arabettes potentialisées par la colonisation des racines avec la bactérie PGPR *P. fluorescens* WCS417r montrent une augmentation des dépôts de callose aux sites de pénétration de la plante par l'agent pathogène *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Van der Ent et al., 2009). De même le processus de priming activé par l'interaction de *B. subtilis* FB17 avec les racines d'*A. thaliana* se traduit notamment par la fermeture plus rapide des stomates lors de l'attaque de la plante (Kumar et al., 2012). Le coût énergétique de ce mécanisme est faible par rapport à l'activation directe de mécanismes de défense. Il accorde ainsi un double avantage à la plante puisque son niveau de résistance est amélioré sans altération de son développement.

Malgré de nombreuses études sur ce phénomène, les mécanismes moléculaires du priming sont relativement méconnus. La mise en place de ce processus semble néanmoins impliquer des modifications d'ordre moléculaires et épigénétiques dans les cellules.

a. Modifications moléculaires

Une étude a ainsi mis en évidence que des arabettes potentialisées par un traitement avec du benzothiadiazole montrent une augmentation de la synthèse de plusieurs PRR et de la mise en place de ces récepteurs à la membrane plasmique des cellules. Cette étude suggère que le mécanisme de priming repose notamment sur une augmentation de la capacité de la plante à percevoir de potentiels attaquants (Tateda et al., 2014).

Plusieurs études ont aussi montré que le priming est associé à l'accumulation d'enzymes inactives nécessaires pour l'amplification ultérieure du signal. Beckers *et al.* (2009) ont en effet montré chez *A. thaliana* qu'un traitement au benzothiadiazole ou l'inoculation localisée de feuilles avec une souche avirulente de la bactérie pathogène *Pst* DC3000, induisent l'accumulation systémique de transcrits ARNm et de formes inactives des MAPK3 et MAPK6. L'inoculation ultérieure de la plante

avec une souche virulente de la bactérie se traduit par une augmentation quantitative des MAPK3 et MAPK6 activées par rapport à des plantes non potentialisées. Cet accroissement de la quantité de MAPK3 et MAPK6 activées dans les plantes potentialisées est aussi associée à une augmentation de l'expression de gènes de défense, comme le gène codant pour la protéine PR-1 (Beckers et al., 2009; Conrath et al., 2015). D'une manière similaire, l'ISR induite par la colonisation des racines du concombre par le champignon PGPF *Trichoderma asperellum*, se traduit par l'activation d'un processus de priming, représenté par l'accumulation systémique de TIPK (*Trichoderma-Induced Protein Kinase*) une MAPK homologue de la MAPK3 d'*A. thaliana* (Shoresh et al., 2006).

Des études ont aussi récemment suggéré une stimulation du métabolisme primaire lors de la mise en place du priming. Le rôle de cette stimulation serait de fournir un supplément d'énergie aux cellules pour amplifier la synthèse et l'activation de phytohormones, de phytoalexines, l'expression de gènes de défense... (Mhlongo et al., 2018).

Enfin, d'autres études ont montré que des molécules de signalisation et des métabolites secondaires conjugués s'accumulent lors de la mise en place du priming. Des molécules de signalisation glycosylées, en particulier des dérivés de l'Aza, du SA et du MeSA, s'accumulent en effet dans des cellules de tabac potentialisées par un traitement avec des lipopolysaccharides (Mhlongo et al., 2018). Ces molécules de signalisation pourraient alors être activées rapidement lors de la détection d'un stress comme une attaque ultérieure d'agent pathogène.

b. Modifications épigénétiques

Une autre hypothèse permettant d'expliquer la mise en place du processus de priming, repose sur des modifications épigénétiques, et notamment des modifications de la chromatine, qui rendraient des promoteurs de gènes de défense accessibles à des facteurs de transcription. La libération des promoteurs de ces gènes rendrait ainsi leur induction plus rapide et plus forte lors de la perception d'un stress par la plante (Mauch-Mani et al., 2017).

Chez les eucaryotes, la chromatine joue un rôle fondamental de régulation de l'expression des gènes. C'est une structure au sein de laquelle l'ADN est enroulé autour de nucléosomes constitués de huit protéines histones. Ces protéines histones peuvent subir des modifications, des acétylations, des méthylations, des phosphorylations... qui provoquent la déstabilisation de la chromatine (He and Li, 2018). L'effet de ces modifications sur la régulation de l'expression des gènes n'est pas parfaitement connu ; elles conduisent soit à l'inhibition soit à l'activation de l'expression de gènes. Par exemple l'acétylation des histones semble provoquer un relâchement de la liaison ADN/histone rendant ainsi disponible des sites de fixation de facteurs de transcription et de protéines régulatrices (Eberharther and Becker, 2002).

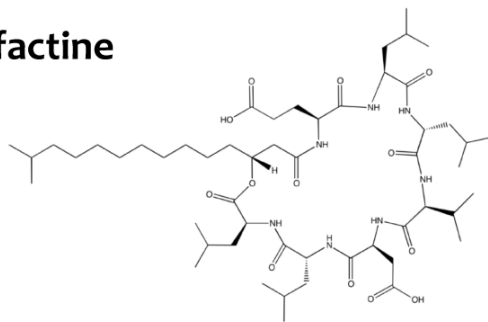
Ces modifications épigénétiques jouent un rôle important dans l'activation de mécanismes de défense (He and Li, 2018). En effet, il a été montré que des arabettes compromises dans la méthylation des histones sont moins sensibles à l'attaque d'agents pathogènes, et présentent des niveaux d'induction de gènes de défense plus importants lors de l'infection (Downen et al., 2012). De même, une étude a montré qu'un traitement au benzothiadiazole provoque l'acétylation et la méthylation d'histones au niveau des promoteurs des gènes *WRKY29*, *WRKY6* et *WRKY53* qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au SA (Jaskiewicz et al., 2011). L'altération de la chromatine résultant de ces modifications, facilite l'expression plus rapide de ces facteurs de transcription, et donc des gènes qu'ils contrôlent, lors de l'infection par un agent pathogène.

Les modifications affectant les histones provoquent l'altération de la structure de la chromatine et la libération de zones de la molécule d'ADN. Ces zones sont alors rendues accessibles à des facteurs de transcription, ce qui permet d'accélérer la réponse de la plante à un stimulus comme une attaque d'organisme pathogène (Mauch-Mani et al., 2017).

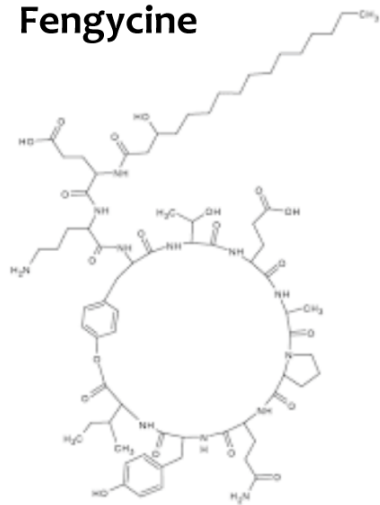
c. *Héritabilité du priming*

Enfin, le processus de priming semble perdurer dans le temps et serait transmissible à la descendance. Ainsi, les histones situées au niveau des promoteurs des gènes *PR-1*, *WRKY6* et *WRKY53*, sont davantage acétylées dans la descendance de plantes infectées par la bactérie *Pst* DC3000 (Luna et al., 2012). De même, une autre étude a montré que la descendance de plantes potentialisées par un traitement au BABA ou par inoculation avec une souche avirulente d'une bactérie pathogène, sont plus résistantes à une attaque de *Pst* DC3000 ou de l'oomycète *H. arabidopsidis*, et montrent une accumulation plus rapide et plus importante de transcrits de gènes de défense liés à la voie du SA (Reimer-Michalski and Conrath, 2016; Slaughter et al., 2012). Par ailleurs cette étude a également mis en évidence que la descendance de plantes potentialisées montre une réponse plus importante à l'induction ultérieure d'un nouveau processus de priming, par rapport à la descendance de plantes non potentialisées.

Surfactine



Fengycine



Iturine A

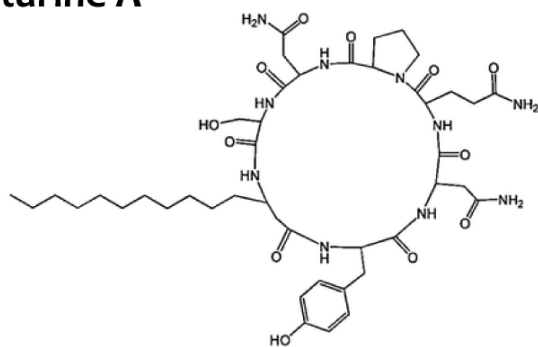


Figure In-10 : Structure de Lipopeptides de *Bacillus subtilis*.

Partie 3 - Des IPs amphiphiles

Comme abordé dans la première partie, les IPs sont des molécules endogènes ou exogènes, perçues par des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, capables de stimuler l'immunité végétale. Ces molécules incluent les MAMPs, les effecteurs (aussi bien apoplastiques que cytosoliques) et les DAMPs ainsi que toute autre molécule microbienne ou végétale dont la présence traduit une attaque d'organisme pathogène et induit une réponse immunitaire (Kanyuka and Rudd, 2019). Les IPs apoplastiques, c'est-à-dire ceux qui sont présents dans l'apoplaste, par opposition à ceux libérés directement dans le cytoplasme par des agents pathogènes, présentent une importante diversité de nature biochimique, incluant des protéines, des glycoprotéines, des polysaccharides et des lipides. La plupart de ces IPs identifiés à ce jour sont perçus par des PRR. C'est le cas par exemple du peptide Flg22, correspondant à l'épitope N-terminal de la flagelline qui est perçu par le PRR FLS2 présent chez la plupart des plantes supérieures (monocotylédones et dicotylédones) ou du peptide Elf18, peptide issu de la partie N-terminale du facteur d'élongation Tu (EF-Tu) perçu par le PRR EFR chez *A. thaliana* (Chinchilla et al., 2006; Gómez-Gómez et al., 1999; Gómez-Gómez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006). Certains IPs sont perçus par l'association de PRR et de co-récepteurs comme la chitine qui est perçue chez *A. thaliana* par le PRR LYK5 s'associant à la chitine et au co-récepteur CERK1 afin d'induire les réponses de défense (Cao et al., 2014). Enfin, des IPs de nature amphiphile, c'est-à-dire dotés d'une portion hydrophile et d'une portion hydrophobe, existent mais sont relativement moins étudiés. Les lipopeptides (LPs), les lipopolysaccharides (LPS) et les rhamnolipides (RLs) sont ainsi des IPs amphiphiles produits par de nombreuses espèces bactériennes capables de stimuler le système immunitaire des plantes.

I- Les lipopeptides (LPs)

Les lipopeptides (LPs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une queue lipidique liée à un oligopeptide court linéaire ou cyclisé. Ces molécules sont produites par des champignons, notamment du genre *Aspergillus*, et diverses espèces bactériennes appartenant notamment aux genres *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Bacillus*, et dont certaines sont connues pour leurs propriétés biopesticides (Raaijmakers et al., 2010). La bactérie PGPR *B. subtilis* produit ainsi de nombreux composés antimicrobiens, incluant des LPs appartenant à la famille des surfactines, des iturines et des fengycines (Figure In-10) (Ongena and Jacques, 2008). Chez cette bactérie, les LPs sont composés de sept (pour les surfactines et les iturines) ou de 10 acides aminés (fengycines) liés à un unique acide gras β -aminé (iturines) ou β -hydroxylé (surfactines et fengycines) (Raaijmakers et al., 2010). Plusieurs variants appartenant à ces trois familles de LPs sont produits par les complexes multienzymatiques appelés NRPSs (*Non-Ribosomal Peptide Synthetases*) responsables de la synthèse des LPs chez *B. subtilis* (Ongena and Jacques, 2008).

En raison de leurs propriétés surfactantes, les LPs ont des rôles dans la formation de biofilms bactériens, la mobilité bactérienne et l'adhésion aux surfaces. Par ces propriétés, les LPs sont importants dans le cadre de l'interaction des bactéries avec les racines des plantes puisqu'ils participent à la colonisation de la surface racinaire (Ongena and Jacques, 2008). Les LPs présentent aussi de fortes propriétés antimicrobiennes, conférant un avantage compétitif aux bactéries les produisant. Ils présentent ainsi des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales,

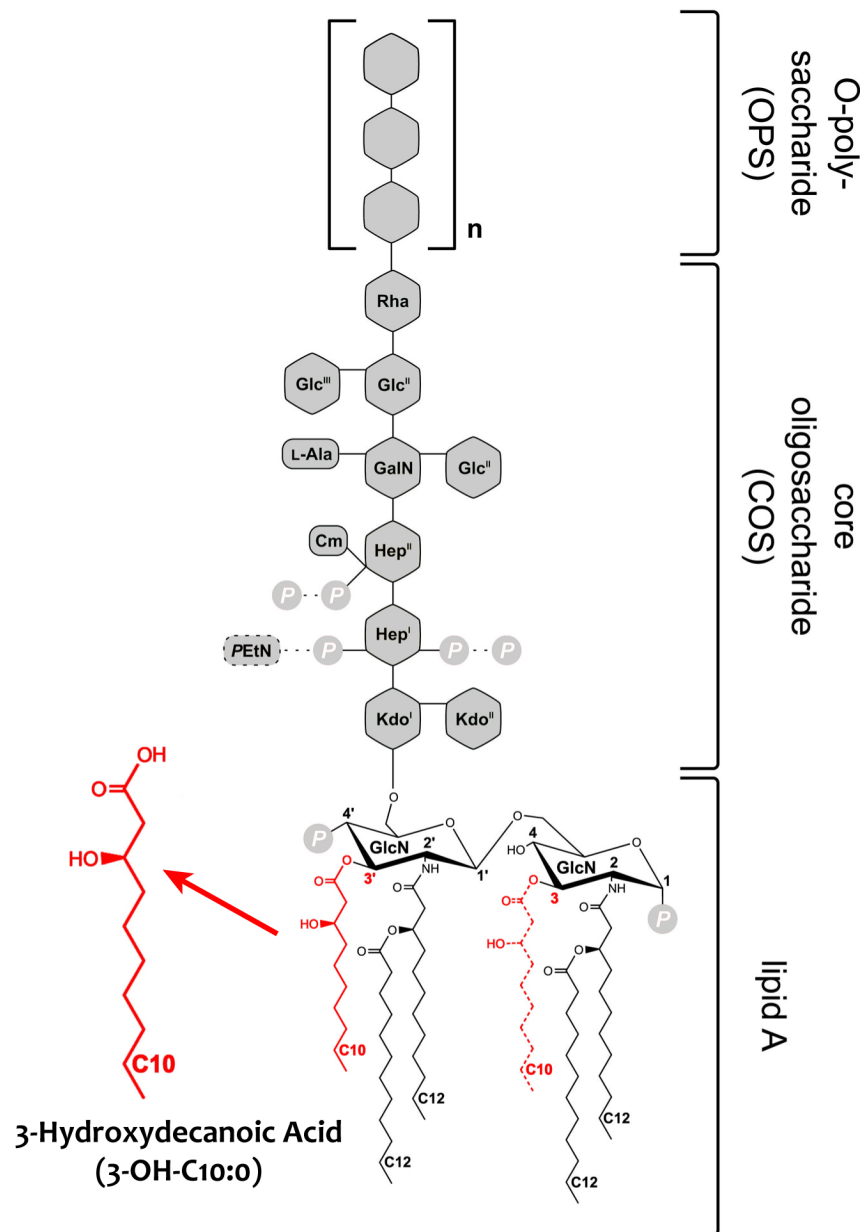


Figure In-11 : Structure de LPS de bactéries Gram négatif (ici *P. aeruginosa*).

Les LPS sont constitués de trois domaines, le Lipide A, lié à la membrane et constitué de quatre à sept chaînes d'acides gras, un core oligosaccharidique (COS) et un O-polysaccharide (OPS) de taille variable. En rouge, les chaînes d'acyle gras mc-3-OH-FAs, qui représentent le motif minimal perçu par le récepteur LORE. Figure adaptée de Kutschera et Ranf (2019).

reposant probablement dans leur capacité à s'insérer dans les membranes lipidiques et à y former des pores (Henry et al., 2011; Ongena and Jacques, 2008).

Chez les plantes, les LPs sont capables de stimuler le système immunitaire pour induire une résistance. Un traitement racinaire avec des fengycines et des surfactines purifiées de *B. subtilis* induisent, chez le haricot et la tomate, une ISR effective contre *B. cinerea* (Cawoy et al., 2014; Ongena et al., 2007). De même, des souches de *B. subtilis* sur-productrices de LPs, montrent un effet protecteur amélioré sur la tomate contre *B. cinerea* (Ongena et al., 2007). D'autres LPs, produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*, comme le massetolide A ou l'orfamide A, induisent une ISR respectivement chez la tomate contre *P. infestans*, et chez le riz contre le champignon nécrotrophe *Cochliobolus miyabeanus* (Ma et al., 2017; Tran et al., 2007).

Certaines familles de LPs sont aussi capables d'induire des événements précoces de l'immunité. C'est le cas de la surfactine qui induit une alcalinisation du milieu extracellulaire et la production de ROS sur des cellules de tabac (Jourdan et al., 2009). De même, la mycosubtiline, un LPs de la famille des iturines, la plipastatine, de la famille des fengycines, et la surfactine activent des marqueurs de l'immunité chez la vigne, le coton et chez *A. thaliana* (Debois et al., 2015; Farace et al., 2015; Han et al., 2015; Li et al., 2019). La surfactine stimule aussi des enzymes impliquées dans la défense comme la PAL et la LOX (lipoxygénase), provoque des modifications de la production de composés phénoliques sur des cellules de tabac (Jourdan et al., 2009) et induit l'expression de gènes de défense sur des cellules de vigne (Farace et al., 2015). Récemment, il a été montré que la souche GLB191 de *B. subtilis*, comme le surnageant issu de cultures de cette bactérie, induit la résistance de la vigne contre le champignon biotrophe *Plasmopara viticola*. Par l'utilisation de souches mutantes de cette bactérie affectées dans la production de la fengycine et/ou de la surfactine, il a été mis en évidence que ces deux LPs contribuent à l'activité de GLB191 contre cet agent pathogène chez la vigne (Li et al., 2019).

Aussi, l'orfamide A déclenche des événements précoces de défense et l'induction de l'expression de gènes de défense, incluant des gènes codant pour une chitinase, pour une β -glucanase, pour la PAL et la LOX (LOX2) sur des cultures cellulaires de riz (Ma et al., 2017).

Cependant à ce jour, les mécanismes de perception des LPs conduisant à l'induction des défenses ne sont pas encore identifiés. En raison de la capacité des LPs à interagir avec des membranes lipidiques, il a été proposé que ces molécules seraient susceptibles d'interagir avec les membranes plasmiques des cellules végétales (Henry et al., 2011). Les LPs s'inséreraient dans la bicouche lipidique, perturberaient alors la membrane, ou induiraient la formation transitoire de pores, pouvant en retour activer une cascade d'événements moléculaires conduisant à la mise en place des réponses de défense (Henry et al., 2011; Jourdan et al., 2009; Schellenberger et al., 2019).

II- Les lipopolysaccharides (LPS)

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des glycolipides complexes qui sont le constituant principal du feuillet externe de la membrane externe de la plupart des bactéries Gram-négatif (Kutschera and Ranf, 2019). Ils sont formés de trois domaines liés par des liaisons covalentes : le Lipide A, lié à la membrane et constitué de quatre à sept acides gras (FAs, *Fatty Acids*), un core oligosaccharidique (COS) et un O-polysaccharide (OPS) (Figure In-11) de taille variable dépassant de la surface cellulaire (Caroff and Karibian, 2003). La partie OPS est assemblée dans le cytoplasme et exportée dans le

périplasme où elle s'associe au complexe Lipide A-COS. L'ensemble est ensuite exporté dans la membrane externe (Rapicavoli et al., 2018). La composition du Lipide A (FAs, acylations, phosphorylations), la composition osidique du COS ou du OPS diffèrent de manière considérable entre espèces bactériennes mais aussi au sein de la même espèce, la membrane externe contenant un mélange de différents variants de LPS (Kutschera and Ranf, 2019).

Formant une barrière protectrice et très restrictive, les LPS sont vitaux pour la résistance de la bactérie à de nombreux stress environnementaux et sont un important facteur de virulence pour la colonisation de l'hôte (Kutschera and Ranf, 2019). En raison d'une capacité de résistance aux stress réduites, des bactéries phytopathogènes dont les LPS sont altérés (dont la partie OPS est manquante), sont généralement moins viables sur et dans leur hôte et sont considérées comme avirulentes. Des souches mutantes des bactéries *Erwinia amylovora*, *R. solanacearum* ou *Xylella fastidiosa* altérées dans la composition de leurs LPS, sont ainsi moins virulentes que des souches sauvages (Berry et al., 2009; Clifford et al., 2013; Li et al., 2014).

Les LPS agissent aussi comme des IP sur de nombreuses espèces végétales. Des LPS induisent la production de ROS et des modifications transcriptomiques chez le riz (Desaki et al., 2006). De même, des complexes OPS-COS isolés de *Burkholderia cepacia* induisent l'expression de gènes de défense chez *A. thaliana* et le COS de LPS issus de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* déclenche des réponses immunitaires chez le tabac et *A. thaliana* (Braun et al., 2005; Madala et al., 2012; Silipo et al., 2005). Cependant, les mécanismes de perception de ces constituants des LPS n'ont pas été identifiés à ce jour. En 2015 Ranf et al. (2015) ont identifié le buld-type lectin S-domain (SD)-1 RLK LORE (*LipoOligosaccharide-specific Reduced Elicitation*) comme étant le récepteur relié à la perception des LPS chez *A. thaliana*. Récemment, il a été démontré que les LPS comme le Lipide A ne sont pas réellement perçus par LORE. LORE est en revanche capable de percevoir les chaînes d'acide gras de longueur moyenne portées par le Lipide A (Kutschera et al., 2019). À ce jour, le mécanisme de perception des LPS est toujours inconnu. Une étude phylogénétique a mis en évidence que le récepteur LORE est restreint à la famille des Brassicacées (Ranf et al., 2015). Les réponses de défense induites par des préparations de LPS chez d'autres familles végétales impliquent donc probablement un mécanisme LORE indépendant (Kutschera and Ranf, 2019). Chez le riz, le récepteur de la chitine CERK1 semble jouer un rôle dans la perception des LPS, ce qui n'est pas le cas chez *A. thaliana* (Desaki et al., 2018). Aussi il a récemment été mis en évidence que les LPS et le Lipide A déclenchent une production biphasique de ROS chez *A. thaliana* et que cette seconde production de ROS est partiellement indépendante de LORE (Shang-Guan et al., 2018).

III- Les Rhamnolipides (RLs)

1) Biosynthèse et activités biologiques des rhamnolipides

Les rhamnolipides (RLs) sont des molécules glycolipidiques produites par un grand nombre de bactéries, notamment des genres *Burkholderia* et *Pseudomonas* (Abdel-Mawgoud et al., 2010) dont *Pseudomonas chlororaphis*, *P. fluorescens* ou encore *P. putida* qui présentent la capacité de stimuler la croissance et les défenses de plantes contre des champignons (Duke et al., 2017; Meziane et al., 2005; Pieterse et al., 2014; Xu et al., 2019). Ces molécules sont composées d'un groupement hydrophile constitué d'une (mono-rhamnolipides, mono-RL) ou deux (di-rhamnolipides, di-RL) molécules de rhamnose, liée(s) par une liaison glucosidique à un groupement hydrophobe constitué

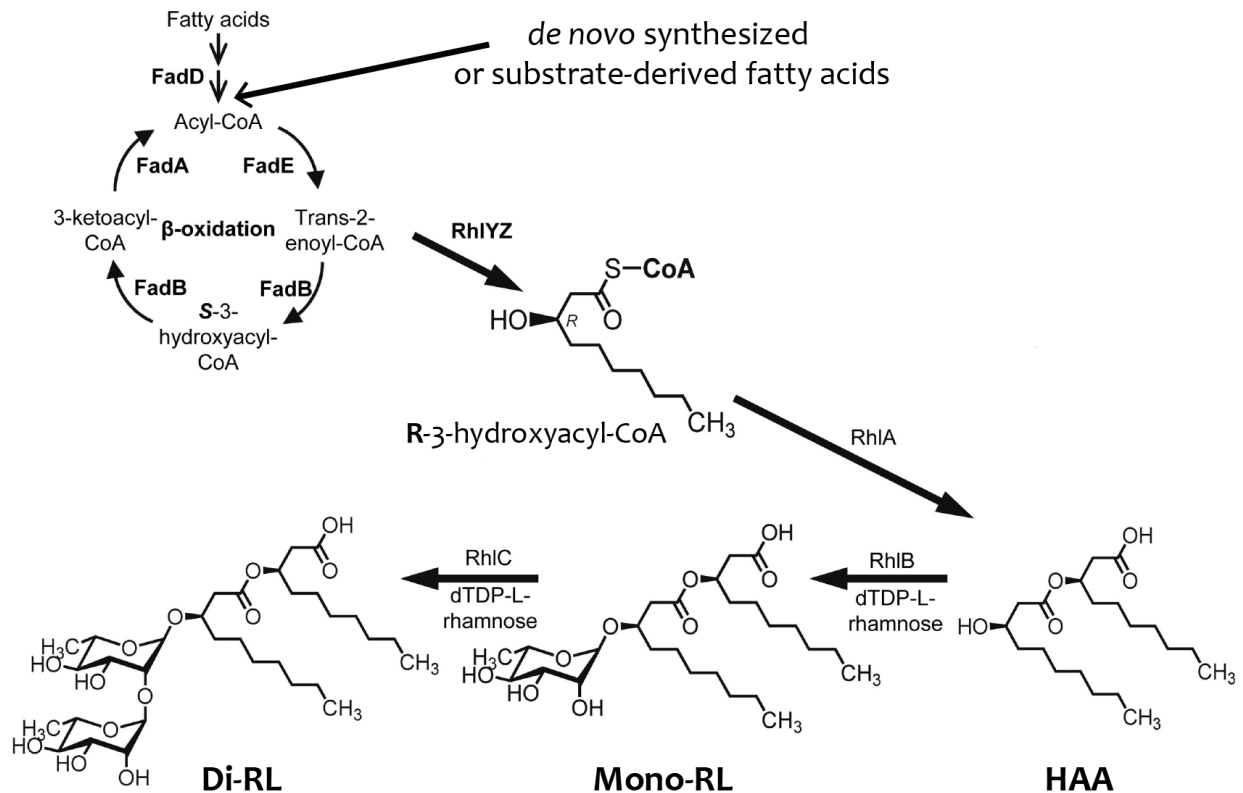


Figure In-12 : Voie de biosynthèse des RLs chez *P. aeruginosa* proposé par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

Des acides gras synthétisés *de novo* ou issus du substrat de culture sont convertis en Trans-2-enoyl-CoA par une voie de β -oxydation. Cet intermédiaire est ensuite transformé en R-3-hydroxyacyl-CoA suite à plusieurs réactions enzymatiques, notamment l'intervention des Enoyl-CoA Hydratases/Isomérases RhIYZ. Le R-3-hydroxyacyl-CoA est le précurseur lipidique direct utilisé par RhIA pour la synthèse des HAAs, qui sont à leur tour transformés par RhIB et RhIC en RLs. FadA, 3-ketoacyl-CoA thiolase, FadB, trans-enoyl-CoA hydratase, FadD, acyl-CoA synthetase; FadE, acyl-CoA, RhIA, HAA synthetase; RhIB, rhamnosyltransferase 1; RhIC, rhamnosyltransferase 2. Figure adaptée de Abdel-Mawgoud *et al.* (2014).

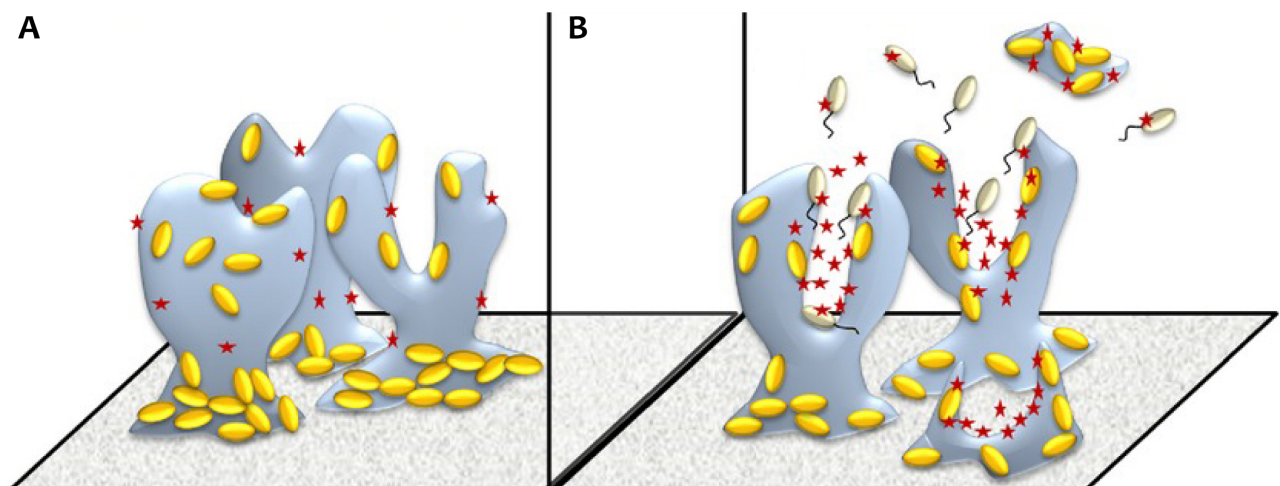


Figure In-13 : Modèle proposé par Nickzad et Déziel (2014) représentant l'implication des rhamnolipides dans les différents stades de développement du biofilm.

A, À faible concentration, les RLs augmentent l'hydrophobicité des membranes bactériennes, augmentant ainsi l'adhérence des bactéries aux surfaces. B, Avec la prolifération des bactéries, les fortes concentrations de RLs empêchent l'adhérence aux surfaces, ce qui provoque la dispersion des cellules, favorisant la colonisation du milieu. Les étoiles rouges représentent les RLs. Figure adaptée de Nickzad et Déziel (2014).

de 1 ou 2 acides gras hydroxylés en position 3 et associés l'un à l'autre par une liaison ester. Les bactéries produisent généralement des mélanges de mono-RLs et de di-RLs, en proportions variables notamment selon l'espèce productrice et la composition du milieu de culture. La diversité des RLs produits est également très importante en raison de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui varie de 8 à 16 carbones (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Par leur nature amphiphile, les RLs ont des propriétés tensioactives, c'est-à-dire qu'ils modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Cette propriété tensioactive explique l'efficacité de composés détergents pour nettoyer des surfaces ; en interagissant d'une part avec une phase apolaire par leur portion hydrophobe et d'autre part avec une phase polaire par leur portion hydrophile, ils permettent la solubilisation de ces deux phases non miscibles.

La synthèse et les fonctions biologiques des RLs ont surtout été étudiés chez la bactérie *P. aeruginosa*. Chez cette bactérie, la biosynthèse des RLs requiert trois étapes séquentielles contrôlées par trois enzymes, RhlA, RhlB et RhlC (Figure In-12). RhlA (codée par le gène *RHLA*) est impliquée dans la production du dimère d'acides gras appelé HAA (Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque) (Déziel et al., 2003). Une voie de synthèse du précurseur lipidique de la synthèse des HAAs a été proposé par Abdel-Mawgoud *et al.* en 2014. Tout d'abord, l'acyl-CoA (acyl-Coenzyme A), dérivé du substrat de culture ou synthétisé *de novo*, entre dans une voie de β -oxydation où il est converti en Trans-2-enoyl-CoA. Ces enoyl-CoA dont la chaîne carbonée varie entre 8 et 12 atomes de carbones (majoritairement 10 carbones) sont alors transformés par des Enoyl-CoA Hydratases/Isomérases (ECH/I), appelées RhlYZ, en R-3-hydroxyacyl-CoA qui sont alors pris en charge par RhlA pour la synthèse des HAAs (Abdel-Mawgoud et al., 2014). RhlB (codée par le gène *RHLB*, présent sur le même opéron que *RHLA*) est quant à elle une rhamnosyltransférase liée à la membrane plasmique. Cette enzyme utilise du dTDP-L-rhamnose et le HAA comme substrats pour produire du mono-RL. Enfin, la dernière enzyme, RhlC (codée par le gène *RHLC*, localisé ailleurs sur le génôme), est aussi une rhamnosyltransférase qui utilise le mono-RL et le dTDP-L-rhamnose comme substrats pour produire du di-RL (Déziel et al., 2003). *P. aeruginosa* produit ainsi un mélange de mono-RLs et de di-RLs. La régulation de la production des RLs chez cette bactérie est régulée par des phénomènes de Quorum Sensing (Abdel-Mawgoud et al., 2014; Déziel et al., 2003; Soberón-Chávez et al., 2005).

Le rôle exact de ces molécules n'est pas encore complètement connu. Elles sont néanmoins impliquées dans l'exploitation de substrats hydrophobes, la formation de biofilms et la motilité bactérienne (Abdel-Mawgoud et al., 2010). À faible concentration, les RLs augmentent l'hydrophobicité des membranes bactériennes en provoquant la libération de lipopolysaccharides de la membrane externe (Abdel-Mawgoud et al., 2010). En augmentant l'hydrophobicité de la membrane et par leurs propriétés émulsifiantes, les RLs facilitent ainsi l'accès aux substrats hydrophobes comme les hydrocarbures. Aussi, cet accroissement de l'hydrophobicité membranaire augmente l'adhérence des bactéries aux surfaces. Une fois fixées, les bactéries se multiplient ce qui conduit à la formation du biofilm. Avec l'augmentation de la population bactérienne, la concentration en RLs dans le milieu augmente, ce qui empêche l'adhérence des bactéries aux surfaces. Grâce à leur flagelle, ces bactéries vont ainsi pouvoir se disperser dans le milieu (Figure In-13) (Nickzad and Déziel, 2014). Outre les RLs, *P. aeruginosa* sécrète aussi dans le milieu les précurseurs de synthèse HAA. Tremblay *et al.* (2007) ont montré que les HAAs ont un effet répulsif sur les bactéries alors que les di-RLs, qui diffusent plus rapidement dans le milieu que les HAAs en raison de leur plus grande solubilité dans l'eau, ont un

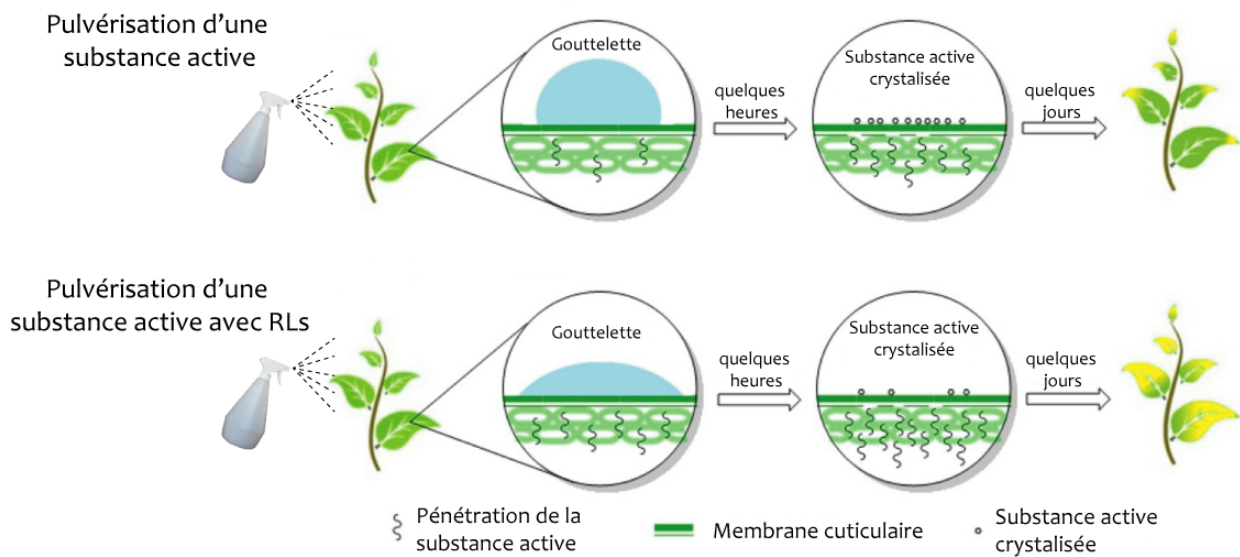


Figure In-14 : **Les RLs augmentent l'efficacité de traitements phytosanitaires.**

Grâce à leur fort pouvoir mouillant, l'ajout de RLs à la formulation de produits phytosanitaires augmente l'adhésion des substances actives aux surfaces cuticulaires ce qui améliore la dispersion et donc l'efficacité de ces traitements. Figure adaptée de Liu *et al.* (2016).

effet attractif. Ces molécules exercent des forces d'attraction/répulsion sur les bactéries qui conduisent à l'extension de la colonie bactérienne (Tremblay et al., 2007).

Les RL possèdent également des propriétés antimicrobiennes. Ils sont actifs contre une large diversité de bactéries, aussi bien à Gram-négatif qu'à Gram-positif, ainsi que contre des champignons et notamment des champignons phytopathogènes comme *B. cinerea* et *Rhizoctonia solanii* (Vatsa et al., 2010). Ils montrent aussi une activité zoosporicide, en provoquant probablement la lyse des zoospores de plusieurs oomycètes dont des espèces des genres *Pythium* et *Phytophthora* (Vatsa et al., 2010).

2) Utilisations des RLs

Les composés surfactants sont très largement utilisés en industrie pour leurs propriétés détergentes, moussantes, émulsifiantes... Les molécules biosurfactantes, d'origine biologique, comme les RLs, représentent une alternative particulièrement intéressante à l'utilisation de surfactants de synthèse. Les RLs sont en effet moins toxiques et sont relativement plus stables sous des conditions de température et de pH extrêmes (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Johann et al., 2016). Ils peuvent aussi être produits par des microorganismes cultivés sur des substrats d'origines renouvelables, comme des résidus d'extraction d'huile d'olive (considérés comme une très bonne source de carbone pour la production de RLs par *P. aeruginosa*) et surtout ils sont biodégradables (Abdel-Mawgoud et al., 2010; J. Wen et al., 2009; Zeng et al., 2007).

Les RLs sont ainsi utilisés en bioremédiation pour la décontamination de sols pollués. Ils sont impliqués dans la biodégradation d'hydrocarbures ; en augmentant la solubilité de composés hydrophobes comme des hydrocarbures, les RL facilitent l'exploitation de ces composés polluants comme substrats pour des bactéries (Lai et al., 2009; Noordman and Janssen, 2002). Aussi, les RLs sont utilisés pour la décontamination de sols pollués aux métaux lourds. Par exemple, un traitement de sols contaminés au Cadmium (Cd) et au Nickel (Ni) avec une solution de RLs, retire jusqu'à 61% du Cd et jusqu'à 51% du Ni alors que le lavage de ces sols avec de l'eau n'en retire que 18% (Mulligan and Wang, 2006). Dans l'industrie agroalimentaire, les RLs sont utilisés pour maîtriser la stabilité, la texture et la conservation des pâtes de produits de boulangerie (Rikalović et al., 2015). Comme source de rhamnose, les RLs sont aussi utilisés comme précurseurs pour la production d'arômes, comme le furanéol, un arôme aux tonalités de fraise (Rikalović et al., 2015). Grâce à leurs propriétés détergentes, mouillantes, émulsifiantes... ainsi que leur faible toxicité et leur biodégradabilité, les RL entrent dans la composition de nombreux produits cosmétiques (shampoings, déodorants...). L'industrie pharmaceutique exploite aussi les RL notamment pour leurs propriétés antimicrobiennes (Irfan-Maqsood and Seddiq-Shams, 2014; Rikalović et al., 2015).

Plusieurs utilisations des RLs ont également été décrites en agronomie. En effet, leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, zoosporicides en font des molécules intéressantes en biocontrôle de certaines phytopathologies. Aussi, par leur fort pouvoir mouillant, les RLs peuvent rentrer dans la formulation de traitements phytosanitaires en favorisant l'adhésion de ces traitements à la surface hydrophobe des feuilles, ce qui augmente l'efficacité des substances actives (Figure In-14) (Liu et al., 2016). Enfin, il a été montré que les RL stimulent les défenses de plantes (Monnier et al., 2018; Sanchez et al., 2012; Varnier et al., 2009).

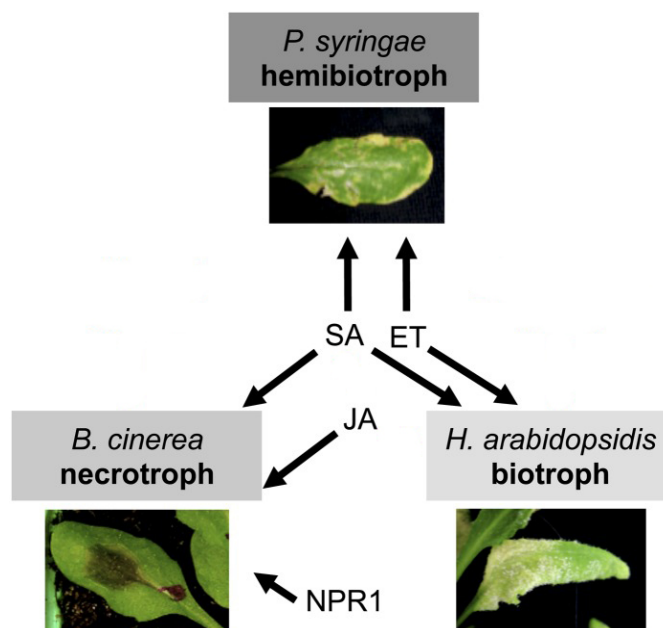


Figure In-15 : **Modèle représentant les voies hormonales induites par les RLs impliquées dans la résistance d'*A. thaliana* contre des agents pathogènes biotrophes, hémibiotrophes et nécrotrophes.**

Contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000 et contre l'oomycète biotrophe *H. arabidopsidis*, les RLs activent les voies hormonales du SA et de l'ET. En revanche, la résistance induite par les RLs contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea* implique les voies de signalisation du SA et du JA ainsi que le régulateur clé de la réponse au SA, NPR1. Figure adaptée de Sanchez *et al.* (2012).

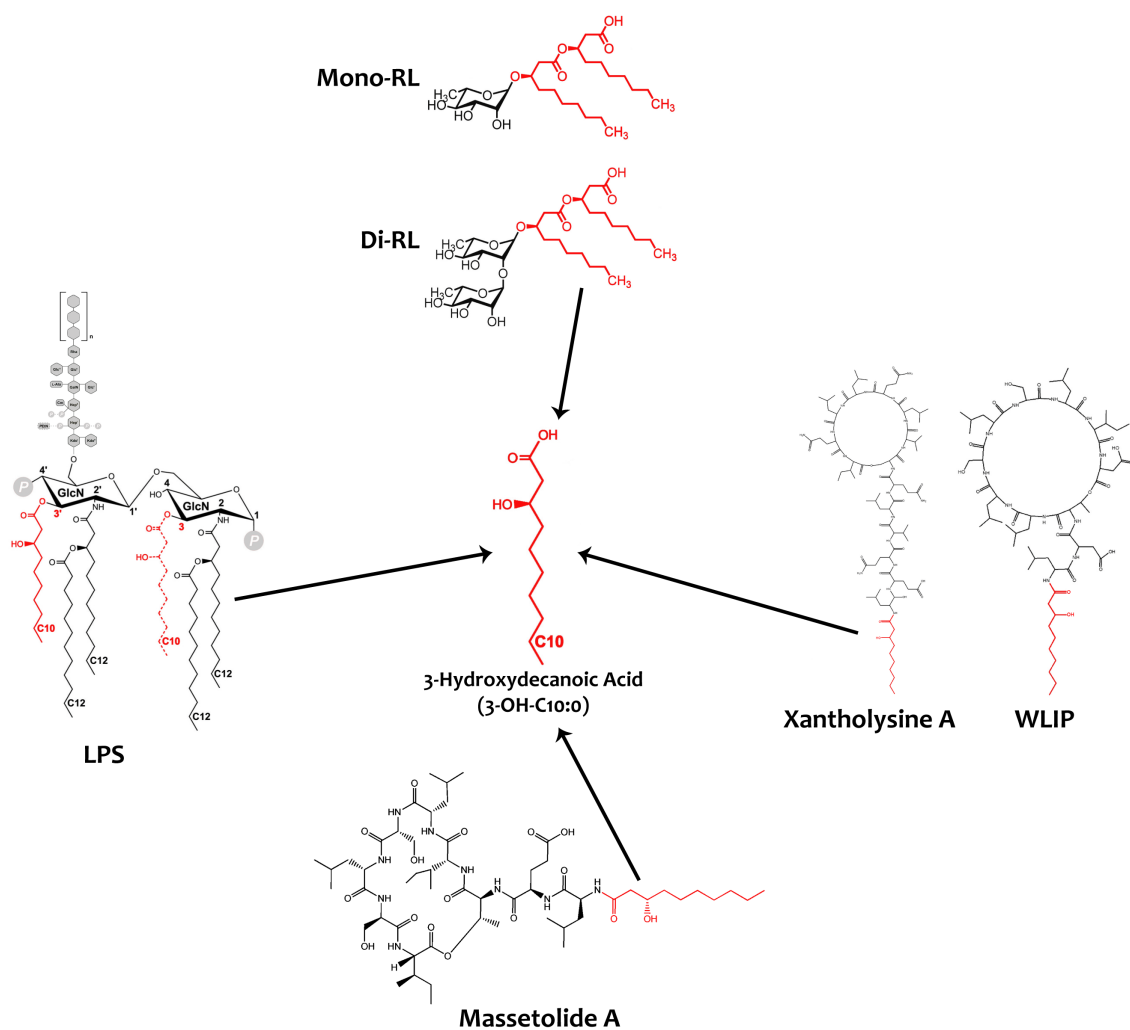


Figure In-16 : **L'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0), une brique commune aux LPS, LPs et RLs.**

3) Les RLs induisent l'immunité végétale

Varnier *et al.* (2009) ont démontré que des RLs de *P. aeruginosa* sont perçus par la vigne. Ces RLs induisent des marqueurs classiques de l'immunité végétale incluant influx calcique, production de ROS, activation de MAPK et l'induction de l'expression de gènes de défense sur des cellules de vigne. Les RLs stimulent aussi la défense de vitro-plants de vigne contre *B. cinerea* (Varnier *et al.*, 2009). Sur *A. thaliana*, un sécrétome de *P. aeruginosa* enrichi en RLs (RLsec) induit également une réponse immunitaire caractérisée par l'induction de l'expression de gènes de défense, notamment *PR-1*, *PR-4* et *PDF1.2*, et l'accumulation de phytohormones (SA et JA) dans les feuilles (Sanchez *et al.*, 2012). Cette réponse immunitaire participe à la protection locale de la plante observée contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000, l'oomycète biotrophe *H. arabidopsidis* et contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*. En utilisant des mutants d'*A. thaliana* affectés dans les voies de signalisation hormonales du SA, du JA et de l'ET, l'implication de ces différentes hormones dans la réponse immunitaire aux RLs a été mise en évidence (Figure In-15) (Sanchez *et al.*, 2012). Le SA apparaît ainsi comme étant essentiel pour l'induction de la résistance contre les trois agents pathogènes précédemment cités, tandis que l'ET est impliqué dans la résistance contre *Pst* DC3000, et contre *H. arabidopsidis*, et le JA participe à la protection contre *B. cinerea*. Plus récemment, il a été montré que les RLs induisent également une protection contre *B. cinerea* associée à l'induction de réponses de défense (production de ROS, expression de gènes de défense, dépôts de callose) chez une plante d'intérêt agronomique, le colza (*Brassica napus*) (Monnier *et al.*, 2018).

IV- Les acides gras à chaînes moyennes (mc-3-OH-FAs), une brique commune aux LPs, LPS et RLs

En recherchant le motif minimal nécessaire à la perception du Lipide A par le récepteur LORE, Kutschera *et al.* (2019) ont montré que seules les préparations de LPS contenant une chaîne d'acyle gras (groupe hydroxyle en position 3) de longueur moyenne, en position C-3 et C-3' du Lipide A (Figure In-11) sont actives sur *A. thaliana* alors que les préparations contenant des chaînes plus longues à ces positions sont inactives (Kutschera *et al.*, 2019). L'utilisation d'acides gras (3-OH-FAs) synthétiques dont la longueur de la chaîne carbonée varie de 8 à 16 atomes de carbone a permis de mettre en évidence que les acides gras à chaînes moyennes (mc-3-OH-FAs), portant 8 à 12 atomes de carbone, activent l'immunité LORE-dépendante (influx calcique, production extracellulaire de ROS, expression de gènes de défense et activation des MAPK) alors que ce n'est pas le cas des acides gras à longue chaîne carbonée (13 à 16 atomes de carbone) (Kutschera *et al.*, 2019). Parmi ces mc-3-OH-FAs, l'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0), doté d'une chaîne carbonée de 10 atomes de carbone, induit l'immunité LORE-dépendante la plus forte, et se lie physiquement au récepteur LORE (Kutschera *et al.*, 2019). Les mc-3-OH-FAs sont ainsi le motif minimal perçus par le récepteur LORE et induisant des réponses de défense chez les Brassicacées.

Comme les LPS, d'autres molécules amphiphiles contiennent dans leur partie lipidique des portions 3-OH-acyle gras (Figure In-16). Certains LPs cycliques comme la surfactine ou la fengycine possèdent une portion acide gras β -hydroxylé dont la longueur de la chaîne carbonée varie respectivement de 12 à 16 ou de 14 à 18 atomes de carbone (Ongena and Jacques, 2008). Le massetolide A, l'entolysine A, la lokisine, le WLIP et la xantholysine A sont d'autres LPs cycliques qui



possèdent dans leur partie lipidique un mc-3-OH-FA à 10 atomes de carbone (Omoboye et al., 2019; Oni et al., 2019; Tran et al., 2007). Enfin, la partie lipidique des RLs est un dimère de 3-OH-FA dont la longueur des chaînes carbonées varie de 6 à 16 atomes de carbone. Les RLs extraits de *P. aeruginosa* possèdent majoritairement des chaînes d'acides gras à 10 atomes de carbone (Abdel-Mawgoud et al., 2014). Kutschera *et al.* (2019) ont montré que des mc-3-OH-FAs libres sont généralement copurifiés lors des processus d'extractions de ces molécules. Les RLs comprenant des chaînes d'acides gras à 10 atomes de carbone, induisent ainsi une réponse immunitaire LORE-dépendante chez *A. thaliana* qui est perdue lorsque ces échantillons de RLs sont repurifiés pour éliminer les traces de mc-3-OH-FAs qu'ils contiennent. Le récepteur LORE semble ainsi ne percevoir que les mc-3-OH-FAs sous leur forme libre mais pas les composés contenant ces molécules (Kutschera et al., 2019).

L'analyse du RLsec utilisé par Varnier *et al.* (2009) et Sanchez *et al.* (2012) a mis en évidence la présence de plusieurs molécules dont des mono-RL et des di-RL mais aussi des HAAs et des mc-3-OH-FAs avec une majorité de 3-OH-C10:0. En utilisant les différents constituants purifiés du RLsec, nous avons montré au laboratoire que les HAAs et les RLs sont perçus par des mécanismes indépendants et induisent des réponses de défense différentes (Figure In-17). Les HAAs sont perçus par le récepteur LORE mais ce n'est pas le cas des RLs (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation; Kutschera et al., 2019). Cette perception est associée chez *A. thaliana* à l'induction d'événements précoces de l'immunité tels que l'influx calcique, la production de ROS et l'activation des MAPK3 et MAPK6. Elle se traduit par une protection locale de la plante contre *Pst* DC3000 (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation).

Les RLs ne sont quant à eux pas perçus par LORE (Kutschera et al., 2019). Ils induisent en revanche chez *A. thaliana* des réponses de défense atypiques (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation). Une production tardive de ROS et l'induction d'une résistance locale contre *Pst* DC3000 et contre *B. cinerea* est ainsi observée suite à un traitement foliaire avec des RLs purifiés (Rha-C10:10 et Rha-Rha-C10:10). Ces RLs purifiés sont en revanche incapables de déclencher l'influx calcique, la production précoce de ROS ou l'activation des MAPK. Enfin, les réponses de défense observées sont LORE-indépendantes. La glycosylation des HAA avec un ou deux rhamnosés supprime la capacité du récepteur LORE à percevoir ces molécules qui restent néanmoins perceptibles par *A. thaliana* via un mécanisme encore inconnu (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation).

Les mc-3-OH-FAs et les HAAs sont perçus par LORE. Mais les molécules amphiphiles contenant ces structures dans leur portion lipidiques ne sont pas perçues par ce récepteur. Leur nature amphiphile les rend en revanche susceptibles de s'insérer ou d'interagir avec les membranes lipidiques. Actuellement des preuves s'accumulent d'une interaction directe des RLs avec les lipides de la membrane plasmique des cellules végétales conduisant à une activation de réponses immunitaires. Une étude biophysique a ainsi mis en évidence que des RLs de synthèse, appelés *Synthetic Rhamnolipid Bolaforms* (SRBs), composés de deux molécules de rhamnose séparées par une chaîne d'acide gras, ont la capacité d'interagir avec les lipides de membranes plasmiques biomimétique de plantes, suggérant une potentielle induction de l'immunité via une déstabilisation de la membrane plasmique (Luzuriaga-Loaiza et al., 2018). De même Monnier *et al.* (2019) ont récemment montré que des RLs naturels s'insèrent dans des membranes lipidiques modèles. Cette insertion des RLs dans la bicouche lipidique de membranes biomimétiques de plantes n'affecte que peu la dynamique lipidique. Les changements subtils de la dynamique lipidique liés à l'insertion membranaire des RLs peuvent ainsi être liés à l'induction des défenses immunitaires (Monnier et al., 2019).

Objectifs de la thèse



Comme mentionné précédemment, des études réalisées au laboratoire ont montré qu'un sécrétome enrichi en RLs (RLsec) de *P. aeruginosa* induit des réponses de défenses chez la vigne et chez *A. thaliana* (Sanchez et al., 2012; Varnier et al., 2009). Ce mélange montre un intéressant potentiel de stimulation des défenses des plantes, efficace sur plusieurs espèces (incluant des plantes d'intérêt agronomique) et contre des agents pathogènes à régimes trophiques différents (Monnier et al., 2018; Sanchez et al., 2012; Varnier et al., 2009).

Récemment, il a été mis en évidence que des précurseurs de RLs, le 3-OH-C10:0 et le HAA-C10:10 qui est un dimère de 3-OH-C10:0, induisent l'immunité chez *A. thaliana* suite à leur perception *via* le récepteur membranaire LORE (Kutschera et al., 2019 ; Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation). Par ailleurs, l'application locale foliaire de 3-OH-C10:0 induit, chez *A. thaliana*, une résistance systémique contre *Pst* DC3000 (Kutschera et al., 2019). Les RLs eux-mêmes induisent également des réponses immunitaires chez cette plante mais, n'étant pas perçus par LORE, font intervenir un mécanisme différent encore non identifié (Figure In-17) (Kutschera et al., 2019 ; Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation).

Ces travaux, menés au niveau foliaire, n'apportent cependant pas d'information sur la perception éventuelle de ces composés par les racines d'*A. thaliana*. Les RLs, comme d'autres molécules amphiphiles, sont en effet produits naturellement par des bactéries, dont certaines espèces d'origine tellurique sont utilisées comme agents de biocontrôle (comme *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* ou *B. subtilis*) notamment pour leur capacité à induire une ISR sur leurs plantes hôtes (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Prabakaran et al., 2015). Certaines de ces molécules sécrétées, comme des LPs, sont capables d'induire une ISR sur des plantes comme *A. thaliana*, le riz ou la tomate lorsqu'elles sont appliquées au niveau racinaire (Omoboye et al., 2019; Ongena et al., 2007). En revanche, nous ne savons pas si les RLs sont perçus par les racines et si ces molécules sont impliquées dans la mise en place de l'ISR.

Dans ce contexte, mon projet de thèse visait d'abord à déterminer si le 3-OH-C10:0, le motif moléculaire minimal constituant la partie lipidique des RLs et qui est commun à de nombreux IPs amphiphiles (comme les LPs WLIP ou lokisine), est perçu par les racines d'*A. thaliana*. Dans un premier temps, la caractérisation de la perception du 3-OH-C10:0 par la racine a été entreprise chez *A. thaliana*. Les réponses précoces et tardives induites par cette perception ont été suivies en essayant notamment d'identifier des gènes impliqués dans cette réponse. Dans un second temps, la capacité de cette molécule à induire une ISR sur *A. thaliana* contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea* a été évaluée tout en caractérisant les voies de signalisation hormonales potentiellement impliquées dans l'induction de cette ISR. En parallèle, la perception et la fonction des RLs ont également été caractérisées au niveau racinaire, mettant ainsi en évidence des similitudes mais également des différences de réponses au niveau racinaire entre les RLs et leur motif lipidique, le 3-OH-C10:0.

Les résultats obtenus lors de ma thèse sont présentés ici sous la forme de deux chapitres.

- Chapitre 1 : Caractérisation de la réponse racinaire à l'acide 3-hydroxydécanoïque chez *A. thaliana* et mise en évidence de l'induction d'une ISR contre *B. cinerea*.
- Chapitre 2 : Perception racinaire des rhamnolipides et induction d'une ISR

Chapitre 1 : Caractérisation de la réponse racinaire à l'acide 3-hydroxydécanoïque chez *A. thaliana* et mise en évidence de l'induction d'une ISR contre *B. cinerea*



Contexte

Les plantes sont intensément exposées au niveau racinaire à des microorganismes telluriques. Certains de ces microorganismes sont pathogènes tandis que d'autres, au contraire, sont bénéfiques et peuvent stimuler les défenses des plantes au travers d'une réaction d'ISR. Comme les microorganismes pathogènes, les microorganismes bénéfiques possèdent des IPs susceptibles d'être perçus par les racines comme ils le sont au niveau des feuilles. La flagelline est ainsi perçue par la racine d'*A. thaliana* où des événements de signalisation liés à l'immunité (phosphorylation des MAPK, dépôts de callose, expression de gènes) sont activés en réponse à ce peptide (Millet et al., 2010; Wyrsh et al., 2015). De même, la surfactine active la production de ROS sur les racines de tabac et de tomate (Henry et al., 2011). Cette perception racinaire d'IPs participe potentiellement à l'induction de l'ISR. Il a ainsi été montré que des IPs extraits d'une bactérie PGPR, incluant notamment le flagelle et des LPS, sont capables d'induire une ISR sur *A. thaliana* contre *Pst* DC3000 (Meziane et al., 2005). Aussi, la surfactine induit une ISR chez la tomate et le haricot contre *B. cinerea* (Ongena et al., 2007).

Les RLs sont des molécules amphiphiles notamment produites par des bactéries connues pour leur capacité à stimuler les défenses de plantes par des réactions d'ISR. Elles possèdent dans leur portion lipidique des mc-3-OH-FAs et en particulier le 3-OH-C10:0 dans le cas des RLs produits par *P. aeruginosa*. Ce motif moléculaire minimal est perçu au niveau foliaire chez *A. thaliana* par le récepteur LORE, induit des réactions de défense et stimule une résistance systémique foliaire de la plante contre *Pst* DC3000 (Kutschera et al., 2019). En revanche aucune information n'est disponible quant à une éventuelle perception racinaire de ces molécules chez *A. thaliana*.

Dans ce contexte nous nous sommes donc intéressés à caractériser la réponse racinaire au 3-OH-C10:0. Aussi, la capacité de cette molécule à induire une ISR contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea* a été étudiée.

Publication

Title: 3-Hydroxydecanoic acid triggers Arabidopsis root innate immunity and Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea*

Authors: Matthieu Touchard⁺¹, Marion Cordier¹, Romain Schellenberger¹, Sylvain Legay², Gea Guerriero², Christophe Clément¹, Fabienne Baillieul¹, Jérôme Crouzet¹, Sylvain Cordelier¹ and Stéphan Dorey^{*1}

Affiliation: ¹RIBP EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100, France; ²Plant Biotechnologies Group-Environmental Research and Innovation Department (ERIN), Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), L-4422 Belvaux, Luxembourg

[*stephan.dorey@univ-reims.fr](mailto:stephan.dorey@univ-reims.fr)

Keywords: Arabidopsis thaliana, rhamnolipid, elicitor, immunity, ISR, Botrytis

Introduction

In their environment, plants are frequently challenged by pathogenic microorganisms on either aerial or root systems. Under the ground, the roots are subjected to an impressive number of microbial interactions which may have either detrimental or beneficial effects on the plant. Beneficial telluric microorganisms can improve plant growth by stimulating changes in root architecture to enhance water and nutrient uptake (Kim and Anderson, 2018). Colonization of roots by such microorganisms may also stimulate the plant immune system leading to an Induced Systemic Resistance (ISR) effective against a broad spectrum of pathogens (Pieterse et al., 2014). ISR is reflected by a state of primed defences, in which the plant is not expressing costly defences until pathogen or insect attack. Nevertheless, the plant display accelerated and more efficient defence responses upon pathogen infection. Identification number of beneficial organisms is increasing and includes mycorrhizal fungi, plant growth-promoting fungi (PGPF) and rhizobacteria (PGPR). The ability of these microorganisms to stimulate growth and immunity without disturbing plant growth due to activation of costly defences, make them interesting targets in development of biocontrol agents (Pieterse et al., 2014).

Similarly to phytopathogens, PGPF and PGPR generates molecular signatures perceived by plants as invasion signal, called Invasion Patterns (IPs) including Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) (Cook et al., 2015). These MAMPs are sensed as nonself by plant plasma membrane receptor kinases (RKs) or receptor-like proteins (RLPs) that function as pattern recognition receptors (PRRs). Recognition of MAMPs by PRRs lead to activation of an immune response called MAMP-triggered immunity (MTI) (Boutrot and Zipfel, 2017). Purified MAMPs, as flagellin, the main component of the bacterial flagella, induce early cellular immune responses of MTI such as production of extracellular reactive oxygen species (ROS) and activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Boller and Felix, 2009). Biosynthesis and mobilization of plant hormones, including salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) regulate transcriptional reprogramming of plant defence-related gene, leading to production of phytoalexins, callose deposition and antimicrobial defence compounds. Ultimately, these immune responses modulate plant-induced resistance to biotrophic and necrotrophic pathogens (Boller and Felix, 2009).

Rhamnolipids (RLs) and lipopolysaccharides (LPS) are amphiphilic IPs produced by many bacterial species able to stimulate the plant immune system. Rhamnolipids (RLs) are extracellular metabolites produced by several bacteria, especially *Pseudomonas* and *Burkholderia* species, including some telluric bacteria known as biocontrol agents (Abdel-Mawgoud et al., 2010). These amphiphilic molecules are constituted of HAA (3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid) of various

length, as hydrophobic moiety, bond to a hydrophilic part composed of one (mono-RL) or two (di-RL) rhamnoses (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Due to their amphiphilic properties, RLs act as surface-active compounds allowing bacterial surface motility and biofilm development. RLs induce defence responses in leaves and resistance to biotrophic and necrotrophic pathogens (Sanchez et al., 2012; Varnier et al., 2009). Lipopolysaccharides (LPS) are complex glycolipids that are the major component of the external outermost leaflet of most Gram-negative bacteria (Kutschera and Ranf, 2019). They are formed of three domains linked by covalent bonds: lipid A, bound to the membrane and consisting of four to seven fatty acids (FAs, Fatty Acids), an oligosaccharide core (COS) and an O-polysaccharide (OPS) of varying size protruding from the cell surface (Caroff and Karibian, 2003). The composition of Lipid A (FAs, acylations, phosphorylations), the sugar composition of COS or OPS differ significantly between bacterial species but also within the same species, the outer membrane containing a mixture of different LPS variants (Kutschera and Ranf, 2019). As a protective and very restrictive barrier, LPS is vital for the bacterium's resistance to many environmental stresses and is an important virulence factor for host colonization (Kutschera and Ranf, 2019). Interestingly, 3-hydroxyfatty acids are building blocks of both RLs- and LPS-lipidic moieties. Kutschera et al. recently showed that medium-chain 3-hydroxyfatty acids (mc-3-OH-FAs) bearing 8 to 12 carbon atoms, and more particularly the 3-hydroxydecanoic acid (3-OH-C10:0), are perceived by *A. thaliana* via the bulb-type lectin RK LORE (LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION) (Kutschera et al., 2019). Perception of mc-3-OH-FA by LORE leads to foliar activation of MTI markers, including calcium influx, apoplastic ROS production and MAPK activation, and triggers systemic foliar resistance of the plant against the hemibiotrophic bacteria *Pseudomonas syringae* (Kutschera et al., 2019).

Because of their intense exposure to telluric microorganisms, pathogenic or not, it was long assumed that roots may not respond directly to MAMPs. In 2005, Meziane et al. have shown that treatment of *Arabidopsis thaliana* roots with purified flagellin or LPS from PGPRs trigger ISR against *Pseudomonas syringae* (Meziane et al., 2005). More recently, several studies have shown that roots are responsive to numerous MAMPs, as Flg22, a 22-amino acid synthetic peptide corresponding to a highly conserved epitope of the *Pseudomonas aeruginosa* flagellin protein, peptidoglycans (PGNs), components of the bacterial cell wall, as well as chitin, major component of the fungal and oomycete cell wall (Millet et al., 2010). Moreover, the treatment of Flg22 on *A. thaliana* roots induces an extracellular ROS accumulation, the MAPK activation and callose deposition on the root epidermis (Millet et al., 2010; Wyrsh et al., 2015). Flg22 also stimulates the expression of the cytochrome P450 AtCYP71A12 gene involved in the synthesis of camalexin and of the transcription factor AtMYB51 gene involved in the regulation of indole-glucosinolate biosynthesis (Millet et al., 2010). Similarly, *A.*

thaliana roots were shown to be responsive to the DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) AtPep1, endogenous IP generated upon plant tissues damages. The AtPep1 root perception triggers an extracellular ROS production, MAPK activation and expression of defence-related genes (Poncini et al., 2017). However, triggering immune responses in roots by IPs could lead to detrimental effects on plant growth and in particular on the root development (Poncini et al., 2017).

In the present study, the perception of the minimal lipid motif 3-OH-C10:0 of RLs and LPS was investigated in the *A. thaliana* roots. Since Flg22 perception by *A. thaliana* roots have already been reported, this peptide was used as positive control. Our main results demonstrate that the 3-OH-C10:0 is perceived by *A. thaliana* roots in a LORE-dependent manner, triggering MTI responses and transcriptional changes leading to an ISR against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*.

Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Col-0 plants were used as wild-type (WT) for all experiments. The mutant *lore-5* (provided by S. Ranf, Technical University of Munich, Freising, Germany), *npr1-1* (Cao et al., 1994), *jar1-1* (Staswick et al., 2002), *sid2-2* (Wildermuth et al., 2001) and *pad3* (Ferrari et al., 2003) are all in the Col-0 background.

For disease resistance assays and for experiments involving root RNA extraction, *A. thaliana* plants were grown in hydroponic condition using Araponics (Belgium) system. Briefly, surface-sterilized seeds were sown on Araponics seed-holders filled with 0.6% agar. Hydroponic solution was prepared with Flora Series (GHE, France) fertilizers solutions (FloraBloom, FloraMicro and FloraGro; 0.5 mL.L⁻¹ each) and renewed weekly. Plants were grown in a growth chamber under white fluorescent light (60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), with 12h/12h day/night at a constant temperature of 20°C and air relative humidity of 60%.

For ROS measurement, MAP kinase phosphorylation detection and callose deposition assays, seeds were surface-sterilized and germinated on plates containing half-strength Murashige and Skoog (MS) basal medium with vitamins (Duchefa, The Netherlands) supplemented with 0.5% Sucrose, 0.05% 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and 0.8% phytoagar for 5 days in a plant growth chamber under white fluorescent light (60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), with 12h/12h day/night at a constant temperature of 20°C and air relative humidity of 60%. Seedlings were then transferred to 24-well plates containing 1 mL of half-strength MS medium (one seedling per well) and further grown in the same condition for 10 days.

For root growth inhibition assays, seeds were surface-sterilized and grown vertically in square Petri dishes on half-strength Murashige and Skoog (MS) basal medium with vitamins (Duchefa, The Netherlands) containing 0.5% Sucrose, 0.05% MES and 0.8% phytoagar supplemented with indicated concentration of tested chemicals. Plants were cultivated for 12 days in a plant growth chamber under similar conditions to those previously described.

Chemicals

The 3-hydroxydecanoic acid (3-OH-C10:0) compound was purchased from Larodan (Sweden) and the flagellin-derived Flg22 peptide was obtained from Proteogenix (France). To prepare stock solutions at 100 mM, 3-OH-C10:0 was dissolved in ethanol 100% and Flg22 dissolved in distilled water. Further dilutions were made with pure water to reach final concentration. Control solutions contained equal amounts of ethanol, not exceeding 0.5% for the highest tested concentrations.

***Botrytis cinerea* culture and disease resistance assays**

Botrytis cinerea strain B05.10, provided by BIOGER Research Unit (AgroParisTech, France) was grown on solid medium Potato Dextrose Agar (Difco Laboratories, USA) at 20°C with 24h daylight. For the inoculum preparation, conidia of *B. cinerea* were collected from 20-day-old culture plates by scratching the Petri dishes surface with sterile potato dextrose broth (Difco Laboratories, USA) at 6 g.L⁻¹ and filtered to remove hyphae. Conidial concentrations were measured and the final density was adjusted to 1.10⁵ conidia.mL⁻¹.

For disease resistance assays, 4-week-old *A. thaliana* plants grown in hydroponic conditions were transferred in 10 mL vials containing hydroponic solution and placed in growth chamber under the same conditions for 2 days. Plants were then treated by adding chemicals or adequate controls to the hydroponic solution at indicated final concentration. Two days after treatment, plants were inoculated by deposition of 10 µL drops of the *B. cinerea* conidial suspension at 1.10⁵ conidia.mL⁻¹ on each of the oldest eight leaves. Plants were kept in condition of high humidity with halved luminosity. Symptoms were observed 3 days after infection and quantified by measuring necrosis area with the Fiji software (<https://fiji.sc/>).

Measurement of ROS production

ROS assays were performed on 15-day-old *A. thaliana* seedlings grown in MS medium. Briefly, root system of 1 plant was placed into each well of a 96-well plate (Perkin-Helmer, USA) in 150 µL of distilled water and kept in the dark overnight at 20°C. Then, the procedure was conducted as

described in Smith and Heese (2014). Relative Light Unit (RLU) was measured every 2 minutes over 1 hour with a Tecan Infinite F200 PRO (Switzerland). Amount of ROS was determined by summing RLU detected between 4 to 40 minutes after treatment.

Detection of phosphorylated mitogen-activated protein kinases

Phosphorylated MAP kinase detection in *A. thaliana* roots was performed as described in (Wyrsh et al., 2015). Briefly, twelve 15-day-old seedlings were placed overnight on split Petri dishes in order to treat roots separately from shoots. Chemicals or control solutions were added to root tips 24 hours later. Roots were dissected from shoot tissue 10 min after treatment and immediately frozen in liquid nitrogen. To extract proteins, 60 mg of shock-frozen roots were ground before addition of 60 μ L of extraction buffer (0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 30% (v/v) glycerol, 10% (v/v) SDS, 0.6 M dithiothreitol, and 0.012% (w/v) bromophenol blue). Total proteins were separated by electrophoresis in 12 % SDS-PAGE. Proteins were then transferred on PVDF membranes for 7 min at 25 V using iBLOT gel transfer system (Invitrogen, USA). Primary antibodies against phospho-p44/42 MAP kinase (Cell Signaling Technologies, USA) were used, with HRP-conjugated anti-rabbit as secondary antibodies (Bio-Rad, USA). Membranes were revealed with SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher Scientific, USA) using Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR, USA). To normalize protein amounts, primary antibodies against plant actin (CusAb, USA) were used, with HRP-conjugated anti-mouse (Cell Signaling Technologies, USA) as secondary antibodies.

Callose staining

Fifteen-day-old *A. thaliana* seedlings were treated by carefully replacing the MS growth medium with fresh medium supplemented with appropriate chemicals or controls. Twenty-four hours after treatment, roots were collected in 12-well plates and fixed in a 3:1 ethanol:acetic acid solution for 2 h. Roots were rehydrated in 70% ethanol for 2 h, 50% ethanol for 2 h, and distilled water overnight. The next day, tissues were clarified by treatment with 10% NaOH at 37°C for 1 h. After several water washes, roots were incubated in 150 mM K_2HPO_4 for 30 min before staining in 150 mM K_2HPO_4 and 0.01% aniline blue (Sigma-Aldrich, USA) for 3 h in the dark. Callose deposition was then observed immediately by using a fluorescence microscope (Olympus BX43, X-cite 120 LED, camera Infinity3 luminera, U.V.B. filter).

Quantification of gene expression

As previously described, 4-week-old hydroponic plants transferred in 10 mL vials containing hydroponic solution for 2 days were treated by adding chemicals or controls to the hydroponic solutions. Each of the three biological replicates per treatment and time point consisted of five pooled root systems harvested from five similarly treated plants. Roots were harvested at 0, 3 and 9h post-elicitation, washed in distilled water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from the roots using Extract'All product and following the manufacturer recommendations (Eurobio).

RNA sequencing

The quality of total RNA samples was determined on the basis of the RNA Quality Indicator (RQI) by using the Experion™ automated electrophoresis system (Bio-Rad, USA). For RNAseq analysis of root transcriptional profiles, validated RNA samples were sent to Genewiz (UK) for library preparation, sequencing by Illumina HiSeq. Bioinformatic analysis were performed by the Plant Biotechnologies Group from Environmental Research and Innovation Department (ERIN) at the Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST). Data were processed in CLC Genomics Workbench software for mapping and calculation of expression rates according to Mortazavi et al., (2008). The false discovery rate (FDR) method was used for statistical evaluation. Genes with a 1.5 > fold change in expression (p-value < 0.1) were selected.

qRT-PCR analysis

For transcript levels quantification by real-time qRT-PCR, 1 µg of extracted RNA was used for reverse transcription using the Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. The transcript levels were determined by real-time qRT-PCR using the CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, USA) and the Absolute Blue SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR reactions were carried out in duplicates in 96-well plates (15 µL per well) in a buffer containing 1X SYBR Green mix (including Taq polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates, SYBR green dye), 280 nM forward and reverse primers, and 1:10 dilution of reverse transcript RNA. After denaturation at 95°C for 15 min, amplification occurred in a two-step procedure: 10 s of denaturation at 95°C and 45 s of annealing/extension at 60°C, with a total of 40 cycles. Identical thermal cycling conditions were used for all targets. Specific primers were designed using the Primer-BLAST software (NCBI) and are presented in Supplemental Table S1. PCR efficiency of the primer sets was calculated by performing real-time PCR on serial dilutions. For each experiment, PCR reactions were performed in duplicate, and at least three independent biological

experiments were analyzed. Transcript levels were normalized using *AtActin* and *AtUbiquitin5* genes as internal controls. Fold induction compared with control sample was calculated using $\Delta\Delta C_t$ method.

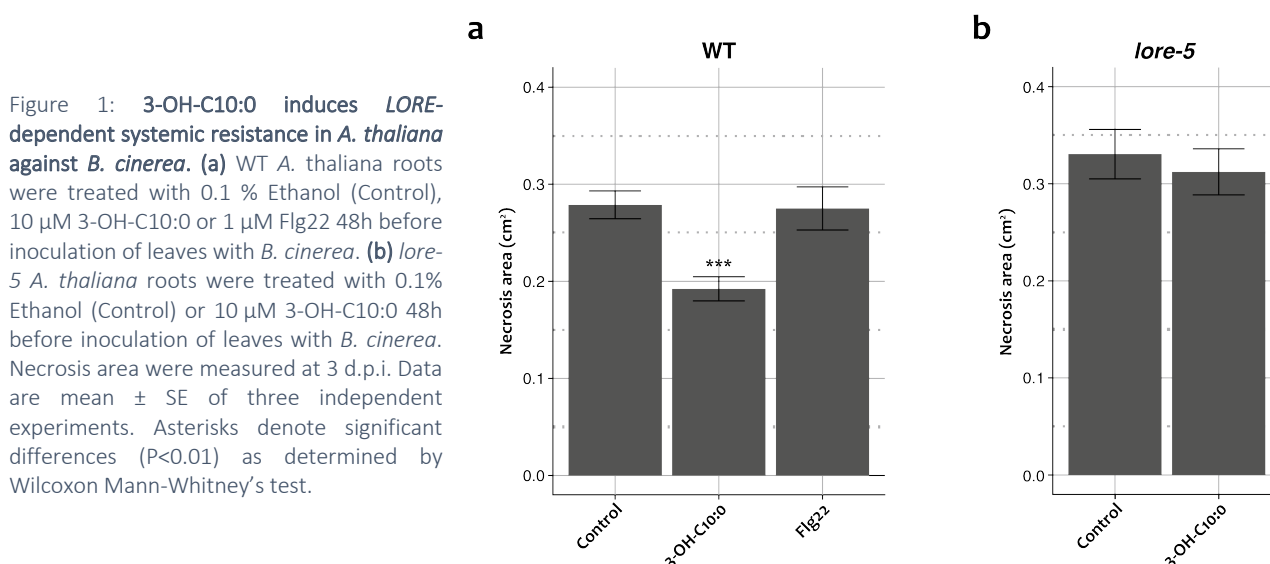
Statistical Analysis

Data were analyzed using the R 3.5.2 software (R Core Team, 2018) and represented using the ggplot2 package (Wickham, 2016). Two different nonparametric statistical tests were used, the Kruskal-Wallis or pair-wise Wilcoxon Mann-Whitney.

Results

3-OH-C10:0 induce LORE-dependent systemic resistance in *A. thaliana* against *Botrytis cinerea*

The 3-OH-C10:0 hydroxy fatty acids are building blocks of the majority of both RLs- and LPS-lipid moieties. In order to determine if 3-OH-C10:0 triggers systemic resistance in *A. thaliana* against *B. cinerea*, roots were treated by adding 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22 as control in hydroponic medium. The leaves were inoculated two days after treatment with *B. cinerea* spore suspension. The disease symptoms were recorded three days after infection. Plants treated with 3-OH-C10:0 showed a significant reduction ($P < 0.05$) of necrosis size compared to mock-treated plants (Figure 1a). However, no disease symptoms reduction was observed on Flg22-treated plants. These results suggest that 3-OH-C10:0 triggers a systemic resistance (ISR) in *A. thaliana* against the necrotrophic fungus *B. cinerea*. Interestingly, treatment of roots with 1 μ M 3-OH-C10:0 was as effective as treatment with 10 μ M 3-OH-C10:0 indicating that 3-OH-C10:0 induces ISR even at lower concentration of 1 μ M (Figure S1). Kutschera et al (2019) recently showed that 3-OH-C10:0 is perceived by *A. thaliana* through the LORE kinase receptor. To test whether the 3-OH-C10:0-mediated ISR is due to perception of the molecule through the LORE receptor, a similar disease resistance assay was conducted on *A. thaliana lore-5* mutants. These plants were treated on roots with 10 μ M 3-OH-C10:0, and the necrosis size measured three days later. No reduction of necrosis size was observed in 3-OH-C10:0-treated *lore-5* plants indicating that 3-OH-C10:0 triggers a LORE-dependent ISR against *B. cinerea* (Figure 1b).



3-OH-C10:0 trigger immune responses in roots

Kutschera et al. recently showed that 3-OH-C10:0 induces early signalling events of plant immunity in leaves, as ROS production and MAP kinase activation (Kutschera et al., 2019). Since *A. thaliana* roots were shown to be responsive to MAMPs such as Flg22 (Millet et al., 2010; Poncini et

al., 2017; Wyrsh et al., 2015), the activation of these MTI markers on 3-OH-C10:0 treated roots were investigated in order to characterize the molecular mechanisms of 3-OH-C10:0-mediated ISR.

A. thaliana roots were treated with 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22 and ROS accumulation was quantified by a luminol-based assay over 1 hour after treatment. A significant increase in apoplastic ROS accumulation was observed within 40 minutes in Flg22-treated roots but no ROS production was detected 3-OH-C10:0-treated roots (Figure 2a). The activation of MAPK3 and 6 was investigated on *A. thaliana* roots after 10 min treatment with 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Both treatments showed the MAPK activation, although the response was weaker after 3-OH-C10:0 treatment compared to Flg22 treatment (Figure 2b). The same experiment was conducted on *A. thaliana lore-5* mutants. The Flg22 treated plants exhibited similar MAPK activation compared WT when 3-OH-C10:0 treated plants did not show any MAPK activation (Figure 2b).

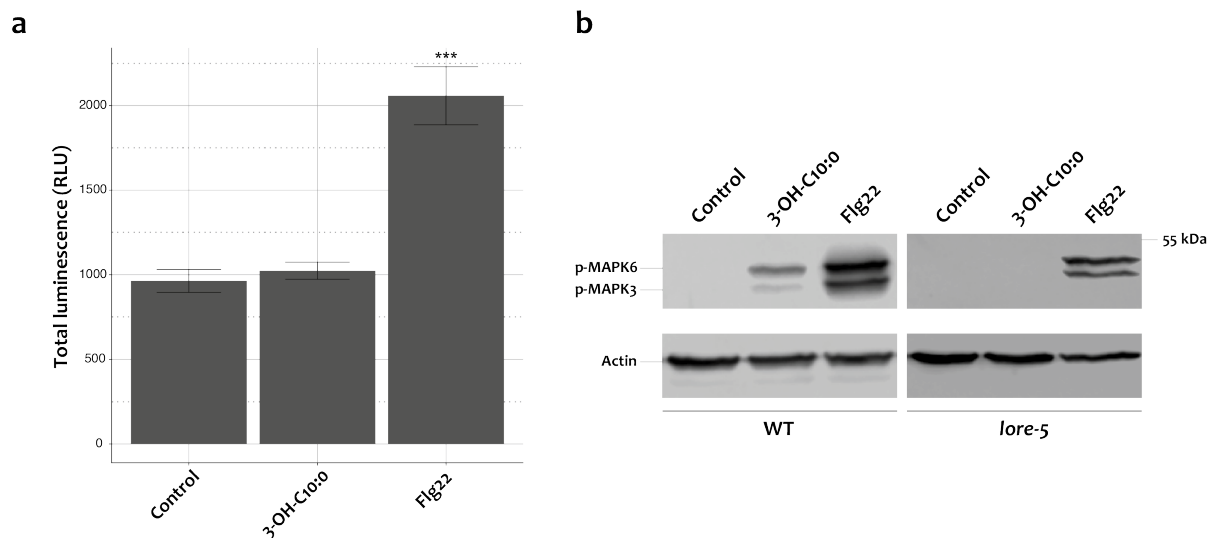


Figure 2: 3-OH-C10:0 trigger early MAPK activation in roots. (a) Extracellular ROS production after treatment of WT *A. thaliana* roots with 0.1 % Ethanol (Control), 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. ROS production was calculated by summing Relative Light Units (RLU) measured between 4 to 40 minutes after treatment. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments. Asterisks denote significant differences ($P < 0.05$) as determined by Wilcoxon Mann-Whitney's test. (b) Activation of MAPK3 and MAPK6 in WT and *lore-5 A. thaliana* roots 10 minutes after treatment with 0.1 % Ethanol (Control), 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Actin was used as loading control. Experiments have been realized three times with similar results.

Callose deposition is another well-studied marker of plant immunity occurring in leaves and roots within 24h after treatment with elicitors (Millet et al., 2010; Monnier et al., 2018). *A. thaliana* WT and *lore-5* seedlings were treated with 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. 24 h after treatment, roots were observed using a fluorescence microscope to visualize callose deposition. Callose deposition, highlighted by green spots, was observed over the epidermal layer in the elongation zone of both WT and *lore-5* Flg22-treated roots (Figure 3). Similar callose deposition were observed in root elongation zone of WT 3-OH-C10:0-treated plants, but these callose deposits were not visible on *lore-5* roots.

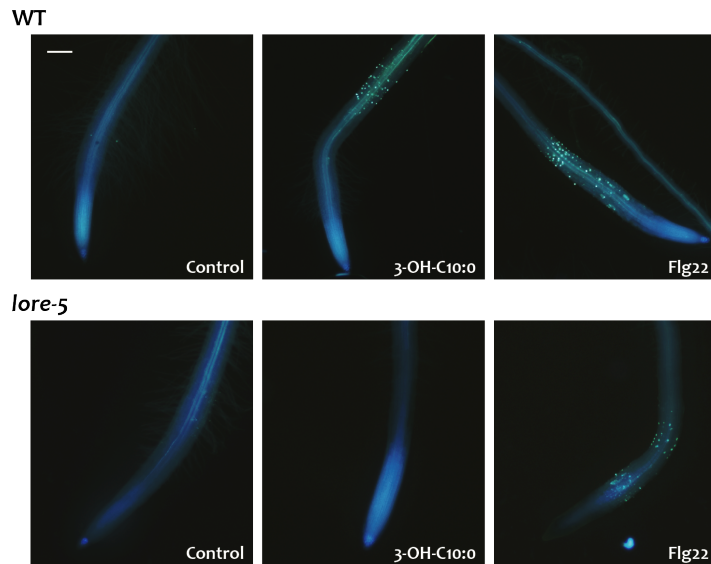


Figure 3: **3-OH-C10:0 triggers callose deposition in roots.** For callose detection, WT and *lore-5* *A. thaliana* roots were stained with aniline bleu 24h after treatment with 0.1 % Ethanol (Control), 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Callose deposition were observed under light and fluorescence microscope with a UV excitation filter. Experiments have been realized three times with similar results. Bar = 100 μ m.

Poncini *et al.* have previously shown that cultivation of *A. thaliana* on Flg22-containing medium cause reduction of the primary root length by 1.5 fold (Poncini et al., 2017). To evaluate the impact of 3-OH-C10:0 on root development, WT *A. thaliana* seedlings were grown vertically on Petri dishes containing MS agar medium supplemented with 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M or 100 μ M of 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Flg22 treated plants showed a reduction of the root length by a factor of 1.3 (Figure 4). Plants treated with 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M 3-OH-C10:0 showed a reduction of the root length by similar factors. However, 100 μ M 3-OH-C10:0 treatment strongly reduced the development of the plant, inhibiting almost totally the root growth (12.5 fold of reduction).

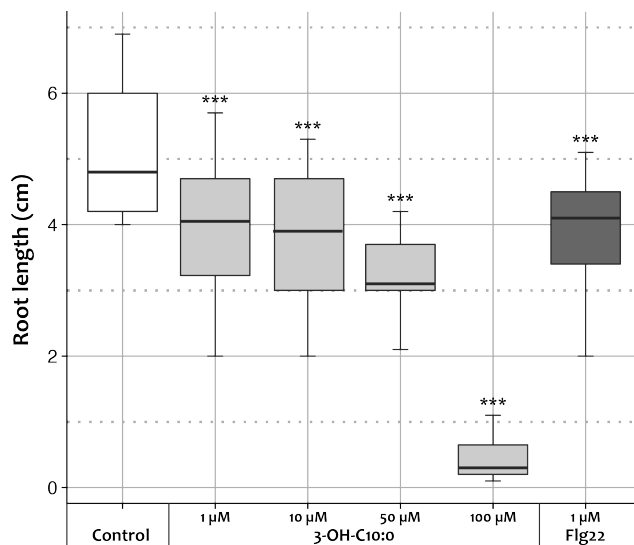


Figure 4: **3-OH-C10:0 causes inhibition of root growth.** WT *A. thaliana* seedlings were grown vertically for 12 days on Petri dishes containing MS agar medium supplemented with 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M or 100 μ M of 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Primary root length was measured and shown as box plots representing ≥ 25 roots per treatment from three independent experiments. Asterisks denote significant differences ($P < 0.05$) as determined by Wilcoxon Mann-Whitney's test.

Altogether, our results indicated that 3-OH-C10:0 is perceived by *A. thaliana* roots triggering MAPK activation and callose deposition in *A. thaliana* roots and leading to a reduction of root development. Moreover, the MAPK activation and callose deposition are lost in *lore-5* mutants, indicating that the root perception of 3-OH-C10:0 is LORE-dependent.

3-OH-C10:0 triggers weak transcriptional changes in roots

To elucidate the molecular mechanisms involved in ISR, a transcriptomic analysis was realised on 3-OH-C10:0-treated roots. In 2010, Millet et al. showed that the expression of *AtMYB51* and *AtCYP71A12* genes are upregulated in Flg22, PGNs and chitin treated roots (Millet et al., 2010). The expression of *AtMYB51* gene was also showed to be up-regulated in AtPep1-treated roots (Poncini et al., 2017). The transcription factor *AtWRKY30* was identified as a Flg22-responsive gene in *A. thaliana* roots (Stringlis et al., 2018). The expression of these genes was then investigated in 3-OH-C10:0-treated roots. *A. thaliana* hydroponic roots were treated with 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. Roots of 5 plants per treatment were sampled and RNA was extracted. The expression patterns of the *AtMYB51*, *AtCYP71A12* and *AtWRKY30* genes were followed 3 and 9h after treatment by real-time quantitative PCR and compared between treated and untreated plants. Results are shown as mean of duplicate from one representative experiment among three independent biological replicates (Figure 5). The expression of the 3 genes was strongly induced 3 hours post-treatment with Flg22. No significant induction of *AtMYB51* expression gene was observed in 3-OH-C10:0 treated roots (Figure 5a). While *AtCYP71A12* and *AtWRKY30* gene expression is strongly induced in Flg22-treated roots, the expression is only induced to a lesser extend 3h after 3-OH-C10:0 treatment (Figure 5b and 5c). For both 3-OH-C10:0 or Flg22, the up-regulated expression of these genes was only transient. Indeed, expression levels returns nearly to basal levels at 9h post-treatment despite a slight induction of these genes remaining observable 9h after Flg22 treatment.

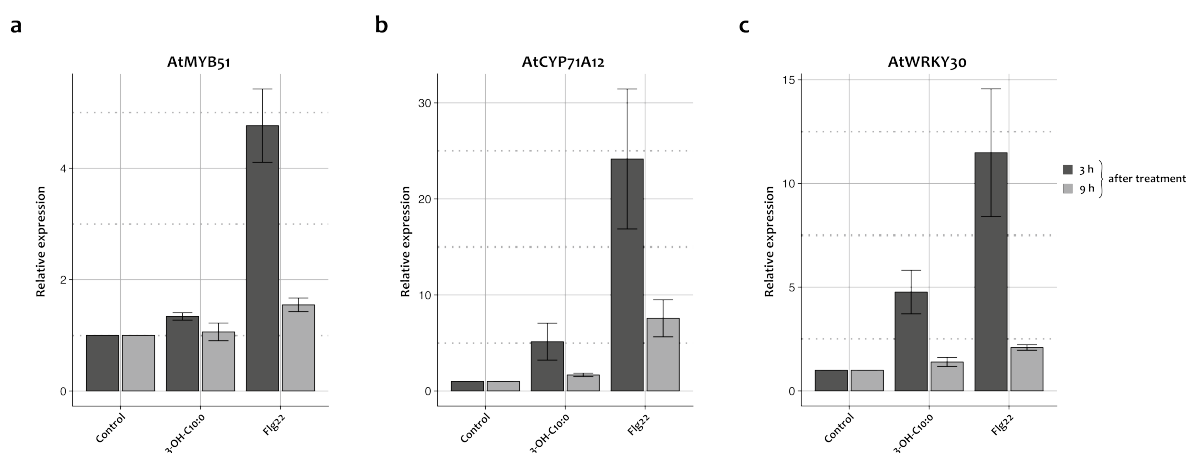


Figure 5: **3-OH-C10:0 treatment induces gene expression in *A. thaliana* roots.** 4-weeks-old *A. thaliana* plants were treated at the root level with 0.1 % Ethanol (Control), 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. 3h and 9h after treatment, roots were collected for RNA extraction. Transcript accumulation of *AtMYB51* (a), *AtCYP71A12* (b) and *AtWRKY30* (c) genes was determined by qRT-PCR. Gene expression levels were normalized to that of reference genes *UBIQUITIN5* and *ACTIN* using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method before calculation of expression relative to the control sample at adequate time. Data are mean $\pm$ SE of three independent repetitions (each repetition was realized in duplicates).

Based on these differential results, transcriptomic analysis was designed to identify activated genes in 3-OH-C10:0 treated roots. Three independent biological replicates were subjected to RNA-

Seq analysis. RNA-Illumina sequencing yielded on average 20 million reads per sample, of which >90% aligned to the *A. thaliana* genome after quality filtering. Surprisingly, only 21 and 5 genes were respectively up and down-regulated in *A. thaliana* 3-OH-C10:0 treated roots after 3h treatment (fold change > 1.5, p-value < 0.1) (Table 1). No transcriptional changes were detected in 3-OH-C10:0 treated roots after 9h treatment. The 12-oxo-phytodienoic-acid-10,11-reductase 1 (*AtOPR1*) and *AtUGT73B4* transcripts were the most up-regulated, respectively 12-fold and 8-fold more expressed in 3-OH-C10:0-treated plants (Table 1). Three glutathione S-transferases transcripts (*AtGSTU24*, *AtGSTU2* and *AtGSTU1*) were also up-regulated following 3-OH-C10:0 treatment (respectively 5.9-, 5.6- and 3.8-fold up-regulation; Table 1).

Six and two genes showing respectively an up- and down-regulated expression by transcriptomic analyse were quantified by qRT-PCR to validate the gene expression changes induced by 3-OH-C10:0. Figure 6 shows transcript accumulation of *AtOPR1*, *AtUGT73B4*, *AtGSTU24*, *AtABCB11*, *AtDHAR2* and *At4g02940* in 3-OH-C10:0 or Flg22 treated roots after 3h treatment (transcript expression was normalized to untreated plants). The expression profiles of the six up-regulated genes quantified by qRT-PCR were consistent to those quantified by RNA-Seq, validating the results of the transcriptomic analysis. *AtOPR1*, *AtUGT73B4*, *AtGSTU24* and *AtABCB11* gene expression was induced by both 3-OH-C10:0 and Flg22 treatments. In contrast, *AtDHAR2* and *At4g02940* gene expression was only induced in 3-OH-C10:0 treated roots. However, the expression levels of *AtOXS3* and *At1G21050* obtained by RNA-Seq are not confirmed by qRT-PCR analyses (Figure 6). The expression of these genes seems unregulated following 3-OH-C10:0 treatment, probably explained by the difference of sensitivity between the two used methods, the qRT-PCR being much more sensitive than RNA-Seq approach.

Table 1: List of genes up and down-regulated 3h after root exposure with 10 μ M 3-OH-C10:0

Gene Name	Locus Identifier	Annotation	Fold Change
<i>Up-regulated genes</i>			
OPR1	AT1G76680	12-oxophytodienoate reductase 1	12.3
UGT73B4	AT2G15490	UDP-glycosyltransferase 73B4	7.8
GSTU24	AT1G17170	glutathione S-transferase TAU 24	5.9
AT4G01870	AT4G01870	tolB protein-like protein	5.9
GSTU2	AT2G29480	glutathione S-transferase tau 2	5.6
PMAT1	AT5G39050	HXXXD-type acyl-transferase family protein	5.3
UGT73B5	AT2G15480	UDP-glucosyl transferase 73B5	5.0
AT4G13180	AT4G13180	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	4.4
ZIFL1	AT5G13750	zinc induced facilitator-like 1	4.2
ABCB11	AT1G02520	ATP-binding cassette (ABC) transporter 11	4.2
AT4G22530	AT4G22530	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	4.1
AT1G76520	AT1G76520	Auxin efflux carrier family protein	4.0
GSTU1	AT2G29490	glutathione S-transferase TAU 1	3.8
AT5G35690	AT5G35690	zinc metalloproteinase-like protein	3.8
DHAR2	AT1G75270	dehydroascorbate reductase 2	3.8
AT3G27880	AT3G27880	hypothetical protein (DUF1645)	3.6
MO1	AT4G15760	monooxygenase 1	3.4
AT4G02940	AT4G02940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	3.2
AT5G14730	AT5G14730	hypothetical protein AT5G14730	3.1
BTS	AT3G18290	zinc finger protein-like protein	3.0
ATAF1	AT1G01720	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	3.0
<i>Down-regulated genes</i>			
AT5G21940	AT5G21940	hybrid signal transduction histidine kinase M-like protein	0.3
AT4G18340	AT4G18340	Glycosyl hydrolase superfamily protein	0.3
AT1G21050	AT1G21050	MIZU-KUSSEI-like protein (Protein of unknown function, DUF617)	0.3
OXS3	AT5G56550	oxidative stress 3	0.2

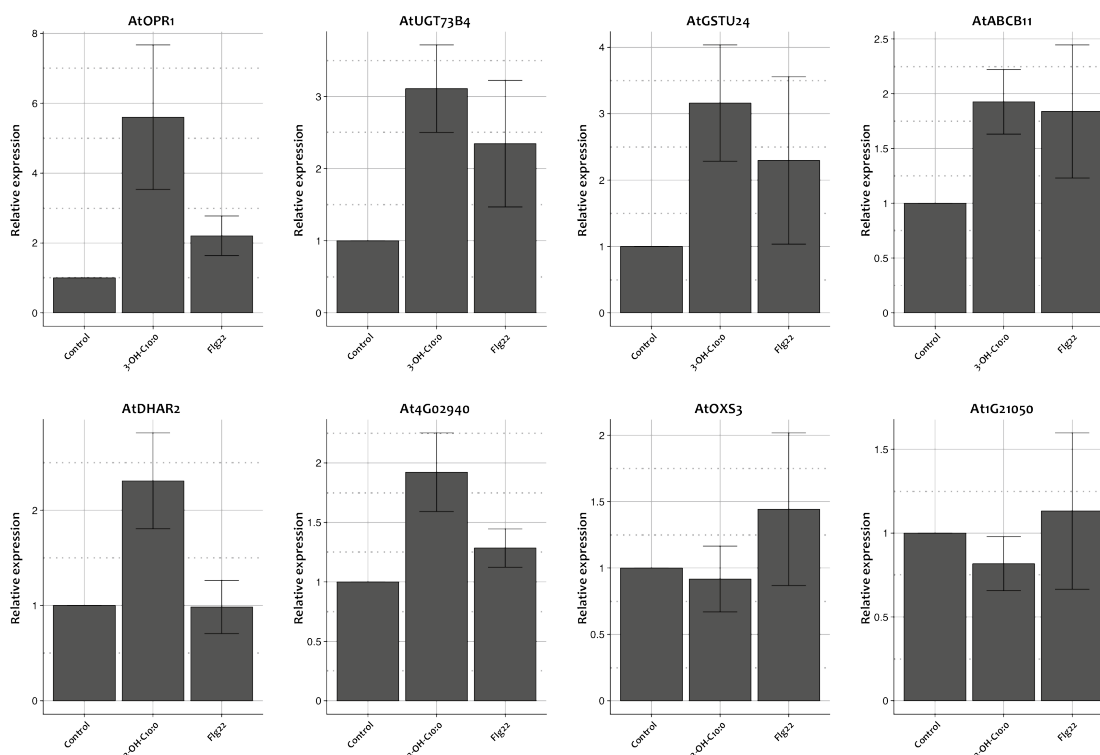


Figure 6: **3-OH-C10:0 treatment induces gene expression in *A. thaliana* roots.** 4-weeks-old *A. thaliana* plants were treated at the root level with 0.1 % Ethanol (Control), 10 μ M 3-OH-C10:0 or 1 μ M Flg22. 3h after treatment, roots were collected for RNA extraction. Transcript accumulation of AtOPR1, AtUGT73B4, AtGSTU24, AtABCB11, AtDHR2, At4G02940, AtOX3 and At1G21050 genes was determined by qRT-PCR. Gene expression levels were normalized to that of reference genes UBIQUITIN5 and ACTIN using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method before calculation of expression relative to the control. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments.

3-OH-C10:0-Mediated ISR is dependent of the SA/JA signalling pathways and dependent of PAD3

To assess the role of SA and JA in 3-OH-C10:0-mediated ISR against *B. cinerea*, mutants impaired in SA synthesis (*sid2-2*; Nawrath and Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001) or insensitive to SA (*npr1-1*; Cao et al., 1994) and mutant insensitive to JA (*jar1-1*; Staswick et al., 2002) were analysed by *B. cinerea* resistance assays. Wild-type and mutant hydroponic plants were treated with 10 μ M 3-OH-C10:0 in culture medium. Plants were then inoculated with *B. cinerea* spore suspension two days after treatment. Necrosis area was measured three days following infection. In WT 3-OH-C10:0 treated plants, a significant ($P < 0.01$) reduction of necrosis size was observed compared to WT control plants (Figure 7). However, in *sid2-2*, *jar1-1* and *npr1-1* mutants, no differences in necrosis size were observed between 3-OH-C10:0-treated and control plants. The 3-OH-C10:0-induced resistance observed in WT plants was compromised in *sid2-2*, *jar1-1* and *npr1-1* mutants, suggesting that SA and JA signalling pathways are both involved in the induction of systemic resistance against *B. cinerea*.

Similarly, the *A. thaliana pad3-1* mutant, impaired in the biosynthesis of camalexin, was also used for disease resistance assay. The 3-OH-C10:0-induced resistance was also compromised in this mutant since no difference in necrosis size was observed between 3-OH-C10:0-treated and control plants (Figure 7). Altogether, these results suggest that the 3-OH-C10:0-mediated ISR against *B.*

cinerea is dependent of the SA/JA signalling pathways and requires the camalexin antimicrobial compound.

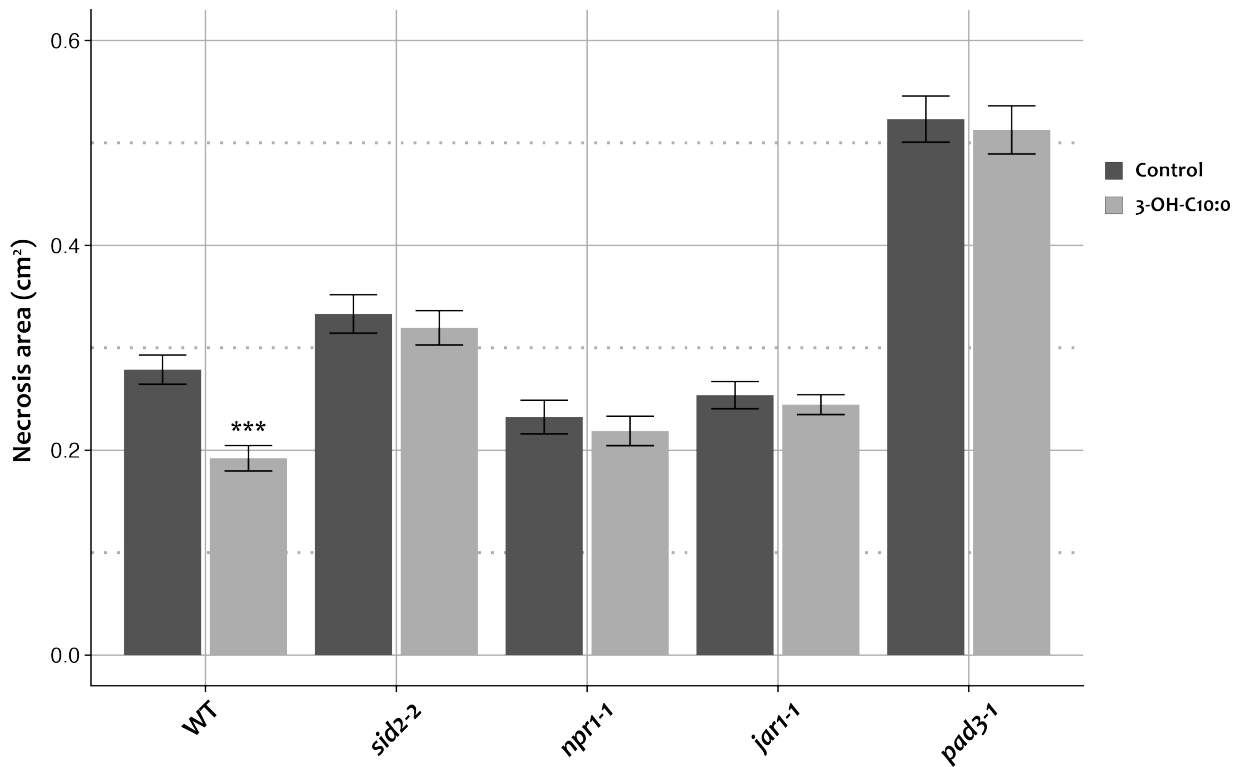


Figure 7: **3-OH-C10:0-Mediated ISR is dependent of the SA/JA signalling pathways and dependent of PAD3.** WT, *sid2-2*, *npr1-1*, *jar1-1* and *pad3-1* *A. thaliana* roots were treated with 0.1 % Ethanol (Control) or 10 μ M 3-OH-C10:0 48h before inoculation of leaves with *B. cinerea*. Necrosis area were measured at 3 d.p.i. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments. Asterisks denote significant differences ($P < 0.01$) as determined by Wilcoxon Mann-Whitney's test.

Discussion

RLs and LPS glycolipids induce foliar local defence responses in many plant species (Sanchez et al., 2012; Ranf et al., 2015). The LPS-sensing mechanism was intensively investigated. These studies have led to the identification of the LORE receptor as LPS-Pattern Recognition Receptor. LORE appeared to sense mainly the lipid A moiety of LPS (Ranf et al., 2015). More recently, Kutschera et al. demonstrated that mc-3OH-FAs, constituents of the lipid A, are the minimal motif for LORE-mediated immune activation (Kutschera et al., 2019). Interestingly, these 3-hydroxyfatty acids are also components of the RL lipid dimeric part, indicating they are common building blocks of the lipid part of both RLs and LPS. In this study 3-OH-C10:0 is shown to be perceived by *A. thaliana* roots triggering the induction local defences responses and leading to an ISR against *B. cinerea*.

The 3-OH-C10:0 treatment of *A. thaliana* roots triggers a systemic resistance against foliar infection with *B. cinerea* (Figure 1). This 3-OH-C10:0-mediated ISR is LORE-dependent indicating a potential perception of this molecule by roots through this receptor. Moreover, this 3-OH-C10:0 root perception activates early MTI signalling events such as MAPK3 and MAPK6 phosphorylation which usually acts as precursor of defence genes induction (Yu et al., 2017). LORE-dependent activation of MAPKs in 3-OH-C10:0-treated roots seems therefore to be a key element contributing in 3-OH-C10:0-mediated ISR (Figure 2b). Apoplastic ROS accumulation is another well-known MTI early signalling event activated following elicitor perception. However, no ROS production in 3-OH-C10:0-treated roots was detected whereas Flg22 triggered a strong oxydative burst (Figure 2a). It cannot be completely excluded that 3-OH-C10:0 triggers ROS production in roots. Indeed, since the 3-OH-C10:0-mediated MAPK activation is weaker than the one triggered by Flg22, it could be supposed that the putative 3-OH-C10:0-mediated ROS production is probably below the detection limit of the luminol-based method used. Moreover, 3-OH-C10:0 induces LORE-dependent callose deposition on epidermis in root elongation zone (Figure 3). It is assumed that callose deposition could contribute in cell wall reinforcement of this root zone originally weaker than older parts of the roots. This reinforcement of cell wall may limit the penetration of the root by pathogenic microorganisms. Similar results are obtained with Flg22 in WT plants, as previously shown in Millet et al. (2010). Recently, several studies seem to indicate that the root response to IPs is restricted to the elongation zone (Millet et al., 2010; Poncini et al., 2017). This specific localized IP response could lead to localized ROS production that can be diluted in the whole root tissues and explaining the absence of ROS detection. Interestingly, even if Flg22 triggers ROS accumulation and stronger MAPK activation in roots compared to 3-OH-C10:0, no enhanced resistance against *B. cinerea* was observed on Flg22-

treated plants. This result is consistent with the study of Meziane et al. (2005) showing that flagella of the PGPR bacteria *Pseudomonas putida* WCS358 were not effective to induce ISR in bean and tomato against *B. cinerea*. However, in the same study, the same flagella preparation triggered ISR against the hemibiotrophic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Meziane et al., 2005).

The 3-OH-C10:0 molecule triggers transient induction of gene expression in roots. Both *AtCYP71A12* and *AtWRKY30* gene expression were upregulated in 3-OH-C10:0-treated roots 3h post-treatment and the expression levels returned to basal levels at 9h post-treatment (Figure 5b and 5c). Transcriptomic analyse on *A. thaliana* roots highlighted only few differentially expressed genes between 3-OH-C10:0-treated and control-treated roots (Table 1). The low number of differentially expressed genes identified by the transcriptomic approach could be explained similarly to the absence of ROS detection discussed earlier. Root samples were harvested by pooling multiple entire root systems including younger, older or differentiated root zones. The transcriptional changes linked to IP responses localized in root elongation zones could be probably erased by a sample dilution effect.

Among the 3-OH-C10:0 regulated genes, *AtOPR1*, *AtUGT73B4* and *AtGSTU24* were the most up-regulated by 3-OH-C10:0 treatment. OPRs family comprises 3 characterized isoenzymes in *A. thaliana*, OPR1, OPR2 and OPR3. Physiological function of these enzymes remains unclear with the exception of OPR3 which is involved in JA biosynthesis (Schaller et al., 2000). The *AtOPR1* gene expression was shown to be up-regulated by both senescence and JA (He and Gan, 2001). On the other hand, all of these three *AtOPR* genes were shown to be involved in 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) detoxification (Beynon et al., 2009). UGTs are UDP-glycosyltransferases that transfers sugars to a wide range of secondary metabolites, resulting in increased stability and solubility and therefore modified bioactivity of these metabolites. 120 *AtUGT* genes were identified in *A. thaliana* genome classified into 14 groups (A-N) according to their sequence similarity. Langlois-Meurine and colleagues (Langlois-Meurinne et al., 2005) previously showed a role of eight *AtUGT* genes belonging to the group D, including *AtUGT73B4* and *AtUGT73B5* (both 3-OH-C10:0-induced *AtUGT* genes (Table 1)) in resistance of the plant to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. The expression of these genes was moreover responsive to SA, early induced after wounding, *B. cinerea* and *P. infestans* infection and during UV, ozone and oxidative stresses. Interestingly, several reports also indicate a role of UGTs in xenobiotics pollutants metabolism processes including TNT (Gandia-Herrero et al., 2008) or pharmaceuticals compounds (Landa et al., 2018, 2017). Glutathione S-transferases (GST) such as

GSTU24, GSTU2 and GSTU1, involved in the glutathione conjugation of a range of electrophilic substrates, are induced in 3-OH-C10:0-treated roots. Like UGTs, some GSTs were shown to be implied in detoxification of TNT (Yoon et al., 2007) or pharmaceuticals compounds (Landa et al., 2018, 2017). GSTs, as well as DHARs (such as the Dehydroascorbate reductase 2 encoded by *AtDHAR2* gene, which expression is induced in 3-OH-C10:0-treated roots), plays also important roles in protecting plants against oxidative damages. These enzymes are involved in regeneration of glutathione and ascorbate, major antioxidants of plants cells, during the ascorbate-glutathione cycle (Noshi et al., 2017; Sappl et al., 2004). GSTs have also been shown to be responsive to SA treatment. The role of these enzymes in plant defence remain however to be demonstrated.

The gene expression pattern of 3-OH-C10:0-treated and Flg22-treated root samples reveals differentially regulated genes. The expression of some genes, such as *AtCYP71A12* or *AtWRKY30*, is induced by both treatment but are stronger expressed in Flg22-treated samples (Figure 5). Some other genes, such as *AtMYB51* gene, are only up-regulated in Flg22-treated roots suggesting their regulation is Flg22-specific (Figure 5). On the contrary, some other genes, such as *AtOPR1*, *AtDHAR2* or *At4G02940*, seem specifically up-regulated in 3-OH-C10:0-treated roots (Figure 6). Altogether, our results show that Flg22 and 3-OH-C10:0-mediated gene expression share common regulation pattern but also display some specific responses. Nevertheless, it remains difficult to establish a comprehensive pattern of 3-OH-C10:0-mediated gene expression. Further studies using *A. thaliana* mutant lines impaired for these candidate genes will be required to decipher their putative roles in 3-OH-C10:0-mediated ISR.

The results with mutants deficient in defence signalling pathways suggest that 3-OH-C10:0-mediated ISR against *B. cinerea* requires both SA and JA signalling pathways (Figure 7). Cross-talks between SA-, JA- and ET-dependent signalling pathways play fundamental role in regulation of plant defence responses. SA is rather considered to be involved in the resistance against biotrophic and hemibiotrophic pathogens whereas JA and ET are usually involved in resistance against necrotrophic pathogens and herbivory insects. Although many reports describe antagonistic interplays between SA and JA/ET signalling pathways, synergistic interactions have been described as well (Pieterse et al., 2012). Moreover, Salas-Marina showed that colonization of *A. thaliana* roots by the PGPF *Trichoderma atroviride*, associated with enhanced resistance against hemibiotrophics and necrotrophics pathogens, induces activation of both JA/ET and SA pathways (Salas-Marina et al., 2011).

RLs and LPS are naturally excreted in the extracellular medium by several bacteria, including PGPR species. 3-OH-C10:0 being a common building blocks of the lipid part of both RLs and LPS, its insertion in the glycolipid structures is realized in the bacterial cytoplasm during the fatty acid metabolism (Abdel-Mawgoud et al., 2010). However, the release of free 3-OH-C10:0 during plant-bacteria interaction remains uncertain. Bacteria cell lysis or exocytosis of outer membrane vesicle could explain the release of the free 3-OH-C10:0 (Ramsay et al., 1990). In the case of LPS, the PagL enzyme of *Pseudomonas* which encodes a lipid A 3-O deacetylase, was shown to be involved in the release of free 3-OH-C10:0 from lipid A in the bacteria outer membrane, resulting in modification of the lipidA structure (Ernst et al., 2006; Geurtsen et al., 2005). Free 3-OH-C10:0 can also be produced through thioesterases activities from hydroxydecanoyl-acyl carrier protein and from (R)-3-hydroxydecanoyl-CoA, as intermediates of fatty acid metabolism.

In conclusion, our study demonstrates that 3-OH-C10:0 is perceived by *A. thaliana* roots, triggering local LORE-dependent MAPK activation and callose deposition accompanied of transcriptional changes. The 3-OH-C10:0 root perception leads to an ISR effective against *B. cinerea*, probably involving SA and JA signalling pathways and camalexin production. Even if further experiments are required to decipher the mechanisms leading to the 3-OH-C10:0-mediated ISR, our results suggest that plants have developed specific receptors to perceive common building blocks of different bacterial amphiphilic molecules that are essential for the host colonization of bacteria.

References

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Beynon, E.R., Symons, Z.C., Jackson, R.G., Lorenz, A., Rylott, E.L., Bruce, N.C., 2009. The role of oxophytodienoate reductases in the detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene by *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 253–61. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141598>
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of Ericitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Boutrot, F., Zipfel, C., 2017. Function, discovery, and exploitation of plant Pattern Recognition Receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X., 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of Systemic Acquired Resistance, *The Plant Cell*.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H., Thomma, B.P.H.J., 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 541–563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>
- Ernst, R.K., Adams, K.N., Moskowitz, S.M., Kraig, G.M., Kawasaki, K., Stead, C.M., Trent, M.S., Miller, S.I., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* 188, 191–201. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.191-201.2006>
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., 2003. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* 35, 193–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01794.x>
- Gandia-Herrero, F., Lorenz, A., Larson, T., Graham, I.A., Bowles, D.J., Rylott, E.L., Bruce, N.C., 2008. Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O - and C -glucosyltransferases. *Plant J.* 56, 963–974. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03653.x>
- Geurtsen, J., Steeghs, L., Hove, J. Ten, van der Ley, P., Tommassen, J., 2005. Dissemination of lipid A deacylases (pagL) among gram-negative bacteria: identification of active-site histidine and serine residues. *J. Biol. Chem.* 280, 8248–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414235200>

- He, Y., Gan, S., 2001. Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in Arabidopsis, Plant Molecular Biology.
- Kim, Y.C., Anderson, A.J., 2018. Rhizosphere pseudomonads as probiotics improving plant health. Mol. Plant Pathol. 19, 2349–2359. <https://doi.org/10.1111/mpp.12693>
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., Schäffer, M., Smakowska-Luzan, E., Belkhadir, Y., Vlot, A.C., Chandler, C.E., Schellenberger, R., Schwudke, D., Ernst, R.K., Dorey, S., Hückelhoven, R., Hofmann, T., Ranf, S., 2019. Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in Arabidopsis plants. Science 364, 178–181. <https://doi.org/10.1126/science.aau1279>
- Kutschera, A., Ranf, S., 2019. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. Biochimie 159, 93–98. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.07.028>
- Landa, P., Prerostova, S., Langhansova, L., Marsik, P., Vanek, T., 2017. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. roots to ibuprofen. Int. J. Phytoremediation 19, 695–700. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1267697>
- Landa, P., Prerostova, S., Langhansova, L., Marsik, P., Vankova, R., Vanek, T., 2018. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* roots to naproxen and praziquantel. Ecotoxicol. Environ. Saf. 166, 301–310. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.09.081>
- Langlois-Meurinne, M., Gachon, C.M.M., Saindrenan, P., 2005. Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in Arabidopsis. PLANT Physiol. 139, 1890–1901. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067223>
- Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M., Bakker, P.A.H.M., 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6, 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00276.x>
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Le Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M., 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. Plant Cell 22, 973–990. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069658>
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Clément, C., Dorey, S., Sarazin, C., Rippa, S., 2018. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological Disorders. Front. Plant Sci. 9, 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170>

- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Nawrath, C., Métraux, J.P., 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393–404.
- Noshi, M., Yamada, H., Hatanaka, R., Tanabe, N., Tamoi, M., Shigeoka, S., 2017. *Arabidopsis* dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 523–533. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1256759>
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Poncini, L., Wyrsh, I., Dénervaud Tendon, V., Vorley, T., Boller, T., Geldner, N., Métraux, J.-P., Lehmann, S., 2017. In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* 12, e0185808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185808>
- R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P., Ramsay, J.A., 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2093–8. <https://doi.org/10.1128/aem.70.7.3807-3813.2004>
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., Scheel, D., 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Immunol.* 16, 426–433. <https://doi.org/10.1038/ni.3124>
- Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>

- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.-H., Clément, C., Baillieu, F., Dorey, S., 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.* 160, 1630–41. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>
- Sappl, P.G., Oñate-Sánchez, L., Singh, K.B., Millar, A.H., 2004. Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific Phi and Tau classes. *Plant Mol. Biol.* 54, 205–219. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000028786.57439.b3>
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E.W., 2000. 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210, 979–984. <https://doi.org/10.1007/s004250050706>
- Smith, J.M., Heese, A., 2014. Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leave tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods* 10, 6. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-6>
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., Rowe, M.L., 2002. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14, 1405–1415. <https://doi.org/10.1105/tpc.000885>
- Stringlis, I.A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M.C., Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J., 2018. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J.* 93, 166–180. <https://doi.org/10.1111/tpj.13741>
- Varnier, A.-L., Sanchez, L., Vasta, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.-H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clément, C., Baillieu, F., Dorey, S., 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant. Cell Environ.* 32, 178–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x>
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant graphics for data analysis, Use R! Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–565. <https://doi.org/10.1038/35107108>

- Wyrsh, I., Domínguez-Ferreras, A., Geldner, N., Boller, T., 2015. Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis fls2* mutants. *New Phytol.* 206, 774–784. <https://doi.org/10.1111/nph.13280>
- Yoon, J.M., Oliver, D.J., Shanks, J. V., 2007. Phytotoxicity and phytoremediation of 2,6-dinitrotoluene using a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* 68, 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.02.003>
- Yu, X., Feng, B., He, P., Shan, L., 2017. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>

Acknowledgments

This work was supported by the grants from ReslGli project co-funded by Region Grand Est and the European Union FEDER programme. Support from the MESRI (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation) and the Federative Research Structure SFR Condorcet are gratefully acknowledged.

Title: 3-Hydroxydecanoic acid triggers Arabidopsis root innate immunity and Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea*

Authors: Matthieu Touchard⁺¹, Marion Cordier¹, Romain Schellenberger¹, Sylvain Legay², Gea Guerriero², Christophe Clément¹, Fabienne Baillieul¹, Jérôme Crouzet¹, Sylvain Cordelier¹ and Stéphan Dorey^{*1}

Affiliation: ¹RIBP EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100, France; ²Plant Biotechnologies Group-Environmental Research and Innovation Department (ERIN), Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), L-4422 Belvaux, Luxembourg

[*stephan.dorey@univ-reims.fr](mailto:stephan.dorey@univ-reims.fr)

Keywords: Arabidopsis thaliana, rhamnolipid, elicitor, immunity, ISR, *Botrytis*

Supplementary information

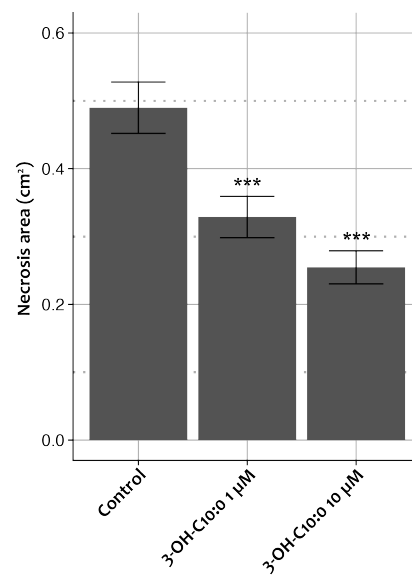


Figure S1: 3-OH-C10:0 at both 1 and 10 μ M induces systemic resistance in *A. thaliana* against *B. cinerea*. WT *A. thaliana* roots were treated with 0.1 % Ethanol (Control), 1 μ M 3-OH-C10:0 or 10 μ M 3-OH-C10:0 48h before inoculation of leaves with *B. cinerea*. Necrosis area were measured at 3 d.p.i. Data are mean $\pm$ SE of three independent experiments. Asterisks denote significant differences ($P < 0.01$) as determined by Wilcoxon Mann-Whitney's test.

Table S1: List of primers used in this study

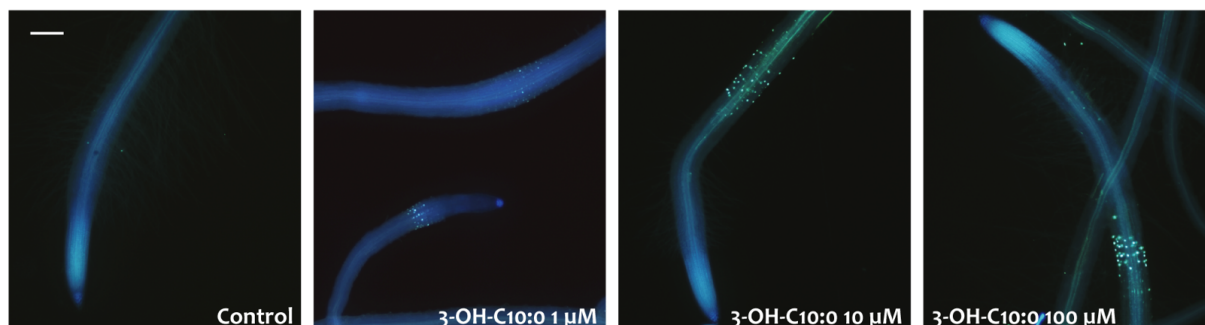
Gene Name	Forward	Reverse	Reference
At1g21050	GTGTGACCGTCGTAGAAGCA	CGCTCAAACCTAGCCCTCAA	This study
At4g02940	CGATAATCGACGCGATGTGC	CGCCACCACCTCTTCAGAT	This study
AtABC11	ATCCAAAATCTGGCGCAGTG	AATGAACTTCGCCGCATTAGC	This study
AtActin	CCCAGGAATTGCTGACCGTA	TTTTCTCTCTGGCGGTGCA	(Sanchez et al., 2012)
AtCYP71A12	CGAAAGCGAGAAGAGTATTGGA	TGTGGCCTAATGGTTGACCG	This study
AtDHAR2	GGCGACTGTCCGTTTAGC	TCTCGGATCCGTCATTAGCG	(Kayihan et al., 2016)
AtGSTU24	TCCATAGCTGGTTTGCACTG	TAGCGACGCTCTCTCTCTCC	(Rahantaniaina et al., 2012)
AtMYB51	CTACAAGTGTTCGTTGACTCTGAA	ACGAAATTATCGCAGTACATTAGAGGA	(Frerigmann and Gigol, 2012)
AtOPR1	TCAGCCAAATGGAAAAGCTCCT	CCGGGGATTTCTTCGATACCA	This study
AtOXS3	CTGAAGCAAATGGGCAACATGA	TAGGGAGGTGTGACATGAGGT	This study
AtUbiquitin5	GGAAGAAGAAGACTTACACC	AGTCCACACTTACCACAGTA	This study
AtUGT73B4	GAAGGATGCGAGAACCGTGA	AGAGCACTCGGTTTGGTTGT	This study
AtWRKY30	CCCAAGAGCGATGATTCCGA	CTGAATCCATCGTCCAGCGT	This study

Conclusion

Dans cette publication nous avons mis en évidence que le 3-OH-C10:0, la brique constitutive des RLs, induit une ISR chez *A. thaliana* contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*. Cette molécule est perçue par les racines *via* le RLK LORE et active des évènements de signalisation liés à l'immunité. Il induit ainsi l'activation des MAPK3 et MAPK6, des dépôts de callose sur l'épiderme de la zone d'élongation de la racine et l'expression de gènes. Enfin, nous avons montré l'implication des voies de signalisation du SA et du JA ainsi que du gène *PAD3*, relié à la synthèse de la camalexine, dans l'ISR induite par le 3-OH-C10:0.

Nous avons relevé des similitudes mais aussi des différences entre la réponse racinaire au 3-OH-C10:0 et la réponse au peptide Flg22. Ainsi, alors que le traitement racinaire au 3-OH-C10:0 induit une ISR contre *B. cinerea*, aucune induction de résistance de la plante à ce champignon n'a été observée en réponse à un traitement racinaire avec le peptide Flg22. Étrangement, par rapport à la réponse racinaire au peptide Flg22, la réponse des racines au 3-OH-C10:0 est relativement faible ; les MAPK sont plus faiblement induites, les dépôts de callose sont moins nombreux et l'expression des gènes de défense racinaires *AtCYP71A12* et *AtWRKY30* est plus faible également. Le gène *AtMYB51*, marqueur de la réponse immunitaire racinaire, induit en réponse à Flg22, n'est par ailleurs pas induit dans les racines traitées avec le 3-OH-C10:0. Outre une réaction de défense accrue, le peptide Flg22 active aussi une production extracellulaire de ROS dans les racines, réponse qui n'est pas observée suite à un traitement au 3-OH-C10:0. Concernant les gènes dont l'expression est induite par le 3-OH-C10:0 il est intéressant de noter que certains ne sont pas induits par Flg22 ou dans une moindre mesure par rapport au traitement au 3-OH-C10:0. Ces différences de l'expression de gènes et des niveaux d'induction des marqueurs de l'immunité que nous avons suivis au niveau pourraient suggérer une spécificité de la réponse racinaire au 3-OH-C10:0 par rapport à la réponse au peptide Flg22 et potentiellement liée à l'induction de l'ISR.

WT



lore-5

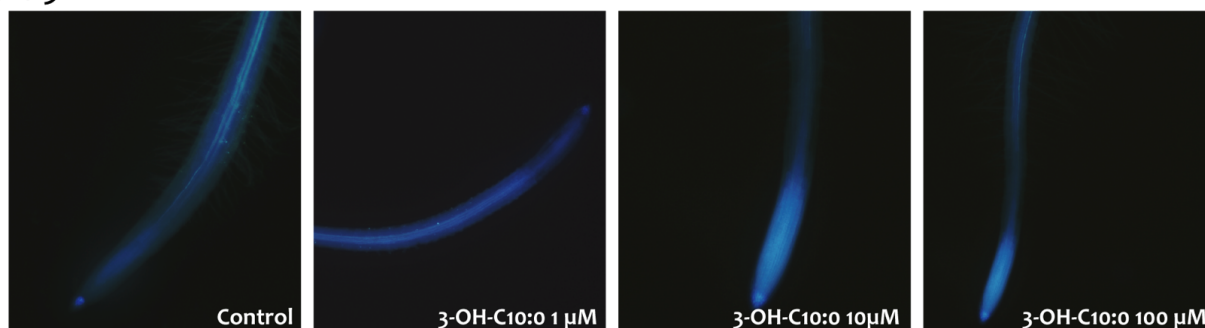


Figure C1-1 : Différentes concentrations de 3-OH-C10:0 induisent des dépôts de callose sur les racines d'*A. thaliana*. Pour la détection des dépôts de callose, des arabettes WT et *lore-5* sont colorées au Bleu Aniline 24h après traitement avec EtOH à 0.1% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 1, 10, 100 μ M. Les dépôts de callose sont observés au microscope à épifluorescence avec un filtre UV. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois avec des résultats similaires. La barre d'échelle représente 100 μ m.

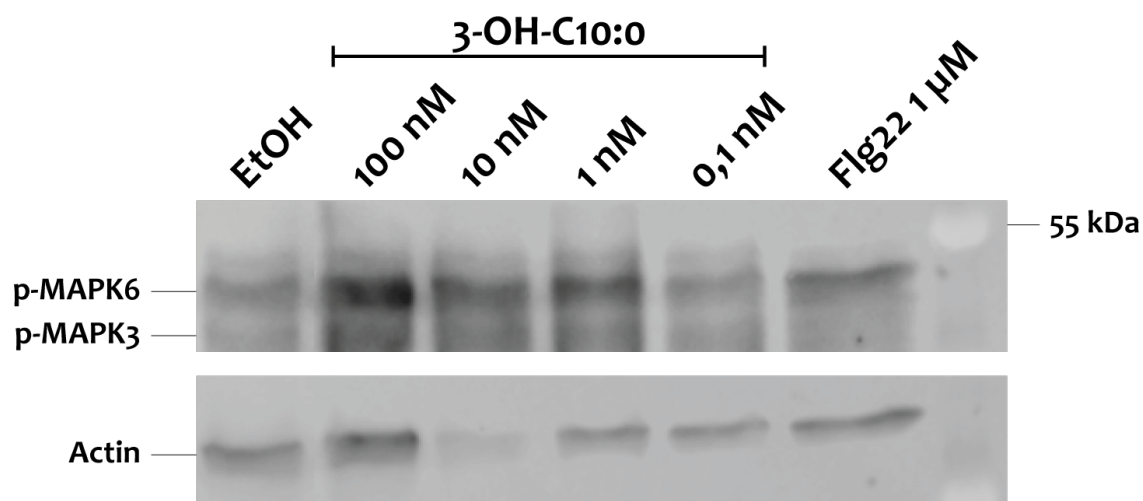


Figure C1-2 : Effet dose du 3-OH-C10:0 sur la phosphorylation des MAPK. Détection de l'état de phosphorylation des MAPK3 et MAPK6 dans les racines d'*A. thaliana* WT 10 minutes après un traitement avec EtOH à 0.1% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 100, 10, 1 et 0.1 nM ou Flg22 à 1 μ M. L'actine (Actin) a été utilisée comme contrôle de charge. Cette expérience a été réalisée deux fois (réplicats techniques) avec des résultats similaires.

Expériences complémentaires – Résultats et discussion

I- Effet dose du 3-OH-C10:0 sur les racines d'*A. thaliana*

Afin d'identifier la concentration minimale de 3-OH-C10:0 perceptible par les racines d'*A. thaliana*, différentes concentrations de cette molécule ont été appliquées sur les racines.

Nous avons d'abord voulu visualiser les dépôts de callose induits par un traitement avec 1, 10 ou 100 μM de 3-OH-C10:0. Comme on peut le voir sur la Figure C1-10 de la callose est apposée sur l'épiderme de la zone d'élongation des racines des plantes WT traitées avec chacune de ces trois concentrations de 3-OH-C10:0. À 100 μM , malgré l'effet toxique de cette concentration de 3-OH-C10:0 observé sur des plantules (Figure 4 de la publication), les dépôts de callose induits sont aussi importants qu'à 10 μM de 3-OH-C10:0. Ceci semble suggérer une éventuelle saturation du récepteur LORE, incapable de percevoir davantage de molécules de 3-OH-C10:0 à 100 μM qu'à 10 μM . À la concentration de 1 μM de 3-OH-C10:0, les dépôts de callose restent très importants mais semblent un peu moins nombreux qu'à 10 μM . La sensibilité de cette technique étant limitée et la quantification difficile, nous avons voulu détecter l'état de phosphorylation des MAPK par western blot pour tester des concentrations de 3-OH-C10:0 inférieures à 1 μM . Le résultat préliminaire est présenté Figure C1-2. Il semble que les MAPK6 (les seules visibles sur la Figure C1-2) soient phosphorylées par le traitement des racines avec les concentrations de 3-OH-C10:0 variant de 100 nM à 1 nM. À la concentration de 0.1 nM en revanche, la bande correspondant aux MAPK6 phosphorylées a la même intensité que la bande visible à la même position pour le contrôle. D'après cette expérience préliminaire, il semble que 1 nM soit la concentration de 3-OH-C10:0 minimale nécessaire à l'activation des MAPK en quantités suffisantes pour être détectée. Cette concentration minimale de 3-OH-C10:0 perceptible par les racines d'*A. thaliana* est similaire à la concentration minimale de cette molécule induisant des réponses immunitaires au niveau foliaire chez *A. thaliana* (Kutschera et al., 2019).

II- Implication du facteur de transcription AtMYB72 dans l'ISR induite par le 3-OH-C10:0

Dans le cadre de l'étude de l'ISR induite par la bactérie PGPR *P. simiae* WSC417r chez *A. thaliana*, le gène *AtMYB72* a été identifié comme étant induit dans les racines suite à la colonisation des tissus par cette bactérie (Verhagen et al., 2004). Ce gène code pour un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de transcription MYB, qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques chez les plantes, mais dont les fonctions de beaucoup d'entre eux sont encore inconnues (Dubos et al., 2010). Des facteurs de transcription MYB sont ainsi impliqués dans la résistance au stress hydrique, la HR, la production de glucosinolates de défense, la résistance aux insectes herbivores ou encore la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes (Dubos et al., 2010; Frerigmann and Gigolashvili, 2014). Dans le cas d'*AtMYB72*, il a été montré que ce facteur de transcription est indispensable à la mise en place de l'ISR induite par cette bactérie, efficace notamment contre *Pst* DC3000 et contre *B. cinerea* (Van der Ent et al., 2008). *AtMYB72* est également impliqué dans la régulation de la synthèse de coumarines, sécrétées par la plante dans la rhizosphère en conditions de déficit en fer pour améliorer l'assimilation des ions Fe^{3+} (Stringlis et al., 2018b).

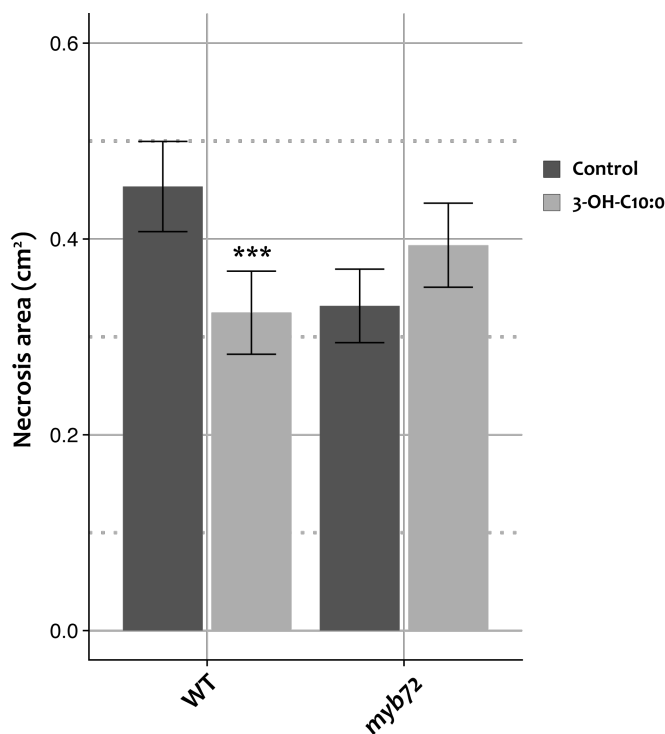


Figure C1-3 : L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 est dépendante du facteur de transcription AtMYB72.

Des arabettes hydroponiques WT et *myb72* ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH 0.01% (contrôle) ou 3-OH-C10:0 à 10 μ M 48h avant inoculation des feuilles avec *B. cinerea*. La surface des nécroses a été mesurée 3 jours après inoculation. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de deux réplicats biologiques indépendants.

Figure C1-4 : Le 3-OH-C10:0 n'induit pas de modification précoce de l'expression du gène AtMYB72 dans les racines.

Des plants hydroponiques d'*A. thaliana* WT âgées de 4 semaines sont traitées au niveau racinaire avec 0.1% d'EtOH (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 μ M ou Flg22 à 1 μ M. 3 et 9h après le traitement, les racines sont prélevées et les ARNs extraits. L'accumulation des transcrits du gène *AtMYB72*, a été mesurée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression du gène ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des gènes de référence *AtUbiquitin5* et *AtActin* par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avant calcul de l'expression par rapport au contrôle correspondant. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de deux réplicats biologiques indépendants.

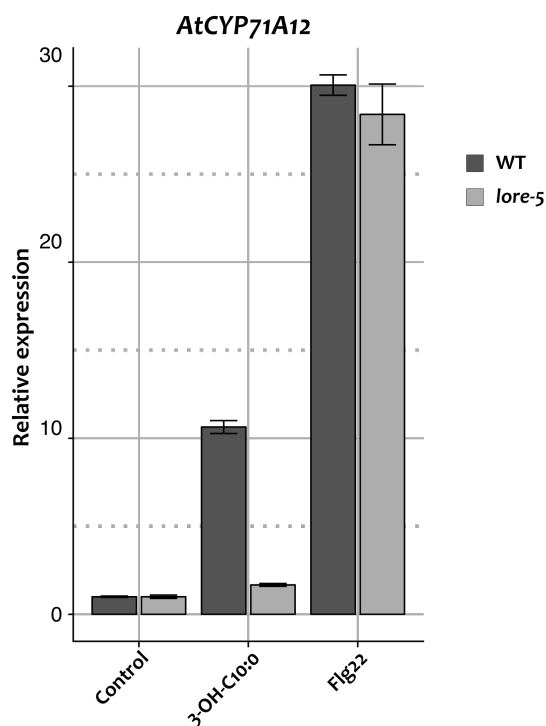
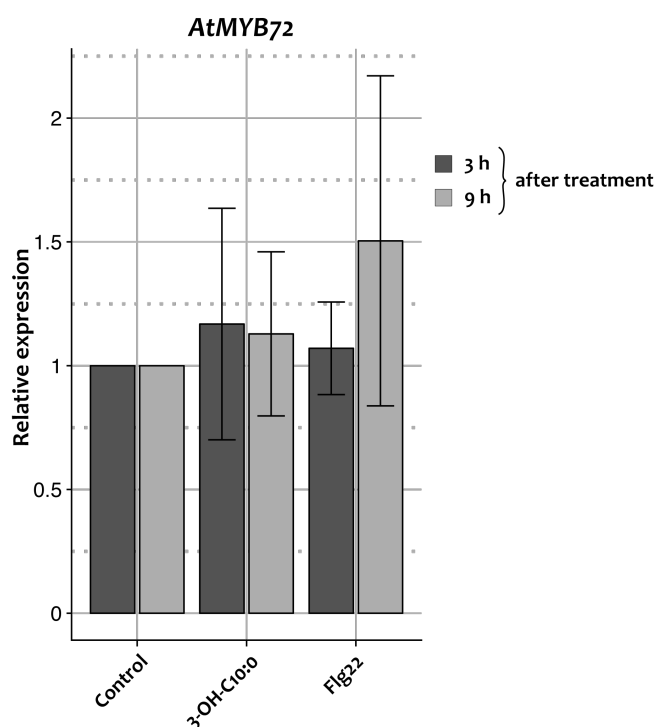


Figure C1-5 : Le 3-OH-C10:0 induit la sur-régulation LORE-dépendante du gène AtCYP71A12.

Des plants hydroponiques d'*A. thaliana* WT et *lore-5* âgées de 4 semaines sont traitées au niveau racinaire avec 0.1% d'EtOH (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 μ M ou Flg22 à 1 μ M. 3h après le traitement, les racines sont prélevées et les ARNs extraits. L'accumulation des transcrits du gène *AtCYP71A12*, a été mesurée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression du gène ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des gènes de référence *AtUbiquitin5* et *AtActin* par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avant calcul de l'expression par rapport au contrôle correspondant. Les données représentent la moyenne $\pm$ SEM de deux réplicats techniques d'une expérimentation représentative.

Afin de déterminer le rôle potentiel de ce gène dans l'ISR contre *B. cinerea* induite par le 3-OH-C10:0, des tests de protection ont été réalisés sur la lignée *myb72* (SAIL_713_G10) ayant subi l'insertion d'un T-DNA dans le gène *AtMYB72* résultant en la perte de son expression. Comme on peut le voir sur la Figure C1-3, les plantes *myb72* traitées avec le 3-OH-C10:0 ne présentent pas la réduction de la surface de nécroses caractéristique de l'ISR induite par cette molécule chez les plantes WT. *AtMYB72* semble donc également impliqué dans la mise en place de l'ISR contre *B. cinerea* par le 3-OH-C10:0 chez *A. thaliana*.

III- Expression de gènes

D'après la Figure C1-4, l'expression du gène *AtMYB72* ne semble pas induite 3h après traitement ni par Flg22 ni par le 3-OH-C10:0. Il semble en revanche que ce gène soit très faiblement induit 9h après traitement avec le peptide Flg22, mais le niveau d'expression est trop faible pour conclure à une réelle surexpression de ce gène par rapport au contrôle. Ces résultats peuvent s'expliquer par la précocité des temps de prélèvements. En effet, dans l'étude qui a mis en évidence l'induction de l'expression d'*AtMYB72* dans les racines de plantes inoculées avec *P. simiae* WSC417r, les racines ont été prélevées 3 jours après inoculation (Van der Ent et al., 2008). Une étude transcriptomique a été réalisée à des temps plus précoces (0.5, 1, 3 et 6h) sur des racines d'*A. thaliana* inoculées avec *P. simiae* WSC417r, ou traitées avec un peptide Flg22 (Stringlis et al., 2018a). Bien que cette étude ait mis en évidence de très nombreux gènes induits précocement dans les racines par ces différents traitements, aucune induction de l'expression d'*AtMYB72* n'y a été détectée à ces temps de prélèvements. Ce gène est malgré tout induit dans les racines 48h après inoculation avec la bactérie PGPR (Stringlis et al., 2018a). Le gène *AtMYB72* semble donc intervenir tardivement dans la mise en place de l'ISR.

Ensuite, afin de confirmer que l'induction du gène *AtCYP71A12* observée 3h après le traitement au 3-OH-C10:0 fait intervenir le récepteur LORE, nous avons suivi l'expression de ce gène dans les racines d'*A. thaliana lore-5*. La Figure C1-5 montre que chez ce mutant comme chez le WT, le peptide Flg22 stimule l'expression du gène *AtCYP71A12*. En revanche ce gène n'est pas induit dans les racines des plantes *lore-5* par le traitement au 3-OH-C10:0. Ce résultat confirme que l'induction de l'expression du gène *AtCYP71A12* par le 3-OH-C10:0 résulte d'évènements déclenchés par la perception de cette molécule par le récepteur LORE. Enfin, outre les gènes présentés précédemment, nous avons également suivi l'expression de gènes supplémentaires (*AtCYP79B2*, impliqué dans la conversion du tryptophane en IAOx qui est un précurseur notamment de la camalexine ; *AtCYP79F2*, impliqué dans la synthèse des glucosinolates ; *AtERF1*, code pour un facteur de transcription lié à la réponse à l'éthylène) dans les racines de plantes traitées au 3-OH-C10:0 mais aucun de ces gènes ne se sont révélés induits dans les racines que ce soit par le traitement au 3-OH-C10:0 ou par le traitement avec Flg22.

IV- Visualisation de l'effet racinaire du 3-OH-C10:0 par microscopie

La réponse racinaire aux IPs semble être restreinte à la zone d'élongation. Millet *et al.* (2010) ont montré que la racine d'*A. thaliana* répond préférentiellement à Flg22 au niveau de la zone

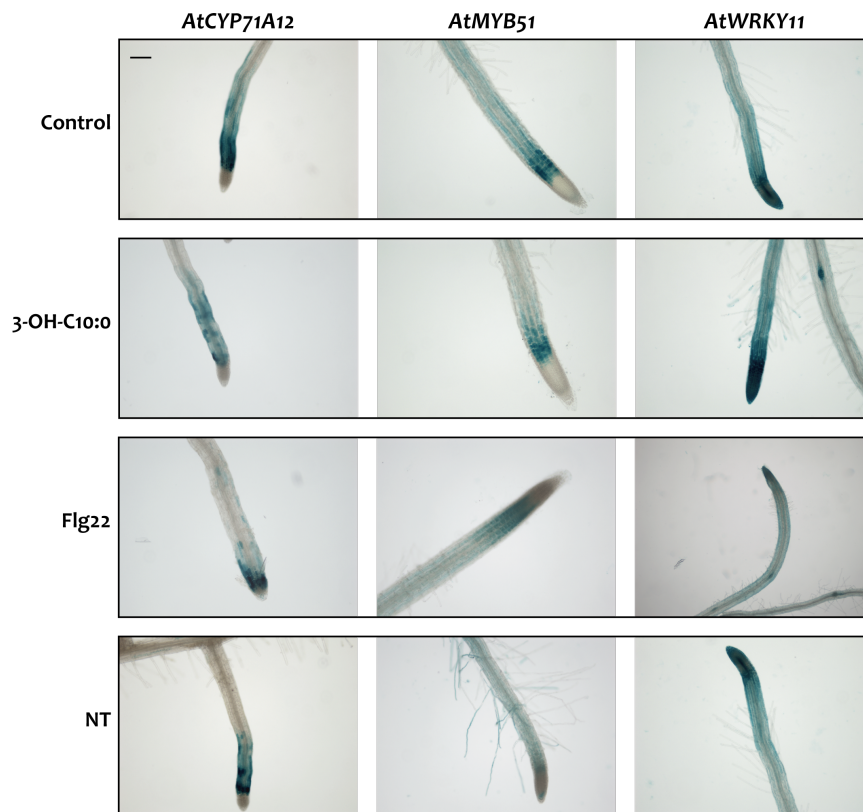


Figure C1-6 : Visualisation au microscope optique de l'expression du gène reporter GUS des lignées d'*A. thaliana* transgéniques **AtCYP71A12_{pro}:GUS**, **AtMYB51_{pro}:GUS** et **AtWRKY11_{pro}:GUS**.

Les plantules âgées de 15 jours sont traitées avec 0.1% EtOH (control), 10 μ M 3-OH-C10:0, 1 μ M Flg22 ou non traitées (NT) pour 5h (AtCYP71A12_{pro}:GUS) ou 3h (AtMYB51_{pro}:GUS et AtWRKY11_{pro}:GUS) avant coloration. La barre d'échelle représente 100 μ m.

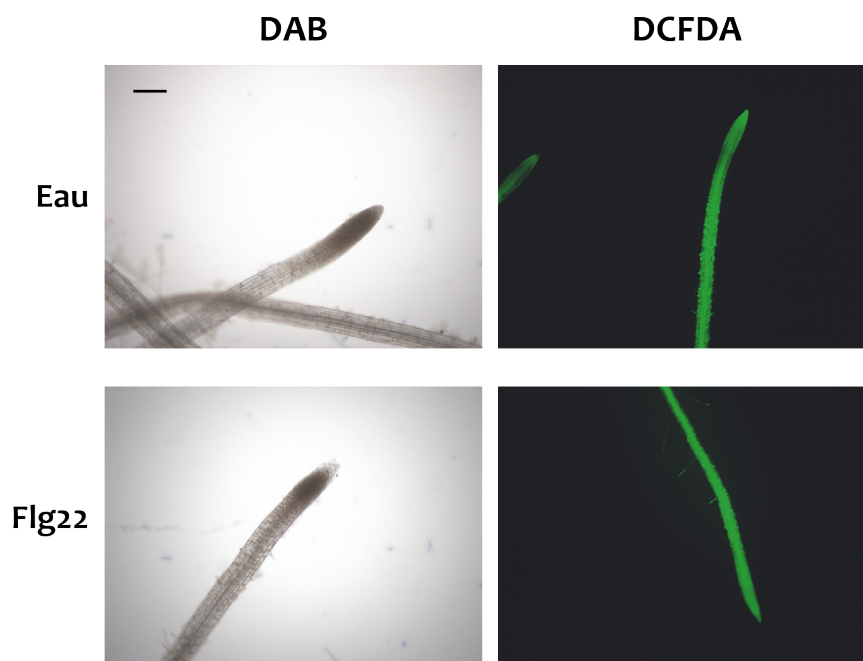


Figure C1-7 : Visualisation de la production racinaire de ROS en microscopie.

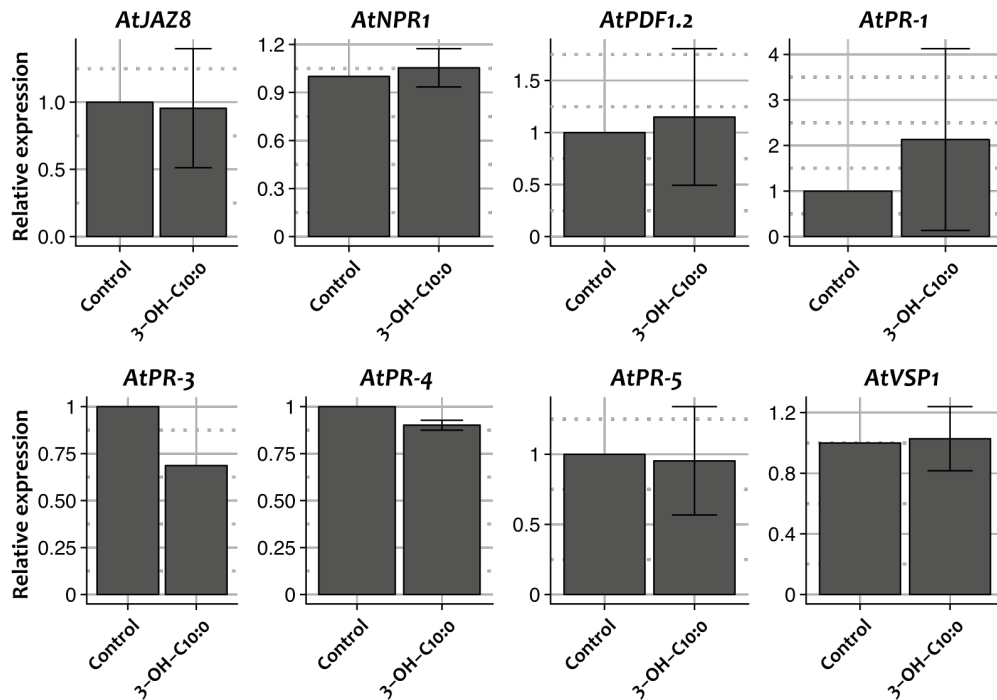
Visualisation au microscope optique de la production intracellulaire d' H_2O_2 au DAB et au microscope à épifluorescence de la production intracellulaire de ROS au DCFDA sur des racines d'*A. thaliana* 15 minutes après traitement avec de l'eau milliQ ou avec Flg22 à 1 μ M. La barre d'échelle représente 100 μ m.

d'élongation et nous avons précédemment observé que les dépôts de callose induits tant par Flg22 que par le 3-OH-C10:0 semblent localisés sur l'épiderme de cette zone racinaire. Dès lors, si la réponse racinaire au 3-OH-C10:0 est naturellement restreinte à la zone d'élongation, zone ne mesurant qu'entre 1 et 2 cm chez *A. thaliana*, et plus faible que la réponse au peptide Flg22, il est possible que cette réponse soit diluée et que nos méthodes de détection ne soient pas suffisamment sensibles. En effet, en raison de la difficulté à prélever suffisamment d'une longueur de racine aussi faible, toutes les expériences présentées ici sont réalisées sur des racines d'*A. thaliana* entières. Cette limitation peut expliquer le faible nombre de gènes différentiellement exprimés détectés par l'approche transcriptomique par RNAseq.

En utilisant des lignées exprimant le gène reporter GUS, Millet *et al.* (2010) ont mis en évidence que les gènes *AtCYP71A12*, *AtMYB51* et *AtWRKY11* (qui code pour un facteur de transcription régulant négativement la résistance basale chez *A. thaliana*) sont exprimés dans la zone d'élongation en réponse à un traitement avec Flg22 (Millet *et al.*, 2010). Ces lignées transgéniques portent un gène codant pour une β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle des séquences promotrices des gènes d'intérêt étudiés impliqués dans la réponse de la racine à des IPs. L'induction de l'expression du gène d'intérêt se traduit alors aussi par l'expression du gène codant pour l'enzyme GUS qui, en présence de son substrat, l'acide 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique (X-GlcA), produit un précipité insoluble bleu de dichloro-di-bromo-indigo, révélant ainsi l'induction de l'expression du gène d'intérêt. Afin de comparer la zone de la racine responsable de la réponse au 3-OH-C10:0 et celle responsable de la réponse à Flg22, nous avons tenté d'observer au microscope l'expression de ces trois gènes dans les lignées *AtCYP71A12_{pro}:GUS*, *AtMYB51_{pro}:GUS* et *AtWRKY11_{pro}:GUS*. Cette expérience n'a cependant pas permis de mettre en évidence l'activation de ces gènes ni par le traitement au 3-OH-C10:0 ni par un traitement à Flg22. La Figure C1-6 montre en effet que le niveau basal d'induction des constructions GUS est très important : les racines sont très colorées même pour les plantes non traitées (NT). Malgré des tentatives d'optimisation du protocole, les taux basaux d'expression de ces trois gènes restaient très élevés, et ne nous ont pas permis de conclure à une induction de leur expression par l'un ou l'autre des deux IPs testés.

Les mesures de production extracellulaire de ROS au niveau racinaire ont été réalisées sur des racines d'*A. thaliana* entières, ce qui peut avoir pour effet de masquer une éventuelle production de ROS très faible ou très localisée sur une zone précise de la racine en réponse au 3-OH-C10:0. Afin de nous assurer que le traitement au 3-OH-C10:0 n'induit pas de production de ROS sur les racines, nous avons voulu visualiser la production de ces composés au niveau racinaire par microscopie. Une première méthode de coloration des racines au 3,3'-diaminobenzidine (DAB), qui permet la détection histochimique de l' H_2O_2 intracellulaire, et une seconde basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, le 2',7'-Dichlorofluoresceine diacétate (DCFDA), permettant de visualiser la production de ROS intracellulaires, ont été utilisées. Ni l'une ni l'autre de ces deux expériences visant à visualiser la production de ROS par les racines en réponse à un traitement avec un IP n'ont fonctionnées. La Figure C1-7 montre que les racines contrôles présentent une coloration et une fluorescence aussi importante que les racines traitées avec Flg22.

A



B

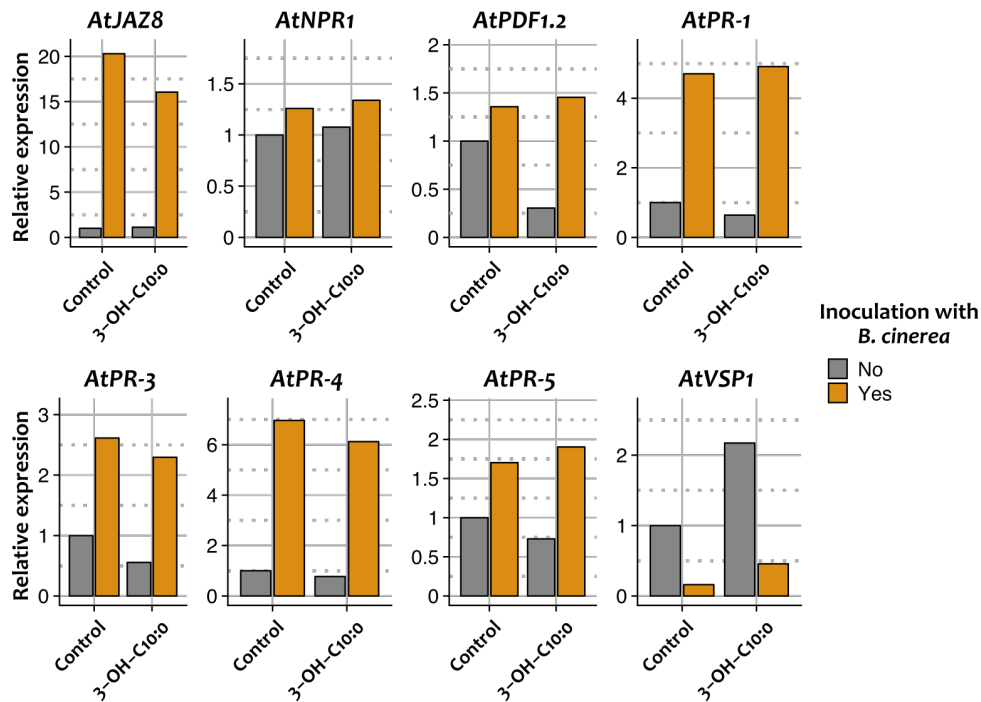


Figure C1-8 : L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 se traduit-elle par l'induction de l'expression de gènes de défense au niveau foliaire ?

Des plants hydroponiques d'*A. thaliana* WT âgées de 4 semaines sont traitées au niveau racinaire avec 0.1% d'EtOH (contrôle) ou 3-OH-C10:0 à 10 μ M. (A) 48h après traitement, les rosettes sont prélevées et les ARNs extraits. L'accumulation des transcrits des gènes *AtJAZ8*, *AtPDF1.2*, *AtPR-1*, *AtPR-3*, *AtPR-4*, *AtPR-5* et *AtVSP1* a été mesurée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des gènes de référence *AtUbiquitin5* et *AtActin* par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avant calcul de l'expression par rapport au contrôle. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de deux répétitions biologiques indépendantes. (B) 48h après traitement, la moitié des plantes sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de conidies de *B. cinerea* à 1.10^5 conidies.mL⁻¹ sur les feuilles. 24h plus tard (soit 72h après traitement) les feuilles des plantes non inoculées et des plantes inoculées sont prélevées et les ARNs extraits. L'accumulation des transcrits des gènes *AtJAZ8*, *AtPDF1.2*, *AtPR-1*, *AtPR-3*, *AtPR-4*, *AtPR-5* et *AtVSP1* a été mesurée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des gènes de référence *AtUbiquitin5* et *AtActin* par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avant calcul de l'expression par rapport au contrôle correspondant aux plantes non inoculées. Les données représentent la moyenne de deux réplicats techniques.

V- L'ISR induite par le 3-OH-C10:0 se traduit-elle par des réponses foliaires de défense?

Le traitement racinaire avec le 3-OH-C10:0 conduit à l'expression d'une résistance systémique au niveau foliaire qui est efficace contre *B. cinerea*. Nous avons donc voulu identifier des gènes différentiellement exprimés au niveau des feuilles suite à la perception racinaire du 3-OH-C10:0. Pour cela, nous avons suivi l'expression de gènes utilisés classiquement au laboratoire car étant des marqueurs de l'immunité foliaire, dans les feuilles de plantes hydroponiques prélevées 48 et 72 heures après traitement racinaire avec 10 μ M de 3-OH-C10:0. L'expression des gènes *AtJAZ8* (*Jasmonate ZIM-Domain8*), *AtNPR1*, *AtPDF1.2*, *AtPR-1*, *AtPR-3*, *AtPR-4*, *AtPR-5* et *AtVSP1* (*Vegetative Storage Protein1*) a ainsi été étudiée. Les gènes *AtJAZ8* et *AtVSP1* sont des gènes de la réponse au JA, les gènes *AtPDF1.2*, *AtPR-3* et *AtPR-4* sont des gènes de la réponse au JA et à l'ET, le gène *AtNPR1* est le régulateur clé de la réponse au SA et les gènes *AtPR-1* et *AtPR-5* codent pour des protéines de défense et sont des marqueurs de la réponse au SA.

D'après la Figure C1-8A, aucun des 8 gènes étudiés, ne sont différentiellement exprimés dans les feuilles 48h après le traitement racinaire avec le 3-OH-C10:0. Le même résultat est obtenu pour les feuilles prélevées 72h après traitement.

Ce résultat est en accord avec ce qui a déjà été mis en évidence dans le cas de l'étude d'une ISR induite par des microorganismes bénéfiques. En particulier, la bactérie PGPR *P. simiae* WCS417r, bien qu'induisant d'importantes modifications transcriptomiques au niveau racinaire, n'induit pas de modifications détectables de l'expression de gènes dans les feuilles (Verhagen et al., 2004).

Cependant dans cette étude, il a été mis en évidence que l'ISR induite par la bactérie PGPR se traduit par des modifications de l'expression de gènes dans les feuilles suite à l'inoculation avec la bactérie pathogène *Pst* DC3000. Des résultats similaires ont été observés sur des plants de vignes bactérisés avec la bactérie PGPR *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Alors que des gènes de défense de la réponse au JA et au SA ne sont que très faiblement induits dans les feuilles de plantes inoculées au niveau racinaire avec la bactérie, ces mêmes gènes sont fortement induits dans les feuilles de ces plantes bactérisées en réponse à l'infection par *B. cinerea* (Miotto-Vilanova et al., 2016). Cette sur-régulation de certains gènes montre que les plantes inoculées avec une bactérie PGPR, sont potentialisées et répondent plus rapidement et plus fortement à une attaque ultérieure d'agent pathogène (phénomène de priming).

Afin de mettre en évidence ce phénomène de priming dans le cas de l'ISR induite par le traitement au 3-OH-C10:0, nous avons suivi l'expression des gènes ci-dessus, dans les feuilles 72h après traitement dans des plantes inoculées ou non inoculées avec *B. cinerea*. Pour cela, 48h après traitement, la moitié des plantes sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de conidies de *B. cinerea* sur les feuilles. Les valeurs d'expression de ces différents gènes sont normalisées par rapport aux plantes contrôles non inoculées. La Figure C1-8B montre une induction de l'expression des gènes *AtJAZ8*, *AtPDF1.2*, *AtPR-1*, *AtPR-3*, *AtPR-4* et *AtPR-5* dans les plantes inoculées avec le champignon par rapport aux plantes non inoculées, ce qui confirme que ces gènes sont des marqueurs de l'immunité au niveau foliaire. Le gène *AtVSP1* semble lui réprimé dans les feuilles 24h après l'inoculation avec *B. cinerea*. En revanche, aucun de ces 8 gènes n'est différentiellement exprimé

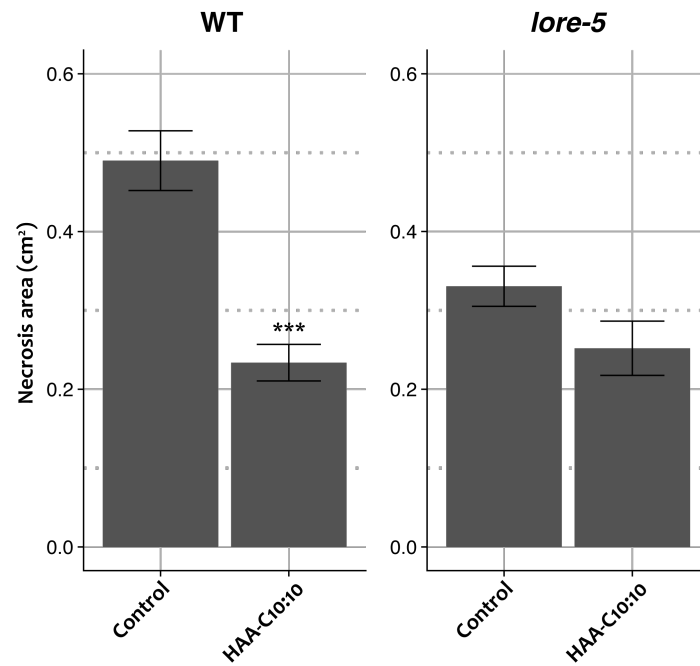


Figure C1-9 : **Le HAA-C10:0 induit chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea*.**

Des arabettes hydroponiques WT et *lore-5* ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH 0.01% ou HAA-C10:10 à 1 μ M 48h avant inoculation des feuilles avec *B. cinerea*. La surface des nécroses a été mesurée 3 jours après inoculation. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de deux réplicats biologiques indépendants. Les astérisques indiquent les différences significatives (***) déterminées par un test statistique par paire de Wilcoxon-Mann-Whitney.

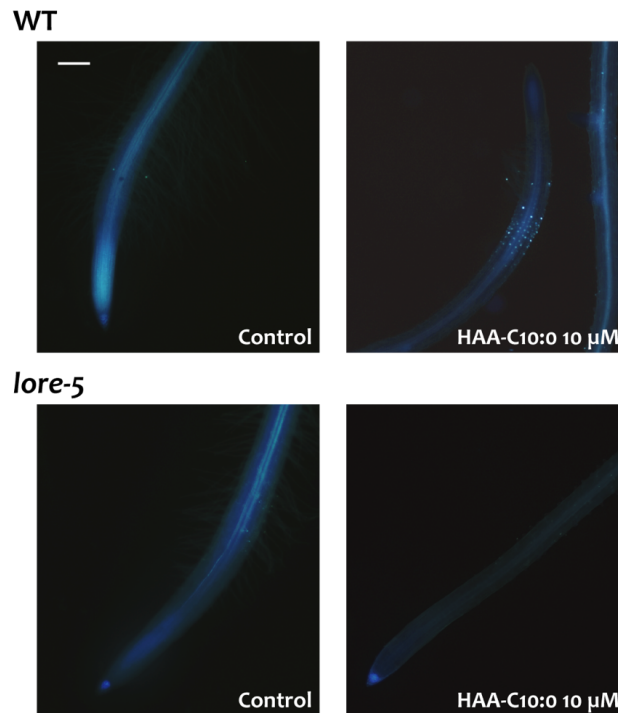


Figure C1-10 : **Le HAA-C10:10 induit des dépôts de callose sur les racines d'*A. thaliana*.**

Pour la détection des dépôts de callose, des arabettes WT et *lore-5* sont colorées au Bleu Aniline 24h après traitement avec EtOH à 0.1% (contrôle) ou HAA-C10:10 à 10 μ M. Les dépôts de callose sont observés au microscope à épifluorescence avec un filtre UV. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois avec des résultats similaires. La barre d'échelle représente 100 μ m.

dans les feuilles suite au traitement racinaire au 3-OH-C10:0 dans les plantes inoculées avec *B. cinerea* (Figure C1-8). Par manque de temps, nous n'avons pas été en mesure d'approfondir l'étude du mécanisme de priming induit par le traitement racinaire au 3-OH-C10:0. D'autres gènes, comme le gène codant pour le facteur de transcription AtMYB72 (ce facteur de transcription jouant un rôle central dans la mise en place de l'ISR par une bactérie PGPR), et/ou des temps de prélèvement plus précoces, pourront être étudiés pour mettre en évidence le phénomène de priming induit par cette molécule. De même il sera intéressant de tester d'autres marqueurs foliaires de l'immunité dans ces plantes traitées au niveau racinaire avec du 3-OH-C10:0. Par exemple, des plantes potentialisées par un traitement au benzothiadiazole (composé synthétique imitant le SA) montrent une plus forte activation des MAPK3 et MAPK6 après infection (Beckers et al., 2009). De même, des plantes exprimant une ISR suite à l'inoculation des racines avec la bactérie PGPR *B. cereus* montrent une production accrue d'H₂O₂ et des dépôts de callose plus importants lors de l'infection des parties aériennes par *B. cinerea* (Nie et al., 2017).

VI- Le HAA-C10:10 active une ISR contre *B. cinerea* et des dépôts de callose au niveau racinaire

Les HAAs sont des précurseurs de synthèse des RLs, naturellement sécrétés par *P. aeruginosa*, et qui jouent un rôle important dans la formation du biofilm bactérien. Nous avons mis en évidence au laboratoire que ces molécules, sont perçues par *A. thaliana* au niveau foliaire. Les HAAs, et en particulier le HAA-C10:10, induisent ainsi une production extracellulaire de ROS, un influx calcique et la phosphorylation des MAPK. Au niveau local, ces molécules induisent une protection de la plante contre la bactérie *Pst* DC3000. Ces réponses ne sont pas activées dans le mutant *lore-5* indiquant que la perception du HAA-C10:10 implique le récepteur LORE (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation). Étant donné que le 3-OH-C10:0 induit une ISR contre *B. cinerea* chez *A. thaliana*, nous nous sommes demandé si le HAA-C10:10, qui est un dimère de 3-OH-C10:0, présente la même capacité. Pour cela, un test de protection sur plants d'*A. thaliana* cultivés en hydroponie, similaire à ceux décrits précédemment, a été réalisé. D'après la Figure C1-9, les plantes WT traitées au niveau racinaire avec du HAA-C10:10 montrent une réduction significative (de l'ordre de 40%) de la surface de nécroses par rapport au contrôle. Cette résistance accrue est en revanche perdue dans le mutant *lore-5*. La perception du HAA-C10:10 au niveau racinaire conduit donc à la mise en place d'une ISR tout aussi efficace contre l'infection foliaire par *B. cinerea* que l'ISR induite par le 3-OH-C10:0.

L'application de HAA sur la racine de plantules d'*A. thaliana* se traduit 24h plus tard par la mise en place de dépôts de callose sur l'épiderme de la zone d'élongation de la racine d'une manière similaire à ce que nous avons observé en réponse à un traitement avec le 3-OH-C10:0 (Figure C1-10). Par ailleurs, à concentration équivalente, les dépôts de callose induits par le HAA-C10:10 sont moins importants que ceux induits par le 3-OH-C10:0. Enfin, cette induction de dépôts de callose est perdue dans le mutant *lore-5*, ce qui confirme que la perception du HAA-C10:10 passe par le récepteur LORE.

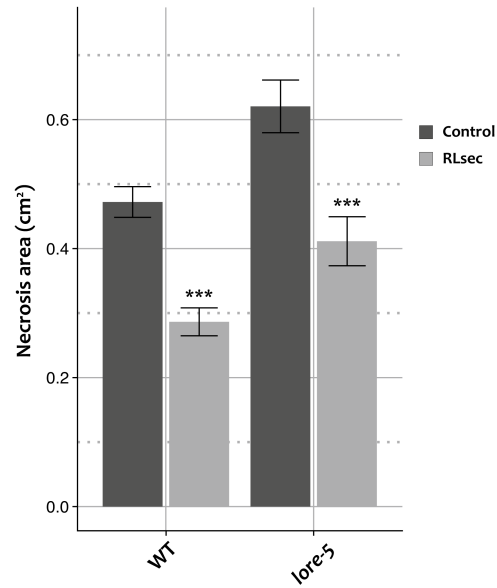
VII- Conclusion

Les expériences menées au cours de ce travail ont permis de montrer que les racines d'*A. thaliana* sont capable de percevoir le 3-OH-C10:0 jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1 nM. Ensuite, bien que nous n'ayons pas observé d'induction du gène *AtMYB72* dans les racines de plantes traitées au 3-OH-C10:0, il semble que ce gène soit impliqué dans l'ISR induite par le 3-OH-C10:0 contre *B. cinerea*. Étonnamment, nous ne sommes pas parvenus à identifier de gènes impliqués au niveau foliaire dans l'ISR déclenchée par le traitement racinaire au 3-OH-C10:0 ; aucun des gènes étudiés n'étant différentiellement exprimés dans les feuilles en réponse à cette molécule. L'approfondissement de l'étude du phénomène de priming mis en place suite au traitement racinaire au 3-OH-C10:0 est une piste intéressante pour comprendre les mécanismes conduisant à l'induction de la résistance de la plante contre *B. cinerea*. Enfin, de manière cohérente avec les résultats obtenus récemment au laboratoire, nous avons pu mettre en évidence que le HAA-C10:10, qui est un dimère de 3-OH-C10:0, est perçu au niveau racinaire par le récepteur LORE. La perception racinaire de cette molécule par LORE se traduit par l'apposition de callose sur l'épiderme de la zone d'élongation de la racine et par une ISR effective chez *A. thaliana* contre *B. cinerea*.

Chapitre 2 – Perception racinaire des rhamnolipides et induction d'une ISR



A



B

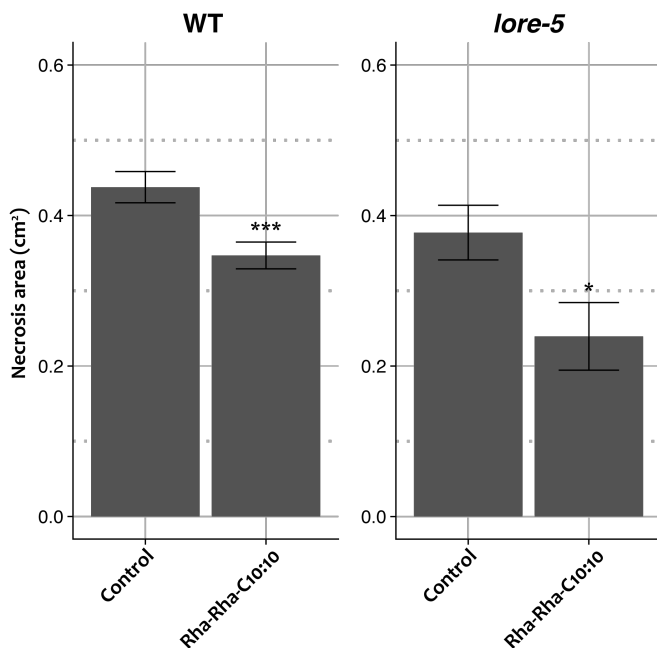
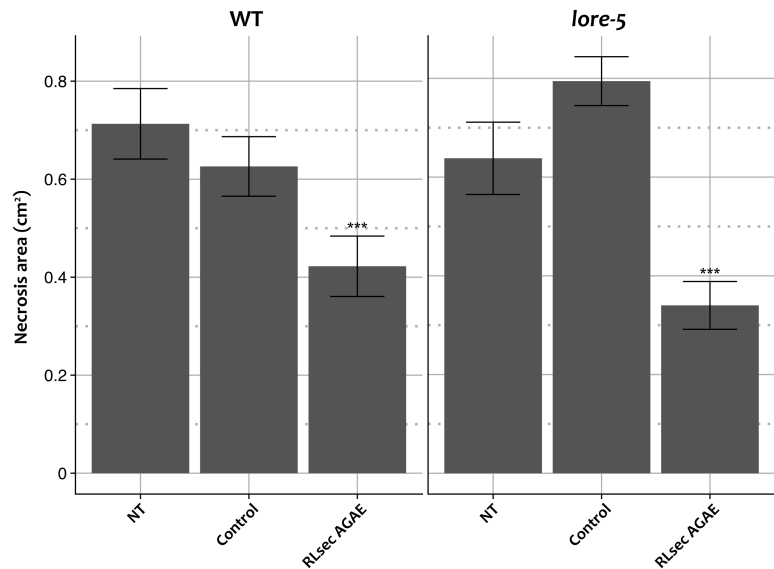


Figure C2-2 : Le Di-RL induit chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea*.

Des arabettes WT ou *lore-5* cultivées en hydroponie ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH 0.01% ou Rha-Rha-C10:10 à 1 μ M 48h avant inoculation des feuilles avec *B. cinerea*. La surface des nécroses a été mesurée 3 jours après inoculation. Pour WT, les données représentent la moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques indépendants. Pour *lore-5* les données représentent la moyenne $\pm$ SE d'une répétition représentative ; cette expérience a été réalisée deux fois avec des résultats similaires. Les astérisques indiquent les différences significatives (***) : $p < 0.05$ et * : $p < 0.1$) déterminées par un test statistique par paire de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Contexte

Au chapitre précédent, nous avons mis en évidence que le 3-OH-C10:0, constituant de base des RLs, active sur les racines d'*A. thaliana* des événements de signalisation classiquement liés à l'immunité. Un traitement racinaire des plantes avec cette molécule se traduit aussi au niveau foliaire par un niveau de résistance accru contre *B. cinerea* au travers d'une réaction d'ISR. Tant la réponse immunitaire racinaire au 3-OH-C10:0 que l'ISR induite par cette molécule contre *B. cinerea*, sont sous la dépendance du RLK LORE. En utilisant un sécrétome de *P. aeruginosa* enrichi en RLs (RLsec), nous avons montré que celui-ci induit une ISR LORE-indépendante contre *B. cinerea* aussi bien sur des plantes cultivées en hydroponie (Figure C2-1A) que sur des plantes cultivées sur terreau (Figure C2-1B). Les RLs n'étant pas perçus par le récepteur LORE (Kutschera et al., 2019) et ce sécrétome étant aussi, et surtout, composé de RLs (Annexe 2), nous avons voulu déterminer l'implication des RLs dans la mise en place de cette ISR.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés au Di-RL, Rha-Rha-C10:10, qui est le RL majoritaire sécrété par *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud et al., 2010), pour vérifier si cette molécule peut induire une ISR chez *A. thaliana* et activer des événements de signalisation de l'immunité.

Résultats

I- Le Di-RL active une ISR contre *B. cinerea*

À la différence du 3-OH-C10:0 et du HAA-C10:10, le Di-RL est perçu au niveau foliaire chez *A. thaliana* d'une manière LORE-indépendante. Cette molécule n'induit sur les feuilles ni la phosphorylation des MAPK ni l'influx calcique, ni la production précoce de ROS activés par le 3-OH-C10:0 et les HAAs. Le Di-RL induit en revanche, chez le WT comme chez *lore-5*, une protection locale à la fois contre *Pst* DC3000 et contre le champignon *B. cinerea*. Une production atypique, tardive, de ROS et des dépôts de callose induits par cette molécule sont également observés au niveau foliaire en réponse au Di-RL (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation).

Des tests de protection contre *B. cinerea* similaires à ceux décrits au chapitre 1 ont été réalisés avec le Di-RL. Des plants d'*A. thaliana* WT et *lore-5* cultivés en hydroponie sont traités avec du Di-RL. Nous observons qu'un traitement avec cette molécule induit une réduction significative de la surface de nécrose sur les plantes WT (Figure C2-2). Contrairement à l'ISR déclenchée par le 3-OH-C10:0, cette ISR induite par le Di-RL est conservée dans le mutant *lore-5* (Figure C2-2). Le Di-RL semble donc être perçu au niveau racinaire par un mécanisme indépendant de LORE, qui se traduit au niveau foliaire par un niveau de résistance contre *B. cinerea* augmenté.

II- Activation d'évènements de signalisation de l'immunité

Dans l'objectif de caractériser la réponse de la racine à cette molécule, nous avons ensuite suivi des événements de signalisation précoces généralement induits suite à la perception d'IPs. Nous avons ainsi suivi la production extracellulaire de ROS, la phosphorylation des MAPK, l'apposition épidermique de callose et l'augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire.

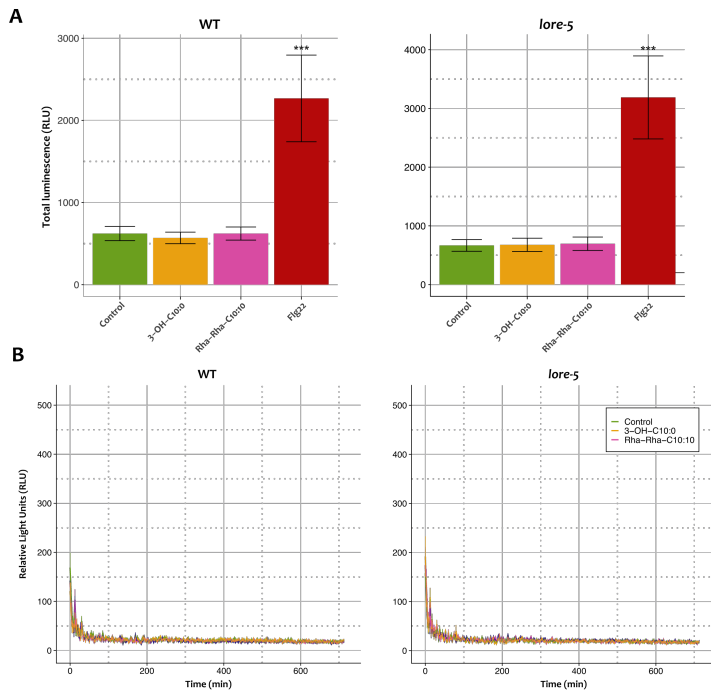


Figure C2-3 : Les RLs n'induisent pas de production de ROS sur les racines d'*A. thaliana*.

Mesure de la production extracellulaire de ROS après traitement des racines d'*A. thaliana* WT et *lore-5* avec EtOH 0.1% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 μ M, Rha-Rha-C10:10 à 10 μ M et Flg22 à 1 μ M (contrôle positif). **(A)** La production de ROS a été calculée en sommant les RLU (*Relative Light Units*) mesurés entre 4 et 40 minutes après le traitement. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques indépendants. Les astérisques indiquent les différences significatives (***) : $p < 0.05$ déterminées par un test statistique par paire de Wilcoxon-Mann-Whitney. **(B)** Mesure de la production de ROS pendant 12 heures après traitement des racines. Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques indépendants.

Figure C2-4 : Le RLsec active la phosphorylation LORE-dépendante des MAPK6 chez *A. thaliana*.

Détection de l'état de phosphorylation des MAPK6 et MAPK3 dans les racines d'*A. thaliana* WT et *lore-5*, 10 minutes après un traitement avec EtOH à 0.1% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 μ M ou RLsec à 10 μ M. L'actine (Actin) a été utilisée comme contrôle de charge. Cette expérience a été réalisée trois fois avec des résultats similaires.

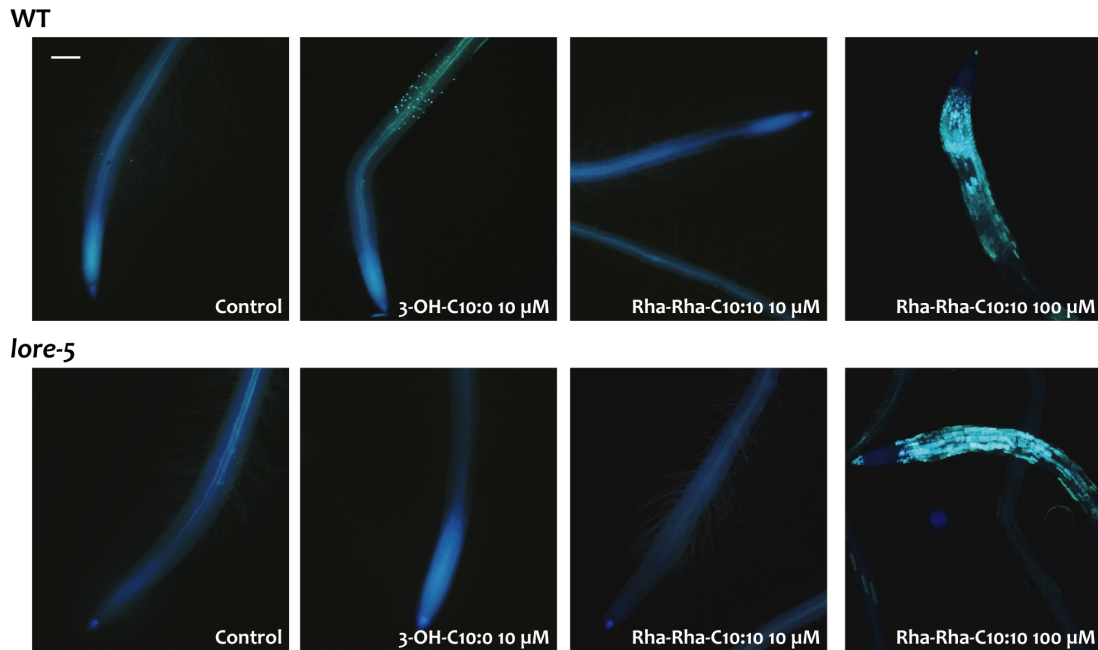
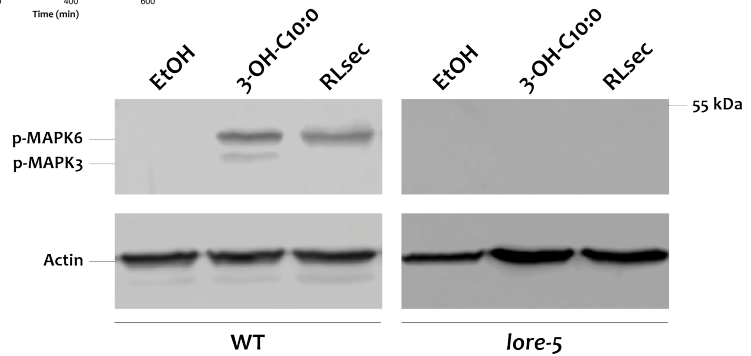


Figure C2-5 : Le Di-RL induit des dépôts de callose sur les racines d'*A. thaliana*.

Pour la détection des dépôts de callose, des arabettes WT et *lore-5* sont colorées au Bleu Aniline 24h après traitement avec EtOH à 0.1% (contrôle), Rha-Rha-C10:10 à 10 μ M et Rha-Rha-C10:10 à 100 μ M. Les dépôts de callose sont observés au microscope à épifluorescence avec un filtre UV. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois avec des résultats similaires. La barre d'échelle représente 100 μ m.

1) Production extracellulaire de ROS

Nous avons montré au chapitre 1 que le 3-OH-C10:0 ne semble pas induire de production précoce de ROS par les racines d'*A. thaliana*. De la même manière nous avons testé le Di-RL dans les mêmes conditions. Nous avons mesuré la production de ROS pendant 40 minutes après traitement des racines avec 3-OH-C10:0, Di-RL et Flg22. Les racines produisent des ROS en réponse au peptide Flg22 mais aucune production de ROS par les racines traitées au 3-OH-C10:0 et au Di-RL n'a été détectée pendant la durée de mesure (Figure C2-3A).

Ces résultats sur le Di-RL sont en accord avec des résultats obtenus au laboratoire sur des pétioles d'*A. thaliana* traités avec cette molécule. En revanche il a été montré que les RLs induisent sur ces pétioles une production tardive de ROS qui commence généralement 4h après le traitement et qui atteint un maximum en 6h. Nous avons donc prolongé l'expérience sur les racines afin de pouvoir observer cette éventuelle production tardive de ROS en réponse au 3-OH-C10:0 et au Di-RL. Cependant, à la différence de ce qui est observé sur les feuilles (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation), sur les 12 heures de mesure, aucune production tardive de ROS n'est détectée sur les racines d'*A. thaliana* traitées avec ces deux molécules (Figure C2-3B).

2) Phosphorylation des MAPK

À la différence de la production de ROS qui n'est pas détectée dans les racines suite à un traitement au 3-OH-C10:0, nous avons mis en évidence que cette molécule active la phosphorylation des MAPK3 et MAPK6 au niveau racinaire. Le traitement des racines des arabettes WT avec le RLsec induit la phosphorylation des MAPK6 (Figure C2-4). Sur le mutant *lore-5*, le RLsec n'induit pas la phosphorylation des MAPK dans les racines. L'activation des MAPK par le RLsec semble alors LORE-dépendante et serait provoquée par les mc-3-OH-FAs et probablement les HAAs libres contenus dans le RLsec (Annexe 2). À la différence des MAPK6, les MAPK3 phosphorylées ne sont pas détectées dans les racines traitées au RLsec. Cette non-détection des MAPK3 phosphorylées peut probablement s'expliquer par une stimulation réduite des MAPK en raison des faibles concentrations de mc-3-OH-FAs et de HAAs contenus dans le RLsec. Ces résultats suggèrent que les RLs n'induisent pas l'activation de ces kinases dans les racines. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de tester si un traitement de racines au Di-RL induit la phosphorylation des MAPK au niveau racinaire en raison des stocks limités de cette molécules purifiée lors de la réalisation de ces expérimentations.

3) Dépôts racinaires de callose

Le 3-OH-C10:0 induisant des dépôts de callose sur l'épiderme de la zone d'élongation des racines d'*A. thaliana* WT, nous avons voulu déterminer si le Di-RL présente la même propriété. Nous avons pour cela observé des racines d'*A. thaliana* WT et *lore-5* colorées au Bleu Aniline 24h après traitement avec cette molécule. La Figure C2-5 montre qu'aucun dépôt de callose n'est apposé sur l'épiderme des racines traitées avec 10 μ M de Di-RL. En revanche, une concentration de 100 μ M de Di-RL semble induire de forts dépôts de callose sur toute la surface de la zone d'élongation. Cette apposition de callose, LORE-indépendante, puisqu'elle s'observe aussi sur les racines des arabettes *lore-5*, est très différente de celle observée précédemment suite à l'application de 3-OH-C10:0 ou de HAA-C10:10 sur les racines. En effet, au lieu de dépôts très ponctuellement localisés, c'est une partie importante de la surface de la zone d'élongation qui est recouverte de ce polymère.

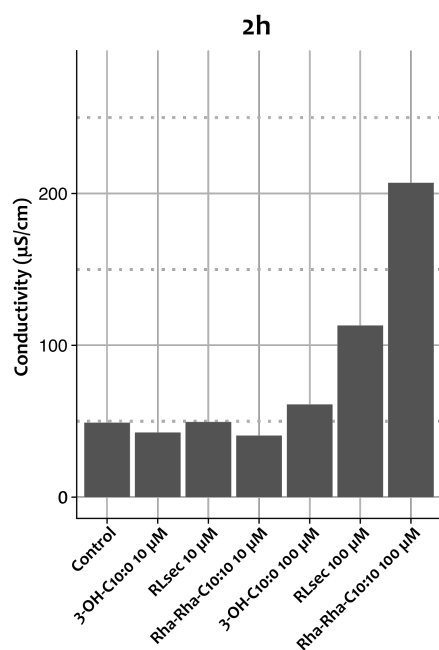


Figure C2-6 : Les RLs à forte concentration induisent une augmentation de la conductivité extracellulaire sur racines d'*A. thaliana*.

Mesure de la conductivité du milieu extracellulaire 0 et 2h après traitement des racines d'*A. thaliana* WT avec EtOH à 0.1%, 3-OH-C10:0 à 10 µM, 3-OH-C10:0 à 100 µM, RLsec à 10 µM, RLsec à 100 µM, Rha-Rha-C10:10 à 10 µM et Rha-Rha-C10:10 à 100 µM. Les résultats représentent la moyenne de deux réplicats techniques de l'augmentation de la conductivité du milieu par rapport au temps 0h.

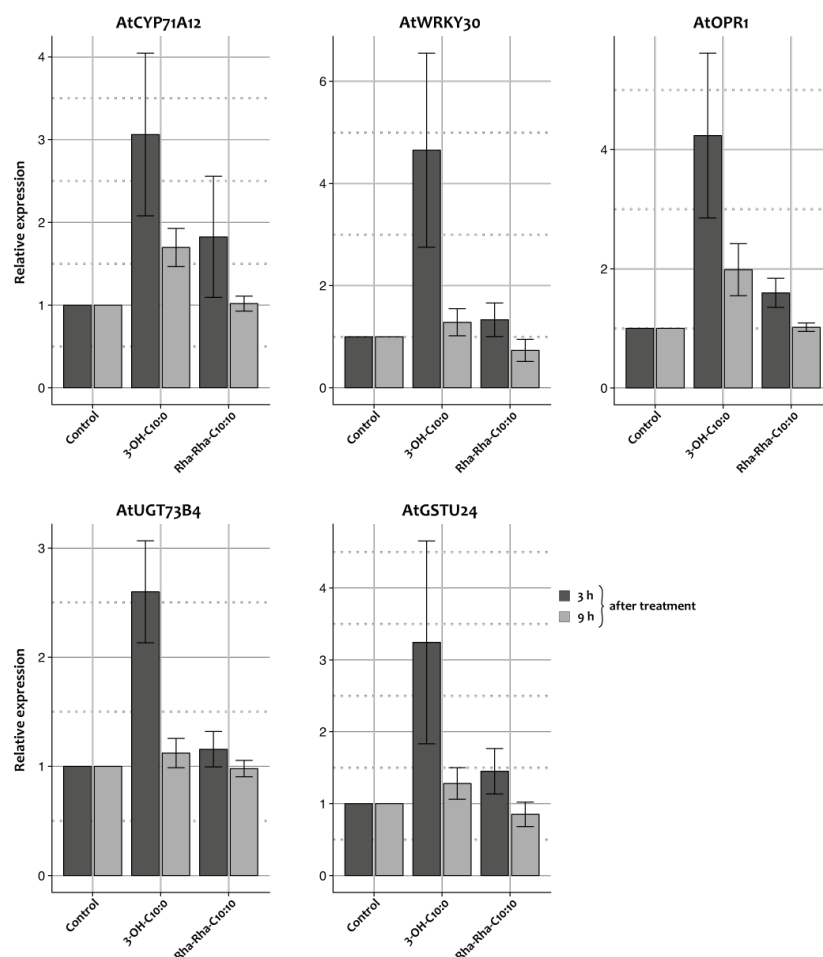


Figure C2-7 : Le Di-RL n'induit pas de modifications du transcriptôme des racines.

Des plants hydroponiques d'*A. thaliana* âgées de 4 semaines sont traitées au niveau racinaire avec 0.1% d'EtOH (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 µM ou Rha-Rha-C10:10 à 10 µM. 3 et 9h après le traitement, les racines sont prélevées et les ARNs extraits. L'accumulation des transcrits des gènes *AtCYP71A12*, *AtWRKY30*, *AtOPR1*, *AtUGT73B4* et *AtGSTU24* a été mesurée par qRT-PCR. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés par rapport aux niveaux d'expression des gènes de référence *AtUbiquitin5* et *AtActin* par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avant calcul de l'expression par rapport au contrôle correspondant au temps de prélèvement adéquat. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques indépendants.

4) Augmentation de la conductivité extracellulaire

L'augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire est un marqueur de changement de la perméabilité membranaire (Torres et al., 2005). Des résultats préliminaires présentés Figure C2-6 semblent indiquer que ni le 3-OH-C10:0, ni le RLsec ni le Di-RL à 10 μ M, n'induisent de flux ioniques sur les racines d'*A. thaliana* ; la conductivité du milieu extracellulaire des racines, 2h après ces traitements étant similaire à celle du contrôle.

Les dépôts de callose atypiques observés sur les racines traitées avec 100 μ M de Di-RL semblent indiquer une forte activation de défenses par cette concentration de Di-RL. Nous avons mesuré la conductivité extracellulaire sur des racines traitées avec cette concentration de 3-OH-C10:0, RLsec et de Di-RL. La Figure C2-6 montre que même à cette concentration le 3-OH-C10:0 n'induit pas de flux ioniques sur les racines. En revanche le RLsec et le Di-RL à 100 μ M induisent 2h après traitement une augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire (respectivement plus de deux fois par rapport au contrôle pour le RLsec et plus de 4 fois pour le Di-RL). Cette forte augmentation de la conductivité pourrait être liée à un phénomène de mort cellulaire. Il a par ailleurs déjà été mis en évidence que les RLs sont capables d'induire une mort cellulaire programmée (PCD) sur des cultures cellulaires de vigne (Varnier et al., 2009). Une coloration des racines au bleu Trypan pourrait permettre de mettre en évidence si cette augmentation de la conductivité est effectivement reliée à un processus de mort cellulaire et de localiser les zones tissulaires les plus sensibles à ces molécules.

III- Modifications du transcriptôme

Afin d'identifier des gènes impliqués dans la mise en place de l'ISR contre *B. cinerea* induite par le Di-RL, des échantillons d'ARN extraits de racines d'*A. thaliana* hydroponiques prélevées 0, 3 et 9h après traitement avec EtOH (contrôle) et le Di-RL ont été soumis à la même analyse transcriptomique que celle décrite au chapitre 1 visant à identifier des gènes impliqués dans la réponse racinaire au 3-OH-C10:0. Contrairement à ce que nous avons vu au chapitre précédent, cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence de gène différentiellement exprimé par le traitement au Di-RL. La sensibilité de la technologie RNAseq étant inférieure à celle de la qRT-PCR, nous avons donc suivi l'expression de gènes identifiés dans le cas du traitement au 3-OH-C10:0 dans ces échantillons.

Nous pouvons voir sur la Figure C2-7 que l'expression des gènes *AtCYP71A12*, *AtWRKY30*, *AtOPR1*, *AtUGT73B4* et *AtGSTU24*, que nous avons identifiés comme étant surexprimés dans les racines 3h après un traitement au 3-OH-C10:0, n'est pas altérée par le traitement au Di-RL ni 3 ni 9h après le traitement.

IV- Implications de voies de signalisations hormonales, de PAD3 et de MYB72 dans l'ISR induite par le Di-RL

Afin de déterminer le rôle du SA et du JA dans l'ISR contre *B. cinerea* induite par le Di-RL, des tests de protection similaires à ceux décrits précédemment ont été réalisés sur les lignées mutantes affectées dans ces voies de signalisation hormonales déjà utilisées au chapitre 1. Les plantes *sid2-2* sont affectées dans la synthèse du SA (Nawrath and Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001), les

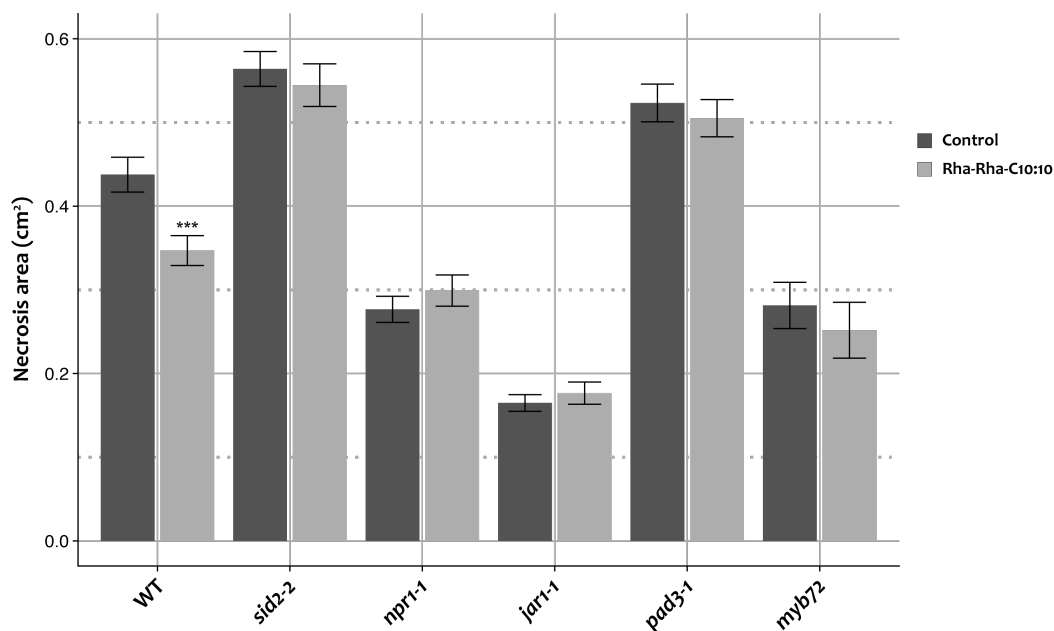


Figure C2-8 : L'ISR induite par le Di-RL est dépendante des voies de signalisation du SA et du JA et des gènes PAD3 et MYB72.

Des arabettes hydroponiques WT, *sid2-2*, *npr1-1*, *jar1-1*, *pad3-1* et *myb72* ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH 0.01% (contrôle) ou Rha-Rha-C10:10 à 1 μ M 48h avant inoculation des feuilles avec *B. cinerea*. La surface des nécroses a été mesurée 3 jours après inoculation. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques indépendants (sauf pour les mutants *jar1-1* et *myb72* pour lesquels l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois).

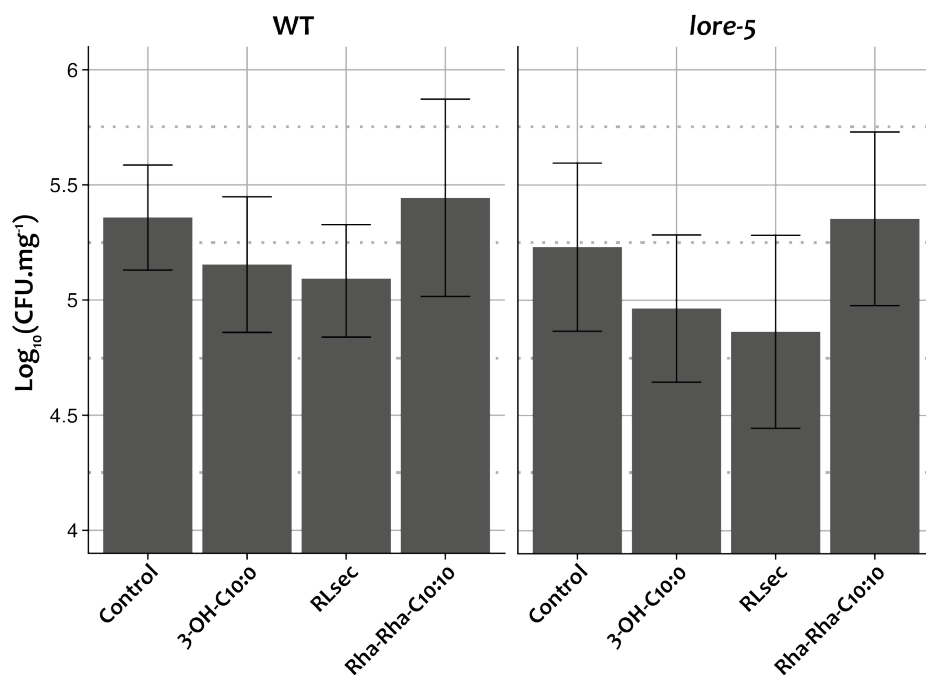


Figure C2-9 : Le 3-OH-C10:0, le RLsec et le Di-RL n'induisent pas d'ISR contre *Pst* DC3000.

Des arabettes WT et *lore-5* hydroponiques ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH 0.1% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 10 μ M, RLsec à 10 μ M et Rha-Rha-C10:10 à 10 μ M 48h avant inoculation des feuilles avec *Pst* DC3000. La colonisation des plantes par *Pst* DC3000 a été mesurée trois jours après inoculation. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de trois réplicats biologiques indépendants.

mutants *npr1-1* sont insensibles au SA (Cao et al., 1994) et les mutants *jar1-1* sont insensibles au JA (Staswick et al., 2002).

Ces plantes hydroponiques ont été traitées au niveau racinaire avec EtOH (contrôle) ou Di-RL. La Figure C2-8 montre qu'aucune réduction de la surface de nécrose n'est induite par le traitement au Di-RL sur ces lignées mutantes, à la différence du WT. La résistance accrue à *B. cinerea* induite par le Di-RL chez le WT n'est pas conservée dans les mutants *sid2-2*, *jar1-1* et *npr1-1* suggérant une participation du SA et du JA dans cette résistance induite. De même, des tests de protection ont été réalisés sur les lignées mutantes *pad3-1*, affectée dans la production de camalexine, et *myb72*, requis chez *A. thaliana* pour la mise en place d'une ISR par l'inoculation des racines avec *P. simiae* WSC417r. Aucune différence de taille de nécroses n'est observée entre les plantes traitées avec le Di-RL et les plantes contrôles pour ces deux lignées (Figure C2-8). Ces résultats sur les lignées d'*A. thaliana* mutantes indiquent que l'ISR induite par le traitement racinaire au Di-RL est dépendante des voies de signalisation du SA et du JA et requiert le gène *AtPAD3* impliqué dans la synthèse de la camalexine et le gène codant pour le facteur de transcription *AtMYB72* montré comme étant impliqué dans la mise en place d'une ISR par des bactéries PGPR (Van der Ent et al., 2008).

V- Induction d'une ISR contre *Pst* DC3000 ?

Les RLs ont précédemment été mis en évidence pour leur capacité à induire chez *A. thaliana* une protection locale au niveau foliaire contre des agents pathogènes à régimes trophiques différents, notamment contre *B. cinerea* mais aussi contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000 (Sanchez et al., 2012). Afin de vérifier si ces molécules, ainsi que le 3-OH-C10:0, induisent une ISR contre un agent pathogène hémibiotrophe, nous avons réalisé des tests de protection contre la bactérie *Pst* DC3000, après traitements racinaires avec ces IPs.

D'après la Figure C2-9 aucune des molécules testées (3-OH-C10:0, RLsec et Di-RL) n'induisent de réduction significative de la quantité de bactéries dans les plantes WT et *lore-5* cultivées en hydroponie. De même, sur les arabettes cultivées sur terreau, ni les traitements uniques (Figure C2-10A), ni les traitements multiples avec ces molécules (Figure C2-10B) n'induisent de réduction de l'infection des plantes par les bactéries. Le 3-OH-C10:0 et les RLs n'induisent donc pas d'ISR chez *A. thaliana* contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000.

VI- Tests de protection sur tomates contre *B. cinerea*

Les RLs présentent la capacité d'induire des réponses de défense et d'augmenter la résistance de plusieurs espèces végétales contre des agents pathogènes. Ils induisent la résistance locale d'*A. thaliana* et de *B. napus*, deux plantes de la famille des Brassicacées, mais aussi de la vigne (*V. vinifera*) contre *B. cinerea* (Monnier et al., 2018; Sanchez et al., 2012; Varnier et al., 2009). Comme nous l'avons montré, les RLs induisent également une résistance systémique contre cet agent pathogène.

La tomate est une plante d'intérêt agronomique majeur largement cultivée en cultures hors sol sur substrat inerte ou en sol sous tunnel. Ces systèmes de culture présentent de nombreux avantages par rapport à une culture au champ ; amélioration du rendement, gain de précocité, économies d'eau et de fertilisants (Blancard, 2017). En revanche, en raison des conditions de cultures, chaudes et humides, des agents pathogènes peuvent s'y développer rapidement en cas de contamination. Le champignon *B. cinerea* est un agent pathogène de la tomate largement répandu

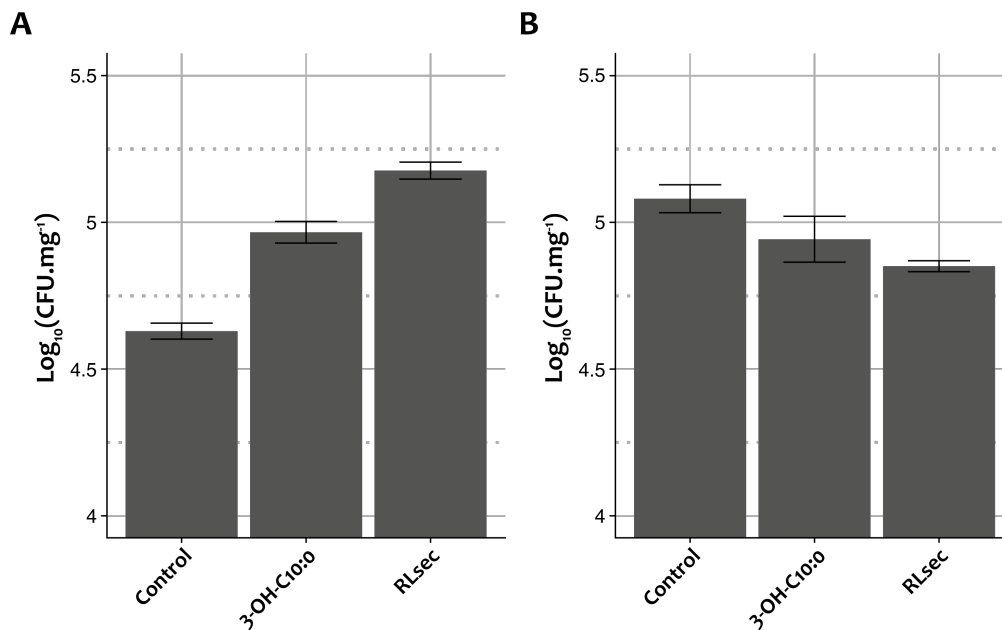


Figure C2-10 : Le 3-OH-C10:0 et les RLs n'induisent pas d'ISR contre *Pst* DC3000 sur des plants d'*A. thaliana* cultivés sur terreau.

Des arabettes WT cultivées sur terreau ont été traitées au niveau racinaire par arrosage avec EtOH 0.2% (contrôle), 3-OH-C10:0 à 20 μ M et RLsec à 200 μ M 48h (A) ou tous les deux jours pendant deux semaines (8 traitements au total) (B) avant inoculation des feuilles avec *Pst* DC3000. La colonisation des plantes par *Pst* DC3000 a été mesurée trois jours après inoculation. Les données représentent la moyenne $\pm$ SE de deux réplicats biologiques indépendants.

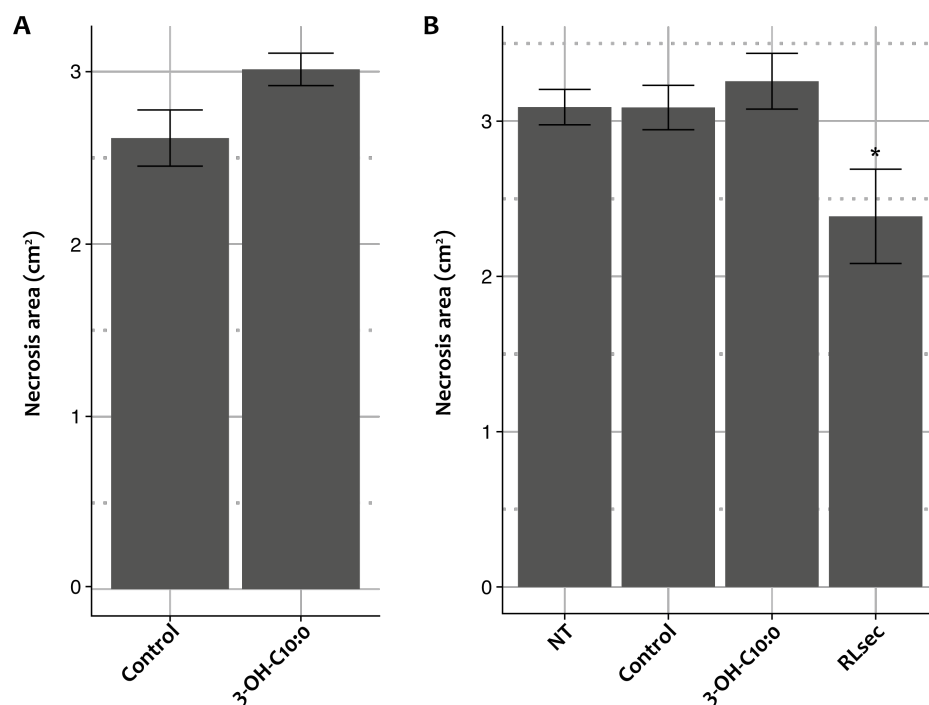


Figure C2-11 : Les RLs induisent chez la tomate une ISR contre *B. cinerea*, ce qui n'est pas le cas du 3-OH-C10:0.

A : Test de protection contre *B. cinerea* sur tomates hydroponiques. Des tomates cultivées en hydroponie sont traitées avec EtOH (contrôle, concentration finale de 0.01%) ou 3-OH-C10:0 (concentration finale de 10 μ M). **B** : Test de protection contre *B. cinerea* sur tomates cultivées sur terreau. Les tomates sont traitées pendant 12 jours par arrosage tous les deux jours avec une solution d'élicitation : NT (contrôle non traité), EtOH 0.02% (contrôle), 3-OH-C10:0 20 μ M et RLsec à 200 μ M. Deux semaines après le traitement, les feuilles sont détachées et les folioles disposées dans une boîte de Petri carrée sur du papier Whatman humide (Figure Mm-1B) avant inoculation avec *B. cinerea*. Les données représentées sont la moyenne $\pm$ SE d'une répétition représentative de deux réplicats biologiques indépendants. L'astérisque indique les différences significatives ($p < 0.1$) déterminées par un test statistique par paire de Wilcoxon-Mann-Whitney.

dans le monde. Il occasionne des dégâts ponctuellement importants aussi bien en champs qu'en culture hors sol. Ce champignon forme des nécroses sur les feuilles et des chancres sur les tiges, qui sont à l'origine du dépérissement des parties aériennes de nombreuses plantes (Blancard, 2017). Il est aussi responsable de pourritures sur fruits, dommageables à la fois en cours de culture et après la récolte (stockage, transport...). *B. cinerea* est particulièrement problématique en culture hors sol ou sous abri en raison du taux d'humidité relativement important dans les serres ou les tunnels de production mais aussi en raison de la longue durée de culture (parfois une année complète), durant laquelle les plantes subissent de nombreuses blessures d'effeuillage, d'ébourgeonnage, propices à l'installation de ce champignon (Blancard, 2017).

Dans ce contexte, la recherche de composés stimulateurs des défenses des plantes pouvant être appliqués au niveau racinaire, dans la solution de fertirrigation par exemple, pourrait permettre de contrôler le risque pour les rendements occasionné par la contamination de ces cultures sensibles par des agents pathogènes.

Sur *A. thaliana*, le 3-OH-C10:0 active une ISR contre *B. cinerea*. Cette ISR est en revanche sous la dépendance du RLK LORE. Bien que le RLK LORE appartienne à un sous-groupe de récepteurs membranaires RLKs à S-domain, largement répandus dans le règne végétal (Xing et al., 2013), Ranf et al. (2015) a mis en évidence que ce récepteur est restreint à la famille des Brassicacées (Ranf et al., 2015). Cependant, il est possible, comme c'est le cas pour de nombreux autres RLK responsables de la perception d'IPs, que des équivalents, des « LORE-Like », existent chez la tomate. Pour déterminer si le 3-OH-C10:0 peut induire chez la tomate, comme chez *A. thaliana*, une ISR contre *B. cinerea*, des plants de tomate cultivés sur terreau ont été traités par arrosage avec une solution d'élicitation de 3-OH-C10:0 pendant 12 jours. De même, des plants de tomates cultivés en hydroponie ont été traités avec du 3-OH-C10:0 pendant deux semaines par ajout de l'éliciteur à la solution de culture. Ces tests de protection sur tomates cultivées en hydroponie (Figure C2-11A) ou sur terreau (Figure C2-11B) montrent que le 3-OH-C10:0 ne stimule pas la résistance de la plante contre *B. cinerea*. Cette molécule ne semble donc pas avoir sur la tomate la capacité inductrice d'ISR active contre *B. cinerea* observée chez *A. thaliana*, probablement par l'absence de récepteur équivalent de LORE chez cette plante.

À la différence du 3-OH-C10:0, les RLs activent chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea* n'impliquant pas le récepteur LORE. Nous avons ainsi voulu déterminer si les RLs sont actifs sur la tomate pour induire une ISR contre *B. cinerea*. Pour cela, des plants de tomates cultivés sur terreau ont été traités par arrosage avec une solution d'élicitation de RLsec pendant 12 jours. Les tests de protection réalisés, mettent en évidence que les traitements racinaires avec le RLsec augmentent la capacité de la plante à résister au niveau foliaire contre le champignon. On observe en effet une réduction de 23% de la surface des nécroses sur les feuilles des plantes traitées avec le RLsec par rapport aux plantes contrôles non traitées (Figure C2-11B). Ce résultat montre que les RLs sont perçus chez la tomate comme chez *A. thaliana* au niveau racinaire *via* un mécanisme LORE-indépendant et induisent une ISR contre *B. cinerea*.

Discussion

Dans cette étude nous avons vu qu'un traitement racinaire d'arabettes avec le RLsec se traduit par une ISR effective contre *B. cinerea*. Ce RLsec induit aussi la phosphorylation des MAPK dans les racines d'*A. thaliana* WT. À la différence du 3-OH-C10:0 et du HAA-C10:10, l'ISR induite par le RLsec n'est pas perdue dans le mutant *lore-5*. Le sécrétome de RLs contient du 3-OH-C10:0 et du HAA-C10:10 en quantités suffisantes pour induire une réponse de défense, comme la phosphorylation des MAPK, et probablement une partie de l'ISR observée (Annexe 2). En revanche, ces molécules ne peuvent expliquer l'ISR observée dans le mutant *lore-5* par le traitement racinaire au RLsec, ce mutant étant incapable de percevoir tant les mc-3-OH-FAs (Kutschera et al., 2019) que les HAAs (Schellenberger *et al.* manuscrit en préparation). Les RLs eux-mêmes semblent donc capables d'induire chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea*. Effectivement, nous avons montré que des plantes traitées au niveau racinaire avec du Di-RL montrent un degré de résistance à *B. cinerea* amélioré. Cette « protection » de la plante contre le champignon est conservée dans le mutant *lore-5* suggérant l'implication d'un autre mécanisme dans la perception du Di-RL, ne faisant pas intervenir le récepteur LORE.

Afin de mieux comprendre le processus impliqué dans la mise en place de l'ISR par le Di-RL, nous avons suivi des marqueurs de l'immunité activés par cette molécule au niveau foliaire et/ou que nous avons vu au chapitre 1 comme étant activés dans les racines par le 3-OH-C10:0. Comme pour le 3-OH-C10:0, nous n'avons pas mis en évidence de production extracellulaire précoce de ROS au niveau racinaire en réponse aux RLs. Dans les feuilles, un traitement aux RLs n'induit pas non plus de production précoce de ROS mais une production tardive a été mise en évidence (Schellenberger *et al.*, manuscrit en préparation). Une production biphasique de ROS (un premier pic précoce puis un second plus tardif) a aussi été mise en évidence sur des tissus foliaires d'*A. thaliana* suite à un traitement avec des LPS ou du Lipide A (Shang-Guan et al., 2018). À la différence du premier pic de ROS, LORE-dépendant et caractéristique de la perception des mc-3-OH-FAs (Kutschera et al., 2019), le second pic, en partie indépendant du récepteur LORE, semble provoqué par les chloroplastes (Shang-Guan et al., 2018). Ici, la production tardive de ROS, pourtant induite au niveau foliaire par les RLs, n'a cependant pas été détectée sur des racines traitées avec ces molécules. Cette absence de détection de production de ROS dans les racines traitées aux RLs peut peut-être s'expliquer par l'absence de chloroplastes dans les racines. Cependant, il a été montré au laboratoire que le pic tardif de ROS induit dans les feuilles par les RLs est dépendant de la NADPH oxydase RBOHD et ne serait donc pas lié aux chloroplastes. Une production trop faible ou trop localisée de ROS sur une zone précise de la racine pourrait alors expliquer la non-détection de cette production par l'appareil de mesure. Contrairement au 3-OH-C10:0, les MAPK ne semblent pas être activées dans les racines en réponse aux RLs. Aussi, aucun des gènes identifiés au chapitre précédent comme étant induits au niveau racinaire par le 3-OH-C10:0 ne sont exprimés dans les racines en réponse au Di-RL. Nous n'observons pas non plus les dépôts de callose caractéristiques de la perception d'un IP par la racine disposés au niveau de la zone d'élongation comme c'est le cas suite au traitement au 3-OH-C10:0 ou au HAA-C10:10. Enfin, ni le 3-OH-C10:0 ni les RLs n'induisent d'augmentation de la conductivité extracellulaire, évènement caractéristique d'une altération de la perméabilité membranaire. Finalement, la réalisation de tests de protection sur des lignées d'*A. thaliana* mutantes a permis de

mettre en évidence que l'ISR induite par les RLs implique les mêmes voies de signalisation hormonales du SA et du JA que l'ISR induite par le 3-OH-C10:0. De même, les gènes *AtPAD3* et *AtMYB72*, impliqués dans l'induction de l'ISR par le 3-OH-C10:0 sont également impliqués dans la réponse au Di-RL. Alors que les RLs induisent une ISR sur *A. thaliana* similaire à celle induite par le 3-OH-C10:0 aucun des marqueurs de l'immunité par cette molécule au niveau racinaire, ne sont induits par les RLs.

Cependant, à la forte concentration de 100 μ M, le Di-RL induit des dépôts de callose très importants, diffus, qui recouvrent toute la surface de la zone d'élongation de manière indépendante du récepteur LORE. Ces dépôts « atypiques » de callose rappellent ceux mis en évidence sur les racines d'*A. thaliana*, de l'oignon (*Allium cepa*) et du maïs en réponse à des traitements avec des métaux lourds (Eleftheriou et al., 2015, 2012; Jones et al., 2006). Le chrome hexavalent (métal lourd, abondant dans la nature, toxique pour les organismes vivants) induit ainsi des dépôts de callose importants, diffus, en particulier sur la zone d'élongation de racines d'*A. cepa* et d'*A. thaliana* (Eleftheriou et al., 2015, 2012). Chez *A. thaliana*, ces dépôts diffus de callose sont colocalisés avec des zones colorées au Bleu d'Evans qui met en évidence une importante mort cellulaire induite par le traitement au chrome dans la zone d'élongation (Eleftheriou et al., 2015). À 100 μ M, le Di-RL induit également une fuite d'ions sur la racine, qui peut être caractéristique de l'induction d'une mort cellulaire (Torres et al., 2005). À forte concentration le Di-RL semble donc perçu comme un stress par la plante qui met en place des stratégies de défense similaires à une réponse à des métaux lourds. Les RLs étant capables d'induire une PCD sur des cultures cellulaires de vigne (Varnier et al., 2009), il est possible qu'à forte concentration ces molécules induisent aussi ce mécanisme sur les cellules racinaires d'*A. thaliana*, conduisant à l'augmentation de la conductivité extracellulaire observée. Une coloration des racines au Bleu d'Evans ou au bleu Trypan pourrait permettre de mettre en évidence et de localiser l'induction de mort cellulaire par cette molécule sur les racines d'*A. thaliana*.

Des IPs amphiphiles sont connus pour leur capacité à interagir avec des membranes lipidiques. C'est le cas des LPs surfactine et fengycine, capables d'induire une ISR contre *B. cinerea* chez la tomate et le haricot (Ongena and Jacques, 2008). Il a été mis en évidence que la surfactine a la capacité de s'insérer dans les membranes lipidique et de les perturber formant des pores (Henry et al., 2011). Toutefois, à faible concentration, ces perturbations ne sont pas suffisantes pour endommager les membranes et provoquer la mort cellulaire (Henry et al., 2011). Récemment, des RLs synthétiques ont également été montrés pour leur capacité à interagir avec des membranes biomimétiques (Luzuriaga-Loaiza et al., 2018; Nasir et al., 2017). En particulier, les SRBs interagissent avec des membranes lipidiques et provoquent une augmentation de la perméabilité membranaire (Luzuriaga-Loaiza et al., 2018). Comme dans le cas de la surfactine, ces dommages causés aux membranes par les SRBs semblent faible étant donné qu'ils ne sont pas associés, au niveau foliaire, à des effets phytotoxiques même par une exposition prolongée à des concentrations élevées (Luzuriaga-Loaiza et al., 2018). En 2019, Monnier *et al.* ont montré que les RLs naturels peuvent aussi interagir et s'insérer dans des membranes biomimétiques (Monnier et al., 2019). Chez les plantes, leur impact sur la dynamique membranaire est faible, mais elle est bien plus importante chez les champignons, ce qui tend à expliquer l'effet antifongique de ces molécules. Ainsi, il semblerait que les RLs provoquent des altérations des membranes lipidiques. Chez les plantes, des dommages membranaires provoqués par ces molécules seraient susceptibles de

conduire à l'induction d'une réponse de défense. Au niveau racinaire, la zone d'élongation est une zone racinaire fragile étant donné que les cellules, en cours de division et d'élongation, ne possèdent pas encore la paroi imperméable et protectrice caractérisant les zones plus âgées de la racine. Il est donc probable que l'effet des RLs soit plus important sur cette zone racinaire. À faible concentration, les dommages causés aux racines par les RLs seraient très faibles voire réversibles ou n'impliquent que des modifications des propriétés de la membrane comme une altération de la fluidité membranaire. Ces modifications, difficilement mesurables, seraient perçues par les cellules et conduiraient ainsi à la mise en place de l'ISR observée contre *B. cinerea*. En revanche à des concentrations plus élevées, l'altération de la membrane est bien plus importante et conduit à des fuites ioniques (probablement représentatives de l'induction de mort cellulaire) et à l'apposition importante de callose pour imperméabiliser les zones fragiles de la racine.

Finalement, nous avons mis en évidence qu'un sécrétome de RLs est efficace pour induire une ISR contre *B. cinerea* sur une plante d'intérêt agronomique, la tomate. Le 3-OH-C10:0 ne présentant pas cette capacité sur cette plante, la réduction de la sévérité de la maladie observée suite au traitement des tomates avec les RLs semble faire intervenir un mécanisme LORE-indépendant. Dans le cas des LPS, il a déjà été montré que ces molécules peuvent être perçues par des plantes n'appartenant pas à la famille des Brassicacées et qui, au même titre que la tomate, sont dépourvues du récepteur LORE. La tomate, mais aussi le tabac et le riz sont ainsi capables de générer une production tardive de ROS en réponse à ces molécules (Shang-Guan et al., 2018). D'une manière similaire, il a été mis en évidence au laboratoire que les Mono-RLs ont la capacité d'induire une production tardive de ROS chez plusieurs dicotylédones, la tomate, le tabac et le colza (Schellenberger *et al.* manuscrit en préparation).

Ainsi il semblerait que les RLs induisent chez la tomate, comme chez *A. thaliana*, un mécanisme LORE-indépendant, qui se traduirait notamment au niveau foliaire par une production tardive de ROS, et qui conduit, suite à un traitement racinaire, à la mise en place d'une ISR diminuant la sensibilité de la plante contre *B. cinerea*.

La concentration en RLs utilisée dans ces expériences pour le traitement par arrosage des plantes cultivées sur terreau est plus importante que dans le cas de cultures hydroponiques. À cette concentration, le RLsec induit une ISR contre *B. cinerea* sans pour autant altérer la survie de la plante comme cela semble être le cas sur des plantes cultivées en milieu liquide ou en hydroponie. En effet, il a été montré qu'une quantité non négligeable d'une solution de RLs à une concentration comprise en 0.4 μ M et 0.28 mM, est retenue dans le sol par un phénomène d'adsorption sur la matière organique et les argiles du sol (Soltani Dashtbozorg et al., 2016; Wen et al., 2010). Il est difficile d'estimer la quantité de RLs réellement disponible pour les plantes étant donné que de nombreux facteurs affectent ce phénomène d'adsorption ; le pH du sol, sa teneur en éléments minéraux, sa teneur en argiles et en matière organique... Ce paramètre devra néanmoins être pris en considération dans l'optique de développer une stratégie de protection des cultures de tomates par traitement racinaire avec ces mélanges de RLs.

Ces résultats sur la tomate méritent d'être approfondis, notamment en utilisant des RLs purifiés pour identifier quelles molécules sont responsables de l'ISR observée. Les sécrétomes de RLs présentent un potentiel intéressant pour la protection de cultures hors-sol de tomates. En raison de leur effet systémique sur les plantes, ces composés présentent l'intérêt, dans un contexte de culture

hors-sol ou sous abri, de pouvoir être appliqués au niveau racinaire directement dans la solution de fertirrigation. Cependant, bien que les RLs ne présentent pas les impacts environnementaux négatifs posés par les produits phytosanitaires « classiques » notamment par leur biodégradabilité, la réglementation française en vigueur « interdit l'apport de produits phytosanitaires par le réseau de fertirrigation » (Dulin, 2017). Dans le cadre du plan EcoPhyto II, et la levée des limites réglementaire à l'innovation de stratégies de protection des cultures plus respectueuses de l'environnement, le développement d'une solution de traitement des cultures de tomates avec ces molécules naturelles par le réseau de fertirrigation pourra ainsi être facilité.

Conclusion et Perspectives



Les plantes sont intensément exposées par leurs racines à des microorganismes telluriques. Certains sont pathogènes et d'autres, au contraire, sont bénéfiques pour la plante présentant la capacité d'antagoniser le développement d'agents pathogènes et/ou la capacité de stimuler les défenses de la plante. Comme les microorganismes pathogènes, les microorganismes bénéfiques portent des signatures moléculaires, des IPs, susceptibles d'être perçues par la plante conduisant à l'induction de réactions de défense. Ces microorganismes sécrètent aussi dans la rhizosphère de très nombreuses molécules. Certaines ont des propriétés antibiotiques et sont toxiques pour d'autres microorganismes, d'autres sont des hormones, permettant la stimulation de la croissance de la plante, et d'autres encore sont des molécules à propriétés surfactantes qui jouent un rôle important dans la colonisation de la surface racinaire par ces microorganismes. C'est le cas de certains LPs, comme la surfactine, et probablement aussi des rhamnolipides, produits par de nombreuses espèces bactériennes notamment du genre *Pseudomonas*. Parmi ces molécules surfactantes, il a été montré que des LPs issus de la bactérie PGPR *B. subtilis* peuvent induire une résistance systémique (ISR) à *B. cinerea* chez la tomate et le haricot (Ongena et al., 2007). D'autres exemples de LPs capables d'induire une ISR chez le riz ont récemment été rapportés (Omoboye et al., 2019). Comme les LPs, les RLs étant capables d'induire des réponses de défense sur des tissus foliaires, l'objectif de mon travail de thèse était de déterminer si ces molécules sont perçues par les racines de la plante modèle *A. thaliana* et si cette perception conduit à la mise en place d'une ISR contre *B. cinerea*.

La première partie de mon travail a consisté à étudier la réponse racinaire à un acide gras à chaîne moyenne (mc-3-OH-FAs), le 3-OH-C10:0. Cette molécule peut être vue comme un précurseur des RLs majoritaires de *P. aeruginosa*, ces derniers étant constitués, pour leur portion lipidique, d'un dimère de 3-OH-C10:0 (HAA). Les mc-3-OH-FAs, et en particulier le 3-OH-C10:0, sont perçus chez les Brassicacées par le RLK LORE (Kutschera et al., 2019). Le 3-OH-C10:0 étant le constituant de base de nombreuses molécules amphiphiles produites par des microorganismes telluriques stimulateurs de défense des plantes, nous avons voulu déterminer si cette molécule est perçue par les racines d'*A. thaliana* et si elle est impliquée dans la mise en place d'une ISR.

Nous avons ainsi montré que le 3-OH-C10:0 est perçu par les racines d'*A. thaliana*. Cette perception requiert le récepteur LORE et se traduit par l'induction localement au niveau racinaire d'une réponse immunitaire. Enfin, la perception racinaire du 3-OH-C10:0 *via* LORE conduit à la mise en place d'une ISR efficace contre *B. cinerea* mais inefficace contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000.

Cependant, bien que les RLs, comme d'autres IPs amphiphiles comprenant du 3-OH-C10:0 dans leurs portions lipidiques, soient naturellement sécrétés dans le milieu extracellulaire par les bactéries, la présence naturelle du 3-OH-C10:0, et des mc-3-OH-FAs, dans la rhizosphère reste incertaine. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette présence du 3-OH-C10:0 dans le milieu extracellulaire. Ainsi, dans le cas des LPS, l'enzyme PagL de *Pseudomonas* est impliquée dans la libération de 3-OH-C10:0 libres lors de la synthèse de Lipide A penta-acylés à partir de Lipide A hexa-acylés dans la membrane bactérienne externe (Ernst et al., 2006; Geurtsen et al., 2005). Des 3-OH-C10:0 libres peuvent aussi être produits par l'activité de thioestérases à partir d'*hydroxydecanoyl-acyl carrier protein* et de (R)-3-hydroxydecanoyl-CoA, des intermédiaires de synthèse du métabolisme des acides gras (Zheng et al., 2004). La lyse de cellules bactériennes ou l'exocytose de vésicules membranaires peut alors expliquer la libération de ces 3-OH-C10:0 libres.

En revanche, à la différence des 3-OH-C10:0, les HAAs sont eux naturellement sécrétés par les bactéries au même titre que les RLs et sont impliqués dans l'expansion de la colonie bactérienne (Tremblay et al., 2007). Dans ce travail, nous avons montré que les HAAs stimulent l'apposition de callose sur la racine d'*A. thaliana* et induisent une ISR contre *B. cinerea*. De manière similaire au 3-OH-C10:0, les événements induits par les HAAs sont dépendants du récepteur LORE. Ces résultats nous invitent à penser que les HAAs, qui sont un dimère de 3-OH-C10:0, agissent sur les racines d'*A. thaliana*, de la même manière que le 3-OH-C10:0. Ceci est d'ailleurs confirmé par de récents résultats obtenus au laboratoire caractérisant la réponse immunitaire induite par ces molécules chez *A. thaliana* au niveau foliaire.

Enfin, nous avons montré que des RLs purifiés sont également capables d'induire une ISR contre *B. cinerea*. Cette ISR est en revanche indépendante du récepteur LORE. Cependant, aucun des marqueurs de l'immunité, et des gènes, que nous avons observés comme traduisant la perception du 3-OH-C10:0 ou du HAA-C10:10 par les racines, ne semblent activés par le Di-RL. Les RLs seraient alors perçus par un mécanisme différent qui reste encore à identifier. Comme d'autres molécules amphiphiles, les RLs semblent capables de s'insérer dans les membranes biologiques et d'en altérer l'organisation (Monnier et al., 2019). Il est ainsi probable que l'ISR induite par le traitement racinaire aux RLs soit activée en réponse à la perception de l'insertion de ces molécules dans les membranes cellulaires. À forte concentration, l'insertion des RLs dans les membranes provoque probablement des dommages trop néfastes pour les cellules causant un stress trop important à la plante qui met en place une stratégie de défense similaire à une réponse à des métaux lourds.

Au cours de ce travail, nous avons comparé la réponse racinaire au 3-OH-C10:0 et au Di-RL à la réponse au peptide Flg22 qui est un IP très bien caractérisé et qui est connu pour induire l'immunité tant au niveau foliaire que racinaire (Chinchilla et al., 2007; Millet et al., 2010). Il est intéressant de rappeler que, malgré une induction forte de réactions racinaires de défense, incluant production extracellulaire de ROS, phosphorylation des MAPK, apposition de callose au rhizoderme et induction de l'expression de gènes, par Flg22, le traitement des racines avec cet IP ne conduit pas à la mise en place d'une ISR contre *B. cinerea*. En comparaison, le 3-OH-C10:0 ne semble pas induire de production de ROS, induit une plus faible activation des MAPK et apposition de callose au rhizoderme et une induction limitée de l'expression de certains gènes dans les racines. Quant au Di-RL, aucun des marqueurs cités ci-dessus ne semblent activés dans les racines en réponse à l'application de cette molécule. En revanche ces deux molécules induisent chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea*. Outre l'implication potentielle de mécanismes différents conduisant ou non à l'induction d'une ISR suite à la perception racinaire d'IPs, il semblerait possible qu'une induction forte de réactions racinaires de défense soit incompatible avec l'activation d'une ISR. Une activation forte de réponses immunitaires pourrait traduire l'attaque de la racine par un agent pathogène qui déclencherait alors localement une activation intense de mécanismes de défense permettant d'assurer sa protection contre cette attaque au détriment de l'activation d'une résistance systémique. Au contraire, une activation modérée de réponses immunitaires, par exemple lors de l'interaction de microorganismes bénéfiques avec la racine, pourrait laisser une chance à ce microorganisme de survivre pour assurer le maintien de l'interaction tout en induisant la mise en place d'une résistance systémique.

Dans cette étude nous avons aussi pu mettre en évidence que le 3-OH-C10:0 comme le peptide Flg22 n'induisent l'apposition de callose que sur l'épiderme de la zone d'élongation de la racine. Bien que nos propres tentatives de visualiser la zone racinaire responsable de la perception du 3-OH-C10:0 par l'utilisation de lignées transgéniques GUS aient échouées, il semble que la réponse racinaire aux IPs soit restreinte à la zone d'élongation (Millet et al., 2010; Poncini et al., 2017). À la différence de la zone méristématique et des zones matures de la racine (zone de différenciation et zone de ramification), la zone d'élongation est relativement peu protégée en raison de la différenciation incomplète de ses cellules épidermiques ce qui en fait un site d'infection privilégié par des agents pathogènes (Cannesan et al., 2011; Gunawardena and Hawes, 2002). Ces organismes pathogènes peuvent également exploiter des ouvertures naturelles dans l'épiderme de la racine pour y pénétrer, comme des fissures qui se forment à la surface de la racine lors de l'émergence des racines latérales. La protection de ces tissus vulnérables constitue donc un enjeu stratégique majeur pour permettre à la plante de se défendre contre ses attaquants. En outre, la racine est très fortement exposée à des microorganismes telluriques et à leurs IPs. Restreindre la stimulation des défenses immunitaires, qui présentent un coût énergétique conséquent (Hacquard et al., 2017), à des zones bien précises susceptibles d'être attaquées, permet de limiter les effets délétères sur la croissance provoqués par une sur-stimulation des défenses. Quant à la zone méristématique, nous avons vu dans l'introduction que la protection de cette zone racinaire fait notamment intervenir des cellules particulières, plus ou moins séparées de la coiffe, les cellules bordantes (BC ou BLC). Les BC sont en effet capables de percevoir des IPs et de générer des réponses immunitaires (Hawes et al., 2000). Les conditions de culture utilisées dans cette étude, en milieu liquide, sont incompatibles avec l'observation de ces cellules (Plancot et al., 2013). Il serait cependant intéressant de déterminer si les cellules bordantes peuvent percevoir le 3-OH-C10:0 et le Di-RL pour ainsi évaluer leur implication dans la réponse de la racine à ces molécules.

Les résultats présentés ici nous apprennent que les RLs et leurs précurseurs sont perçus suivant des mécanismes distincts par les racines d'*A. thaliana* et activent chez cette plante une ISR contre *B. cinerea*. Malgré tout, la caractérisation des mécanismes impliqués reste parcellaire. En particulier, il serait intéressant de réaliser une étude fonctionnelle en utilisant des lignées mutantes d'*A. thaliana* affectées dans l'expression des gènes identifiés par l'étude transcriptomique réalisée sur les racines après traitement au 3-OH-C10:0. Cette étude fonctionnelle permettrait alors de conclure quant à l'implication réelle de l'expression de ces gènes dans la mise en place de l'ISR par le traitement au 3-OH-C10:0.

Ensuite, il semble qu'une réduction de l'échelle d'étude soit nécessaire pour améliorer la caractérisation de la réponse racinaire à ces molécules. Dans un premier temps, des lignées transgéniques exprimant le gène rapporteur Vénus (codant pour une protéine fluorescente de type YFP) avec un signal NLS de localisation nucléaire sous la dépendance du promoteur de gènes marqueurs associés à la défense racinaire pourraient être utilisées (Poncini et al., 2017). L'expression nucléaire de ces constructions permettra de localiser à l'échelle cellulaire la réponse de la racine aux molécules testées et l'implication de divers gènes de défense dans ce processus. Aussi, une étude récente montre que l'ablation d'une seule et unique cellule sur l'épiderme de la racine provoque une brève dépolarisation de la membrane des cellules racinaires qui se propage le long de la racine dans le voisinage de la zone lésée et qui implique des canaux ioniques (Marhavý et al., 2019). Une étude

pharmacologique en appliquant au niveau racinaire des composés inhibant les canaux calciques, potassiques, chloriques permettrait de déterminer l'implication de ce phénomène dans la réponse racinaire et la mise en place de l'ISR par le 3-OH-C10:0 et les RLs. Enfin, divers stress, comme l'application d'un IP ou des blessures, sont connus pour générer des flux calciques se propageant le long de la racine (Choi et al., 2016; Steinhorst and Kudla, 2014). Des sondes fluorescentes encodées génétiquement peuvent être utilisées comme indicateurs de flux calciques. Les GECIs (*Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators*) sont des protéines fluorescentes associées à une structure liant l'ion Ca²⁺ et dont la fluorescence est augmentée suite à la fixation de cet ion. Les sondes RGECO sont ainsi constituées d'une protéine fluorescente (mApple qui fluoresce en rouge) transformée et fusionnée à une calmoduline (CaM) et à un peptide M13. En l'absence de Ca²⁺, la protéine transformée est faiblement fluorescente. En liant le calcium, le domaine CaM s'enroule autour du peptide M13 et provoque un changement de la conformation de la protéine qui restaure sa capacité à fluorescer (Keinath et al., 2015). Dans l'étude évoquée précédemment, des vagues d'influx calciques ont aussi été visualisées en réponse à l'ablation d'une cellule de l'épiderme racinaire (Marhavý et al., 2019). Il serait donc intéressant d'appliquer cette technique à notre étude pour peut-être mettre en évidence un flux calcique induit le long de la racine en réponse au 3-OH-C10:0 et aux RLs voir de mettre en évidence l'implication de ce flux dans la mise en place de l'ISR.

Il serait également intéressant d'approfondir l'étude du mécanisme de priming qui semble être induit au niveau foliaire suite à l'application racinaire du 3-OH-C10:0 et du Di-RL. Nous pourrions alors commencer par étudier l'apposition de callose et la production de ROS au niveau des feuilles lors de l'infection de plantes élicitées avec *B. cinerea*. Il a en effet déjà été montré que la bactérisation racinaire de plantes avec des bactéries PGPR peut augmenter la production de callose et d'H₂O₂ comme l'activation des MAPK, dans les feuilles en réponse à l'infection par un agent pathogène (Beckers et al., 2009; Miotto-Vilanova et al., 2016). Ensuite, une étude globale par transcriptomique sur les feuilles de plantes traitées au niveau des racines avec 3-OH-C10:0 ou Di-RL et inoculées ou non avec *B. cinerea*, pourrait permettre l'identification de gènes potentiellement impliqués dans l'expression de la résistance systémique à *B. cinerea* induite par ces molécules. Parallèlement à ces approches, et devant l'implication très probable de la camalexine dans l'ISR induite par ces molécules, des dosages de cette phytoalexine dans les feuilles de plantes élicitées pourraient permettre de confirmer l'implication de ce composé antimicrobien de défense dans le processus. Enfin, il pourrait être envisagé d'étudier l'implication de voies de signalisation hormonales supplémentaires (voie de l'ET, des auxines, des brassinostéroïdes...) dans la mise en place de l'ISR par le 3-OH-C10:0 et les RLs.

Finalement, nous avons mis en évidence que le 3-OH-C10:0 et le Di-RL sont impliqués dans la mise en place d'une ISR chez *A. thaliana*. Cependant, ces résultats n'apportent pas d'information quant à l'implication de ces molécules dans l'ISR induite par les bactéries PGPR les produisant. L'utilisation de souches mutantes de bactéries comme *P. fluorescens*, connues pour produire des RLs (Abdel-Mawgoud et al., 2010), affectées dans différentes étapes de synthèse des RLs pourrait ainsi permettre d'observer l'importance des HAAs, Mono-RLs et Di-RLs dans la capacité de ces bactéries à induire une ISR. Il serait aussi intéressant d'évaluer le degré d'exposition des racines à ces molécules dans des sols naturels et/ou dans des sols artificiels inoculés avec des bactéries PGPR productrices de RLs. Chez les mammifères, des RLs seraient produits à des concentrations variant entre 14 et 110 µM dans les voies respiratoires d'individus atteints de fibroses kystiques (la mucoviscidose est une

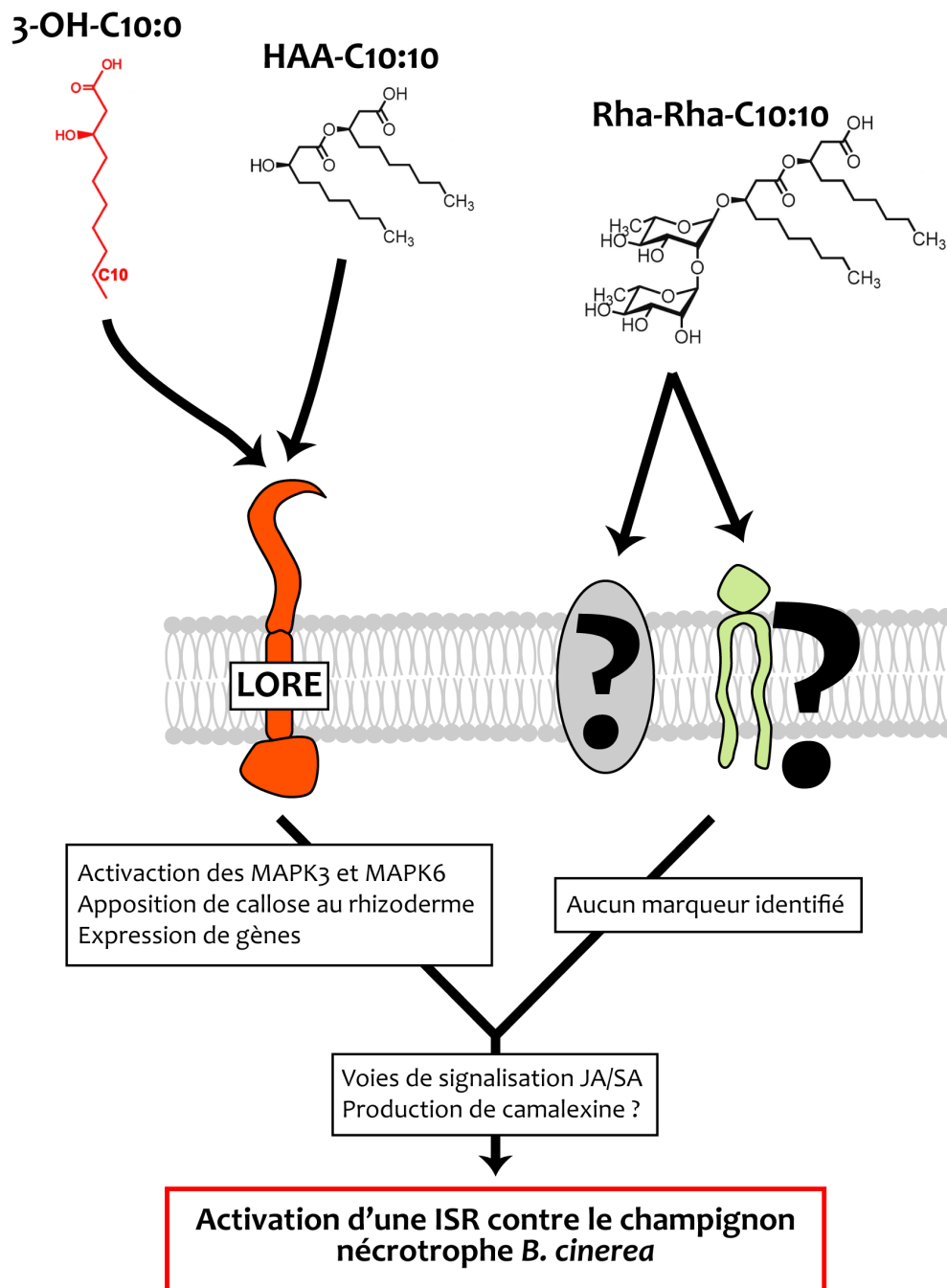


Figure CP-1 : Résumé des principaux résultats. Les RL et leurs constituants lipidiques, perçus selon deux mécanismes distincts, activent chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea*.

forme de fibrose kystique) infectés par *P. aeruginosa* (Kownatzki et al., 1987; Read et al., 1992; Somerville et al., 1992), mais à notre connaissance aucune information n'est à ce jour disponible sur les concentrations de RLs naturellement sécrétées dans le sol par des microorganismes telluriques. Cette étude permettrait aussi d'identifier les rôles de ces molécules dans la structuration du microbiome rhizosphérique. Enfin, *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2, une bactérie PGPR, a été mise en évidence au laboratoire pour sa capacité à induire chez la vigne une ISR contre *B. cinerea* (Gruau et al., 2015). À ce jour la production de RLs par cette bactérie n'a pas été mise en évidence. Cependant, des RLs étant produits par d'autres bactéries de l'espèce *P. fluorescens* il est très probable que cette souche en produise également. L'implication des RLs et de leurs précurseurs dans l'augmentation de la résistance à *B. cinerea* observée pourra ainsi être étudiée en utilisant des souches mutantes de cette bactérie affectées dans la synthèse de ces molécules.

Nous avons donc vu que le 3-OH-C10:0 et les RLs induisent une ISR chez *A. thaliana* contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*, impliquant les voies de signalisation hormonales du SA et du JA (Figure CP-1). Aussi, étant donné que l'ISR est perdue dans un mutant affecté dans la production de camalexine, il semble que la production de cette phytoalexine soit impliquée dans la mise en place de la résistance systémique à *B. cinerea*. Ces molécules n'induisent en revanche pas d'ISR contre la bactérie hémibiotrophe *Pst* DC3000.

Deux mécanismes distincts semblent être impliqués dans l'activation de l'ISR par ces molécules (Figure CP-1). Le 3-OH-C10:0 et les HAAs, constituants lipidiques des RLs, sont perçus par le RLK LORE. La perception de ces molécules *via* LORE conduit à l'activation au niveau racinaire de marqueurs de l'immunité ; l'activation des MAPK3 et MAPK6, une apposition de callose au rhizoderme et l'expression de gènes. La perte du récepteur LORE prive la plante de l'ISR induite par le 3-OH-C10:0 et les HAAs. Au contraire, les RLs activent chez *A. thaliana* une ISR contre *B. cinerea* indépendamment du récepteur LORE. Ils activent également une ISR contre ce champignon chez la tomate, plante dépourvue de ce récepteur. Aussi, aucun des marqueurs cités ci-dessus ne sont induits dans les racines par les RLs. Ces molécules semblent donc perçues par les cellules racinaires soit par un récepteur encore inconnu soit grâce à leur capacité à s'insérer dans les membranes lipidiques. À ce jour ce mécanisme conduisant à la perception des RLs reste à identifier.

Matériel et méthodes



Tableau Mm-1 : Composition des solutions nutritives Flora Series (GHE, France).

FloraBloom		FloraMicro		FloraGro	
- Phosphate (P ₂ O ₅)	5%	- Azote total	5%	- Azote total	3%
- Potassium (K ₂ O)	4%	- Azote ammoniacal (NH ₄ ⁺)	1%	- Azote ammoniacal (NH ₄ ⁺)	1%
- Magnésium (MgO)	3%	- Azote nitrique (NO ₃ ⁻)	4%	- Azote nitrique (NO ₃ ⁻)	2%
- Soufre (SO ₄)	5%	- Potassium (K ₂ O)	1.3%	- Phosphate (P ₂ O ₅)	1%
		- Borre (B)	0.01%	- Potassium (K ₂ O)	6%
		- Calcium (CaO)	7%	- Magnésium (MgO)	0.8
		- Cuivre (Cu) chélaté EDTA	0.01%		
		- Fer (Fe) chélaté EDDHA - DPTA	0.12%		
		- Manganèse (Mn) chélaté EDTA	0.05%		
		- Molybdène (Mo)	0.004%		
		- Zinc (Zn) chélaté EDTA	0.015%		

Le matériel biologique

I- Le matériel végétal

1) *A. thaliana*

L'écotype Col-0 d'*A. thaliana* a été utilisé comme « type sauvage » (WT) servant de référence pour toutes les expériences. Les mutants *lore-5* (fourni par S. Ranf, Technical University of Munich, Freising, Germany), *npr1-1* (Cao et al., 1994), *jar1-1* (Staswick et al., 2002), *sid2-2* (Wildermuth et al., 2001), *pad3* (Ferrari et al., 2007) et *myb72* (SAIL_713_G10) sont tous obtenus de l'écotype Col-0.

Les plantes sont cultivées en chambre de croissance sous lumière blanche fluorescente ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avec une photopériode jour/nuit de 12h/12h, à la température de 20°C et 60% d'humidité relative.

a. Culture hydroponique

Pour la réalisation des tests de protection (sauf indication contraire) ou pour les expériences impliquant l'extraction d'ARN des racines, les plantes sont cultivées en conditions hydroponiques en utilisant le système de culture Araponics® (Belgique). Les graines sont désinfectées en surface et semées sur les supports préalablement remplis d'agar à 0.6%. La solution de culture est préparée en mélangeant 0.5 mL.L^{-1} de chacune des trois solutions nutritives Flora Series (GHE, France ; FloraBloom, FloraMicro et FloraGro, Tableau Mm-1). La solution est renouvelée chaque semaine.

b. Culture in vitro

Pour les tests de mesures de ROS, d'étude de l'état de phosphorylation des MAPK, de visualisation des dépôts de callose, et d'étude de l'induction de la mort cellulaire, les plantes sont cultivées en milieu stérile. Les graines sont désinfectées en surface et semées sur des boîtes de Petri contenant du milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) (Duchefa, Pays-Bas) dilué de moitié et supplémenté en saccharose (5 g.L^{-1}), en acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES, 0.5 g.L^{-1}) et en phytoagar (8 g.L^{-1}). Après 5 jour de culture, les plantules sont transférées dans des microplaques de 24 puits contenant 1 mL de milieu $\frac{1}{2}$ MS (une plantule par puit) et cultivées dans les conditions indiquées ci-dessus pendant 10 jours.

Pour les tests d'inhibition de croissance racinaire, les graines sont semées sur des boîtes de Petri carrées contenant le milieu de culture précédemment décrit supplémenté avec 1, 10, ou $100 \mu\text{M}$ de 3-OH-C10:0 ou $1 \mu\text{M}$ de Flg22. Les plantes sont alors cultivées verticalement en chambre de croissance pendant 12 jours.

c. Culture sur terreau

Pour la réalisation de certains tests de protection, des arabettes sont semées sur terreau. Elles sont ensuite repiquées 10 jours plus tard dans des godets (volume de 200 mL) puis cultivées pendant trois semaines sous les conditions décrites précédemment.

2) Tomate

Des tomates (*Solanum lycopersicon* L.) de la variété Moneymaker ont été cultivées en hydroponie et en sol pour la réalisation de tests de protection. Les plantes sont cultivées en chambre de croissance sous lumière blanche fluorescente ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avec une photopériode jour/nuit de 12h/12h, à la température de 24°C et 60% d'humidité relative

a. Culture hydroponique

La culture hydroponique de tomates a été réalisée en utilisant le système Araponics (Belgique) (Figure Mm-1A) déjà utilisé pour la culture hydroponique d'arabettes. Les graines sont stérilisées en surface et semées sur les supports de graines remplis d'agar à 6 g.L^{-1} . La solution de culture est préparée en mélangeant 0.5 mL.L^{-1} de chacune des trois solutions nutritives Flora Series (GHE, France ; FloraBloom, FloraMicro et FloraGro, Tableau Mm-1). La solution est renouvelée chaque semaine. Un bulleur est ajouté dans les bassins de culture pour maintenir une oxygénation suffisante du milieu de culture.

b. Culture sur terreau

Des tomates de la même variété sont semées sur terreau dans des godets (1 plante par godet) puis cultivées pendant trois semaine et demie sous les conditions décrites précédemment.

II- Les agents pathogènes

1) *Botrytis cinerea*

La souche B05.10 de *Botrytis cinerea* fournie par l'unité BIOGER d'AgroParisTech a été cultivée sur milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*, Difco Laboratories, USA) à 20°C sous éclairage permanent ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Pour la préparation de solutions d'inoculations, les conidies sont isolées de cultures de mycélium âgées de 20 jours en grattant la surface de la gélose avec du PDB (*Potato Dextrose Broth*, Difco Laboratories, USA) à 6 g.L^{-1} . Cette suspension de conidies est filtrée sur gaze stérile pour retirer les hyphes mycéliennes et la concentration est ajustée à 1.10^5 conidies.mL⁻¹.

2) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

La souche *Pst* DC3000 a été cultivée en milieu KB (peptone 10 g.L^{-1} , KH_2PO_4 1.5 g.L^{-1} , $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g.L^{-1} , rifampicine $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 7.2) à 28°C avec agitation pendant 12h avant utilisation.

Les éliciteurs

Le sécrétome de *P. aeruginosa* enrichi en RLs (RLsec) utilisé principalement dans cette étude a été obtenu de Jeneil Biosurfactant Co. (USA). Les Di-RLs (Rha-Rha-C10:10) purifiés ont été fournis par l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR - UMR 7312 CNRS). L'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0) a été acheté chez Larodan (Suède) et le peptide Flg22 dérivé de la flagelline a été acheté chez Proteogenix (France). Enfin, les HAAs ont été fournis par Éric Déziel (Centre INRS, Institut Armand-Frappier, Laval, Canada).

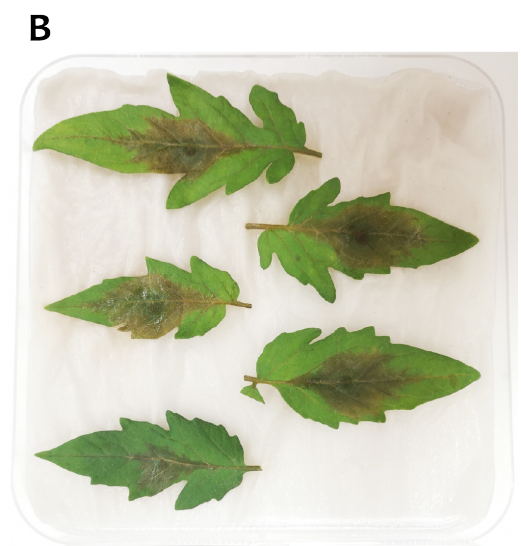


Figure Mm-1 : **Culture hydroponique de tomates et réalisation de tests de protection.**

A : Tomates de la variété Moneymaker cultivées en hydroponie. **B :** Folioles disposées dans une boîte de Petri carrée sur papier Whatman humide pour test de protection

Les solutions stock de ces molécules sont préparées dans de l'éthanol à 100% à l'exception du peptide Flg22 qui est préparé dans de l'eau milliQ. Les traitements « contrôles » ont été réalisés avec des quantités équivalentes d'éthanol, n'excédant pas 0.5% pour les plus fortes concentrations testées. Toutes ces molécules sont conservées au congélateur à -20°C.

Les tests de protection

I- Tests de protection contre *Botrytis cinerea*

1) Sur *A. thaliana*

Des plants d'*A. thaliana* cultivés en hydroponie âgés de 4 semaines sont transférés dans des flacons de 10 mL contenant de la solution nutritive de culture et replacés en chambre de croissance sous les mêmes conditions de culture pour deux jours. Les plantes sont ensuite traitées en ajoutant les éliciteurs ou les contrôles appropriés dans la solution nutritive à la concentration finale indiquée. Deux jours après traitement, les plantes sont inoculées par dépôt de gouttes de 10 µL d'une suspension de conidies de *B. cinerea* à la concentration de 1.10^5 conidies.mL⁻¹ sur chacune des 8 premières feuilles de la rosette. Les plantes sont alors replacées en chambre de croissance dans des conditions d'humidité saturante avec une luminosité réduite de moitié. Les symptômes sont observés 3 jours après infection et quantifiés en mesurant la surface des nécroses avec le logiciel Fiji (<https://fiji.sc/>).

Des tests de protection similaires ont aussi été réalisés sur des plants d'*A. thaliana* cultivés sur terreau. Pour cela, ces plantes sont traitées par arrosage avec 10 mL d'une solution d'élicitation préparée dans de l'eau supplémentée en éliciteur, 3 jours avant inoculation avec l'agent pathogène comme précédemment.

2) Sur tomate

Des tests de protection contre *B. cinerea* ont été réalisés sur tomates cultivées en hydroponie ou sur terreau.

Pour les tomates cultivées en hydroponie (Figure Mm-1A), quatre semaines après le semis, les plantes sont traitées en ajoutant du 3-OH-C10:0 (concentration finale de 10 µM) ou de l'éthanol (contrôle, concentration finale 0.01%) à la solution nutritive. La solution d'élicitation est renouvelée après une semaine de culture. Deux semaines après le premier traitement, les feuilles sont détachées et les folioles disposées séparément les unes des autres dans une boîte de Petri carrée sur du papier Whatman humide (Figure Mm-1B). Les folioles sont ensuite inoculées par dépôt d'une goutte de 10 µL d'une suspension de conidies de *B. cinerea* B05.10 à la concentration de 1.10^5 conidies.mL⁻¹. Les boîtes de Petri sont scellées et replacées dans une chambre de culture avec une intensité lumineuse réduite de moitié. Les symptômes sont observés et la surface de nécrose est mesurée avec le logiciel Fiji (<https://fiji.sc/>) trois jours après inoculation.

Pour les tomates cultivées sur terreau, trois semaines et demie après le semis, chaque plante est arrosée avec 15 mL d'une solution d'élicitation préparée dans de l'eau (NT (contrôle non traité) EtOH 0.02% (contrôle), 3-OH-C10:0 20 µM et RLsec à 200 µM). Ce traitement est renouvelé tous les deux jours pendant 10 jours (5 traitements au total). Deux jours après le dernier traitement les feuilles sont détachées et les folioles disposées séparément les unes des autres dans une boîte de

Petri carrée sur du papier Whatman humide. Les folioles sont ensuite inoculées comme précédemment avec une suspension de conidies de *B. cinerea* B05.10 et les symptômes sont observés et les nécroses mesurées trois jours plus tard.

II- Tests de protection contre *Pst* DC3000

Comme pour les tests de protection contre *B. cinerea* décrits précédemment, des plants d'*A. thaliana* cultivés en hydroponie, âgés de 4 semaines sont transférés dans des flacons de 10 mL contenant de la solution nutritive de culture et replacés en chambre de croissance pour 2 jours. Les plantes sont ensuite traitées par ajout des éliciteurs ou des contrôles appropriés à la solution nutritive. Deux jours après traitement, les plantes sont inoculées par pulvérisation de 3 mL d'une solution de bactérisation (MgCl_2 10 mM, Silwet-L77 0.025 % (v/v), DO_{600} à 0.01). Trois jours après l'inoculation, les feuilles sont récoltées, pesées puis broyées dans 10 mL de MgCl_2 à 10 mM. À partir de ce broyat, quatre dilutions en série sont préparées (100 μL de la dilution n-1 dans 900 μL de MgCl_2 à 10 mM). 10 μL de chacune de ces dilutions sont déposés en duplicat sur des boîtes de Petri avec milieu KB (peptone 10 g.L^{-1} , KH_2PO_4 1.5 g.L^{-1} , $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g.L^{-1} , bacto-agar 12 g.L^{-1} , rifampicine 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 7.2). Après deux jours de culture à 28°C, les colonies (CFU, *Colony Forming Unit*) sont dénombrées.

Le nombre de bactéries par mg de matière fraîche est calculé par la formule :

$$\text{CFU.mg}^{-1} = \frac{\left(\frac{N \times Vd}{Vi} \times 10^{(n-1)} \times 100 \right)}{M}$$

Avec N, le nombre de colonies dénombrées ; Vd, le volume total de la dilution ; Vi, le volume de la dilution déposé sur la boîte de Petri ; n, le numéro de la dilution ; M, la masse en mg de l'échantillon broyé.

Des tests de protection contre *Pst* DC3000 ont aussi été réalisés sur plants d'*A. thaliana* cultivés sur terreau à une densité de 15 plantes par godet pendant 3 semaines. Les solutions d'élicitation ont été préparées dans de l'eau. Les traitements ont été réalisés de deux manières différentes ; (i) les plantes ont été traitées une seule fois par arrosage avec 10 mL de solution d'élicitation 2 jours avant bactérisation, (ii) les plantes ont été traitées par arrosage avec la solution d'élicitation tous les deux jours pendant deux semaines avant bactérisation (8 traitements au total). La suite du protocole est décrite ci-dessus.

Mesure de la production de ROS

Les tests sont réalisés sur des plantules cultivées en milieu ½ MS âgées de 15 jours. Le système racinaire d'une plantule a été placé dans chaque puit d'une microplaque de 96 puits (Perkin-Helmer, USA) dans 150 μL d'eau milliQ. La plaque ainsi préparée est placée à l'obscurité pour la nuit à température ambiante. La suite du protocole est réalisée comme décrit par Smith and Heese (2014). La luminescence (428 nm) est mesurée toutes les 2 minutes pendant 1 ou 12 heures par un Tecan Infinite F200 PRO (Suisse). Les sommes de RLU ont été obtenues en additionnant les mesures enregistrées entre 4 et 40 minutes après élicitation.

Phosphorylation des MAPK (MAPK3 et MAPK6)

La détection des MAPK3 et MAPK6 phosphorylées a été réalisée tel que décrit par Wyrsh et al., (2015). Douze plantules cultivées en milieu ½ MS âgées de 15 jours ont été placées dans de l'eau pour la nuit sur des boîtes de Petri à deux compartiments de manière à séparer le système racinaire du système aérien. Le jour suivant, les éliciteurs ou les contrôles appropriés sont ajoutés dans l'eau au niveau du système racinaire. Les racines sont alors séparées des rosettes 10 minutes après traitement, et immédiatement congelées à l'azote liquide. Pour l'extraction des protéines, 60 mg d'échantillons de racines sont broyés avant ajout de 60 µL de tampon d'extraction (0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 30% (v/v) glycérol, 10% (v/v) SDS, 0.6 M dithiothreitol, 0.012% (m/v) bleu de bromophénol). Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE 12% puis transférées sur membranes de PVDF en 7 minutes à 25 V en utilisant un système de transfert iBLOT (Invitrogen, USA). Les MAPK phosphorylées sont ciblées par l'anticorps primaires *phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody* (Cell Signaling Technologies, USA) (concentration 1/2000, incubation sur la nuit à 4°C). L'anticorps secondaires *Goat anti-rabbit HRP-conjugated* (Bio-Rad, USA) est ensuite utilisé (concentration 1/3000, incubation sur 1h). Les membranes sont alors lues sur un système d'imagerie Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR, USA) en utilisant la solution de révélation SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher Scientific, USA). Le contrôle de charge est réalisé en utilisant des anticorps primaires ciblant l'actine (*Actin 11*, CusAb, USA) (1/2000, 1h) puis un anticorps secondaire *anti-mouse HRP-conjugated* (Cell Signaling Technologies, USA) (1/1000, 1h).

Visualisation des dépôts de callose

Des plantules d'*A. thaliana* cultivées en milieu ½ MS âgées de 15 jours ont été traitées en remplaçant doucement le milieu de culture par du milieu ½ MS supplémenté des éliciteurs ou des contrôles appropriés. 24h après traitement, les systèmes racinaires sont collectés dans des microplaques de 12 puits et incubés dans la solution de décoloration/fixation (éthanol:acide acétique 3:1) pour 2h. Les racines sont ensuite réhydratées dans de l'éthanol à 70% pendant 2h, de l'éthanol à 50% pendant 2h puis dans de l'eau milliQ sur la nuit. Le jour suivant, les tissus sont clarifiés par un bain de soude (NaOH) à 10% à 37°C pendant 1h. Après plusieurs lavages à l'eau milliQ, les racines sont incubées dans une solution de K₂HPO₄ à 150 mM pendant 30 minutes avant incubation dans la solution de coloration (150 mM K₂HPO₄ et 0.01% Bleu Aniline) pendant 3h à l'obscurité. Les dépôts de callose sont ensuite observés rapidement en utilisant un microscope à épifluorescence (Olympus BX43, X-cite 120 LED, caméra Infinity3 luminera, filtre U.V.B.).

Test de conductivité (mort cellulaire)

Huit heures avant la première mesure, les racines de deux plantules d'*A. thaliana* âgées de 15 jours, cultivées en milieu ½ MS sont prélevées et placées dans de l'eau milliQ. À l'issue de la période « d'acclimatation », les racines sont placées dans des tubes de 2 mL contenant 1 mL de solution d'élicitation préparée dans de l'eau milliQ. La conductivité est mesurée avec un conductimètre LAQUAtwin B-771 (Horiba) 0h, 2h, 7h et 24h après élicitation. Les résultats sont exprimés en termes d'augmentation de la conductivité par rapport au temps 0h.

Quantification de l'expression de gènes

Comme décrit précédemment pour les tests de protection, des plants d'*A. thaliana* cultivés en hydroponie âgés de 4 semaines sont transférés dans des flacons de 10 mL contenant de la solution nutritive de culture et replacés en chambre de croissance sous les mêmes conditions de culture pour deux jours. Les plantes sont ensuite traitées en ajoutant les éliciteurs ou les contrôles appropriés dans la solution nutritive à la concentration finale indiquée. Dans le cas de l'extraction d'ARN des racines ; pour chaque traitement, les systèmes racinaires de 5 plantes sont prélevés 0, 3 et 9h après traitement, rincés à l'eau milliQ et immédiatement congelés à l'azote liquide. Dans le cas de l'extraction d'ARN des feuilles, les rosettes de 5 plantes pour chaque traitement sont prélevées 48 et 72h après traitement et congelées à l'azote liquide. Afin de mettre en évidence l'impact des différentes molécules testées sur les gènes induits au niveau foliaire suite à une infection par *B. cinerea*, des plantes hydroponiques ont aussi été inoculées par pulvérisation de 3 mL d'une solution d'inoculation à 1.10^5 conidies.mL⁻¹ 48h après le traitement racinaire (la pulvérisation permet d'inoculer les plantes de façon homogène). 24h plus tard, les rosettes de 5 plantes pour chaque traitement sont prélevées et congelées à l'azote liquide. Après broyage, les ARN totaux sont extraits de ces échantillons à l'Extract'All (Eurobio) selon les recommandations du fabriquant.

I- Séquençage RNAseq

La qualité des échantillons d'ARN a été déterminée sur la base du RNA Quality Indicator (RQI) obtenu par le système d'électrophorèse automatique Experion™ (Bio-Rad, USA). Pour l'analyse des profils transcriptomiques des échantillons de racines, les échantillons d'ARN validés ont été envoyés à Genewiz (UK) pour la préparation des librairies et le séquençage par Illumina HiSeq. L'analyse bioinformatique a été réalisée par le département *Environmental Research and Innovation* (ERIN) du *Luxembourg Institute of Science and Technology* (LIST). Les données ont été traitées sur le logiciel CLC Genomics Workbench pour la cartographie et le calcul des taux d'expression selon la méthode de Mortazavi *et al.* (2008). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de la méthode de correction FDR (*False Discovery Rate*). Les gènes avec un taux d'expression modifié d'au moins 1.5 fois avec une p-valeur inférieure à 0.1 ont été sélectionnés.

II- Analyse qRT-PCR

Pour la quantification des taux d'expression des gènes par qRT-PCR, 1 µg d'ARN a été utilisé pour la rétro-transcription en utilisant le kit Verso cDNA synthesis de Thermo Fisher Scientific (USA) en suivant les recommandations du fournisseur. Les transcrits ont ensuite été quantifiés par qRT-PCR avec un thermocycleur CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, USA) et l'Absolute Blue SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA). Les réactions de PCR sont réalisées en duplicat dans des microplaques de 96 puits (15 µL par puit) dans le mélange réactionnel 1X SYBR Green Mix (incluant la Taq polymérase, les déoxyribonucléotide triphosphates et la sonde fluorescente SYBR Green) avec les amorces à 280 nM de concentration et les cDNA dilués au 1/10^{ème}. Après dénaturation à 95°C

Tableau Mm-2 : Liste des amorces utilisées pour le suivi de gènes par qRT-PCR.
Oligo sequences (5'-3')

Gene Name	Forward	Reverse	Reference
<i>At1g21050</i>	GTGTGACCGTCGTAGAAGCA	CGCTCAAACCTAGCCCTCAA	This study
<i>At4g02940</i>	CGATAATCGACGCGATGTGC	CGCCACCACCTCTTCAGAT	This study
<i>AtABC11</i>	ATCCAAAATCTGGCGCAGTG	AATGAACTTCGCCGCATTAGC	This study
<i>AtActin</i>	CCCAGGAATTGCTGACCGTA	TTTTCTCTCTGGCGGTGCA	(Sanchez et al., 2012)
<i>AtCYP71A12</i>	CGAAAGCGAGAAGAGTATTGGA	TGTGGCCTAATGGTTGACCG	(Sanchez et al., 2012)
<i>AtDHAR2</i>	GGCGACTGTCCGTTTAGC	TCTCGGATCCGTCATTAGCG	(Kayihan et al., 2016)
<i>AtGSTU24</i>	TCCATAGCTGGTTTGCACTG	TAGCGACGCTCTCTCTCC	(Rahantaniaina et al., 2017)
<i>AtMYB51</i>	CTACAAGTGTTCGTTGACTCTGAA	ACGAAATTATCGCAGTACATTAGAGGA	(Frerigmann and Gigolashvili, 2014)
<i>AtMYB72</i>	TCACCAAGGCGAGTGTATGC	CGCATGGGATATCCGGTTGA	This study
<i>AtOPR1</i>	TCAGCCAAATGGAAAAGTCCT	CCGGGGATTCTTCGATACCA	This study
<i>AtOXS3</i>	CTGAAGCAAATGGGCAACATGA	TAGGGAGGTGTGACATGAGGT	This study
<i>AtUbiquitin5</i>	GGAAGAAGAAGACTTACACC	AGTCCACACTTACCACAGTA	This study
<i>AtUGT73B4</i>	GAAGGATGCGAGAACCGTGA	AGAGCACTCGGTTTGTTGT	This study
<i>AtWRKY30</i>	CCCAAGAGCGATGATTCCGA	CTGAATCCATCGTCCAGCGT	This study

pour 15 minutes, l'amplification est réalisée en deux étapes : 10 s de dénaturation à 95°C et 45 s d'hybridation/élongation à 60°C avec un total de 40 cycles. Les mêmes conditions ont été appliquées pour tous les gènes étudiés. Les amorces ont été créées avec le logiciel Primer-BLAST (NCBI) et sont présentées dans le Tableau Mm-2. L'efficacité des amorces a été calculée en réalisant des qRT-PCR sur des dilutions en séries. Pour chaque expérimentation, la réaction de PCR a été réalisée en duplicat et au moins trois expériences indépendantes ont été analysées. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés en utilisant les gènes *AtActin* et *AtUbiquitine5* comme contrôles internes, et comparés aux échantillons contrôles en utilisant la méthode des $\Delta\Delta Ct$.

Coloration GUS

Les plantes sont cultivées pendant 15 jours en microplaques dans 2 mL de milieu ½ MS puis traitées par remplacement du milieu de culture par une solution d'éllicitation préparée dans du milieu ½ MS supplémenté des éliciteurs ou des contrôles appropriés. Après éllicitation (5h pour les plantes *AtCYP71A12_{pro}:GUS* et 3h pour les plantes *AtMYB51_{pro}:GUS* et *AtWRKY11_{pro}:GUS*), les plantes sont lavées par remplacement du milieu avec du tampon Sodium Phosphate à 50 mM pH 7, puis les racines sont placées dans la solution de coloration (50 mM Tampon Sodium Phosphate, pH 7, 10mM EDTA, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM X-GlcA et 0.1% Triton X-100). Les racines sont rapidement infiltrées sous vide pendant 5 minutes et mises en incubation à 37°C pendant 4h. À l'issue de la période d'incubation, les racines sont lavées à l'eau milliQ et mises pour la nuit dans une solution de décoloration/fixation (éthanol:acide acétique 3:1) à 4°C puis placées dans de l'éthanol à 95%. Les racines sont finalement observées au microscope optique.

Visualisation de la production de ROS par microscopie

Deux méthodes ont été utilisées pour tenter d'observer la production de ROS au niveau racinaire.

- La première méthode consiste en une coloration des racines au 3,3'-diaminobenzidine (DAB) qui permet la détection histochimique de l' H_2O_2 intracellulaire. Le DAB est oxydé par l' H_2O_2 en présence de peroxydases, et forme un précipité brun visualisable en microscopie optique. Pour cela des plants d'*A. thaliana* hydroponiques âgés de 25 jours ont été traités par ajout d'eau milliQ (contrôle) ou de Flg22 (concentration finale de 1 μM) au milieu de culture. Après éllicitation (10, 20, 30 minutes) les racines sont prélevées et colorées comme décrit par Miotto-Vilanova *et al.* (2016), par incubation dans la solution de DAB (1 mg.mL⁻¹) à 37°C pendant 6h avant observations au microscope optique.

- La deuxième méthode consistait en une coloration au 2',7'-Dichlorofluorescéine diacétate (DCFDA). Cette sonde pénètre dans les cellules où elle est déacétylée par des estérases cellulaires en un composé non fluorescent, lui-même oxydé par les ROS intracellulaires en un composé fluorescent le 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF). Des arabettes cultivées en milieu ½ MS âgées de 15 jours sont alors traitées par ajout d'eau milliQ (contrôle) ou de Flg22 (concentration finale de 1 μM) au milieu de culture. Après 15 minutes d'éllicitation le milieu est remplacé par une solution de DCFDA à 20 μM préparée dans du milieu ½ MS. À l'issue des 30 minutes de coloration à l'obscurité et rinçage à l'eau, les racines sont observées au microscope à épifluorescence.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées grâce au logiciel R 3.5.2 (R Core Team, 2018) et représentées grâce au package `ggplot2` (Wickham, 2016). Des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ou de comparaison par paire de Wilcoxon Mann-Whitney ont été réalisés.

Bibliographie



- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2014. A Stereospecific Pathway Diverts β -Oxidation Intermediates to the Biosynthesis of Rhamnolipid Biosurfactants. *Chem. Biol.* 21, 156–164. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2013.11.010>
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Ádám, A.L., Nagy, Z.Á., Kátay, G., Mergenthaler, E., Viczián, O., 2018. Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19041146>
- Agrawal, A.A., Konno, K., 2009. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 311–331. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307>
- Ahuja, I., Kissen, R., Bones, A.M., 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17, 73–90. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2011.11.002>
- Alabouvette, C., Couteaudier, Y., Louvet, J., 1984. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. X. - Comparaison de la mycoflore colonisant les racines de melons cultivés dans un sol résistant ou dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agron. EDP Sci.* 4, 735–740.
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., Galaud, J.-P., 2018. Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/IJMS19030665>
- Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.008>
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.-M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., 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. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., Keller, H., 2010. The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol.* 187, 449–460. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03272.x>
- Bacete, L., Mélida, H., Miedes, E., Molina, A., 2018. Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J.* 93, 614–636. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>
- Baetz, U., Martinoia, E., 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci.* 19, 90–98. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2013.11.006>
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>

- Basu, D., Haswell, E.S., 2017. Plant mechanosensitive ion channels: an ocean of possibilities. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40, 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2017.07.002>
- Beattie, G.A., 2016. A war over water when bacteria invade leaves. *Nature* 539, 506–507. <https://doi.org/10.1038/539506a>
- Beck, M., Wyrsh, I., Strutt, J., Wimalasekera, R., Webb, A., Boller, T., Robatzek, S., 2014. Expression patterns of flagellin sensing 2 map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *J. Exp. Bot.* 65, 6487–98. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru366>
- Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., Conrath, U., 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 944–53. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062158>
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N.J., Hahlbrock, K., 2005. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 138, 1058–70. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057794>
- Berry, M.C., McGhee, G.C., Zhao, Y., Sundin, G.W., 2009. Effect of a *waal* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01438.x>
- Bi, G., Zhou, Z., Wang, W., Li, L., Rao, S., Wu, Y., Zhang, X., Menke, F.L.H., Chen, S., Zhou, J.-M., 2018. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases directly link diverse Pattern Recognition Receptors to the activation of Mitogen-Activated Protein Kinase cascades in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 30, 1543–1561. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00981>
- Białas, A., Zess, E.K., Concepcion, J.C.D. la, Franceschetti, M., Pennington, H.G., Yoshida, K., Upson, J.L., Chanclud, E., Wu, C.-H., Langner, T., Maqbool, A., Varden, F.A., Derevnina, L., Belhaj, K., Fujisaki, K., Saitoh, H., Terauchi, R., Banfield, M.J., Kamoun, S., 2017. Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *bioRxiv* 171223. <https://doi.org/10.1101/171223>
- Bigéard, J., Colcombet, J., Hirt, H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–39. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Blancard, D., 2017. Tomato - *Botrytis cinerea* Pers., (1794) [WWW Document]. Ephytia. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/4995/Tomate-Botrytis-cinerea-moisissure-grise> (accessed 8.6.19).
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of Elicitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bones, A.M., Rossiter, J.T., 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194–208. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00497.x>
- Boudsocq, M., Sheen, J., 2013. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 18, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.008>

- Boutrot, F., Zipfel, C., 2017. Function, discovery, and exploitation of plant Pattern Recognition Receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Bowes, B.G., Mauseth, J.D., Legrand, M., 2012. *Structure des plantes*, 2ème Édit. ed. Éditions Quæ, Versailles.
- Braun, S.G., Meyer, A., Holst, O., Pühler, A., Niehaus, K., 2005. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 674–681. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0674>
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., 2000. Induced and preformed antimicrobial proteins, in: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 371–477. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_11
- Bürger, M., Chory, J., 2019. Stressed out about hormones: how plants orchestrate immunity. *Cell Host Microbe* 26, 163–172. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2019.07.006>
- Burow, M., Halkier, B.A., 2017. How does a plant orchestrate defense in time and space? Using glucosinolates in *Arabidopsis* as case study. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.009>
- Caarls, L., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6, 170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00170>
- Cannesan, M.A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., Laval, K., Follet-Gueye, M.-L., Driouich, A., Vitré-Gibouin, M., 2012. Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiol.* 159, 1658–70. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198507>
- Cannesan, M.A., Gangneux, C., Lanoue, A., Giron, D., Laval, K., Hawes, M., Driouich, A., Vitré-Gibouin, M., 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Ann. Bot.* 108, 459–469. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr177>
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X., 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of Systemic Acquired Resistance, *The Plant Cell*.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., Stacey, G., 2014. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *Elife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03766>
- Caroff, M., Karibian, D., 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 338, 2431–2447. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2003.07.010>
- Castro, M.J.L., Ojeda, C., Cirelli, A.F., 2013. *Surfactants in Agriculture*. Springer, Dordrecht, pp. 287–334. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6836-9_7
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M.,

2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>

Chen, Y.-C., Holmes, E.C., Rajniak, J., Kim, J.-G., Tang, S., Fischer, C.R., Mudgett, M.B., Sattely, E.S., 2018. N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E4920–E4929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805291115>

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G., 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18, 465–476. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.036574>

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T., 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05999>

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., Solano, R., 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>

Choi, W.-G., Hilleary, R., Swanson, S.J., Kim, S.-H., Gilroy, S., 2016. Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 287–307. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112130>

Chuberre, C., Plancot, B., Driouich, A., Moore, J.P., Bardor, M., Gügi, B., Vicré, M., 2018. Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots. *Front. Plant Sci.* 9, 1692. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01692>

Clifford, J.C., Rapisavoli, J.N., Roper, M.C., 2013. A Rhamnose-Rich O-Antigen mediates adhesion, virulence, and host colonization for the xylem-limited phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 676–685. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0283-R>

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G., Jaskiewicz, M.R., 2015. Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>

Cook, D.E., Mesarich, C.H., Thomma, B.P.H.J., 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 541–563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>

Couto, D., Zipfel, C., 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 537–552. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>

De-la-Peña, C., Badri, D. V, Lei, Z., Watson, B.S., Brandão, M.M., Silva-Filho, M.C., Sumner, L.W., Vivanco, J.M., 2010. Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time. *J. Biol. Chem.* 285, 30654–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119040>

- De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B.P.A., Kazan, K., 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends Plant Sci.* 20, 91–101. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.09.007>
- De Vleesschauwer, D., Gheysen, G., Höfte, M., 2013. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends Plant Sci.* 18, 555–565. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2013.07.002>
- De Vleesschauwer, D., Höfte, M., 2009. Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Adv. Bot. Res.* 51, 223–281. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)
- De Vleesschauwer, D., Xu, J., Höfte, M., 2014. Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 5, 611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00611>
- De Wit, P.J.G.M., 2016. Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytol.* 212, 805–813. <https://doi.org/10.1111/nph.14144>
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E., Ongena, M., 2015. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 570–582. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286>
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., Molina, A., 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 4, 155. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>
- Desaki, Y., Kouzai, Y., Ninomiya, Y., Iwase, R., Shimizu, Y., Seko, K., Molinaro, A., Minami, E., Shibuya, N., Kaku, H., Nishizawa, Y., 2018. OsCERK1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. *New Phytol.* 217, 1042–1049. <https://doi.org/10.1111/nph.14941>
- Desaki, Y., Miya, A., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Yamane, H., Kaku, H., Minami, E., Shibuya, N., 2006. Bacterial lipopolysaccharides induce defense responses associated with Programmed Cell Death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 1530–1540. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl019>
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–13. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>
- Ding, P., Rekhter, D., Ding, Y., Feussner, K., Busta, L., Haroth, S., Xu, S., Li, X., Jetter, R., Feussner, I., Zhang, Y., 2016. Characterization of a pipecolic acid biosynthesis pathway required for Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 28, 2603–2615. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00486>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Yaxi, Li, X., Zhang, Yuelin, 2018. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* 173, 1454–1467.e15. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.044>
- Doughari, J., 2015. An overview of plant immunity. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 6.

<https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000322>

- Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E., Ecker, J.R., 2012. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2183–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209329109>
- Driouich, A., Durand, C., Cannesan, M.-A., Percoco, G., Vicre-Gibouin, M., 2010. Border cells versus border-like cells: are they alike? *J. Exp. Bot.* 61, 3827–3831. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq216>
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Vitré-Gibouin, M., Hawes, M., 2013. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 489–495. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.06.010>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15, 573–581. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.06.005>
- Duke, K.A., Becker, M.G., Girard, I.J., Millar, J.L., Dilantha Fernando, W.G., Belmonte, M.F., de Kievit, T.R., 2017. The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC Genomics* 18, 467. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3848-6>
- Dulin, I., 2017. Culture hors-sol [WWW Document]. Ephytia. URL <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23193/Tropileg-Culture-hors-sol> (accessed 8.6.19).
- Eberharther, A., Becker, P.B., 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3, 224–9. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf053>
- Eleftheriou, E., Adamakis, I.-D., Panteris, E., Fatsiou, M., Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.-D.S., Panteris, E., Fatsiou, M., 2015. Chromium-induced ultrastructural changes and oxidative stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15852–15871. <https://doi.org/10.3390/ijms160715852>
- Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.-D.S., Melissa, P., 2012. Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 249, 401–416. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0292-3>
- Ellinger, D., Voigt, C.A., 2014. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann. Bot.* 114, 1349–1358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu120>
- Ernst, R.K., Adams, K.N., Moskowitz, S.M., Kraig, G.M., Kawasaki, K., Stead, C.M., Trent, M.S., Miller, S.I., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J. Bacteriol.* 188, 191–201. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.191-201.2006>
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C., Dorey, S., 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol. Plant Pathol.* 16, 177–187.

- Faulkner, C., Petutschnig, E., Benitez-Alfonso, Y., Beck, M., Robatzek, S., Lipka, V., Maule, A.J., 2013. LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9166–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203458110>
- Fernández, V., Bahamonde, H.A., Javier Peguero-Pina, J., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., Goldbach, H.E., Eichert, T., 2017. Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. *J. Exp. Bot.* 68, 5293–5306. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx302>
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., Dewdney, J., 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT 3. *Plant Physiol.* 144, 367–79. <https://doi.org/10.1104/pp.107.095596>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., Solano, R., 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* 5, 344–350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Frerigmann, H., Gigolashvili, T., 2014. MYB34, MYB51, and MYB122 Distinctly Regulate Indolic Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant* 7, 814–828. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu004>
- Fu, Z.Q., Dong, X., 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S., 2013. Plant defense against insect herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242–97. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., Kachroo, A., 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 06, 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gaulin, É., Jacquet, C., Bottin, A., Dumas, B., 2007. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* 8, 539–548. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x>
- Geurtsen, J., Steeghs, L., Hove, J. Ten, van der Ley, P., Tommassen, J., 2005. Dissemination of lipid A deacylases (pagL) among gram-negative bacteria: identification of active-site histidine and serine residues. *J. Biol. Chem.* 280, 8248–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414235200>
- Gimenez-Ibanez, S., Chini, A., Solano, R., Gimenez-Ibanez, S., Chini, A., Solano, R., 2016. How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers. *Plants* 5, 9. <https://doi.org/10.3390/plants5010009>
- Gómez-Gómez, L., Boller, T., 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5, 1003–11. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8)

- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T., 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 277–284. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00451.x>
- Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G.J.M., Van Der Meer, J.W.M., Conrath, U., Netea, M.G., 2018. Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunol. Rev.* 283, 21–40. <https://doi.org/10.1111/imr.12647>
- Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Clément, C., Baillieul, F., Aziz, A., 2015. *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response against *Botrytis cinerea* in grapevine. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 1117–1129. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0092-R>
- Gunawardena, U., Hawes, M.C., 2002. Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: role of root border cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 1128–1136. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1128>
- Gupta, S., Pandey, S., 2019. ACC Deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01506>
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P., 2017. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 565–589. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623>
- Halim, V.A., Altmann, S., Ellinger, D., Eschen-Lippold, L., Miersch, O., Scheel, D., Rosahl, S., 2009. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J.* 57, 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x>
- Hamilton, E.S., Schlegel, A.M., Haswell, E.S., 2015. United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 113–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114700>
- Han, Q., Wu, F., Wang, X., Qi, H., Shi, L., Ren, A., Liu, Q., Zhao, M., Tang, C., 2015. The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environ. Microbiol.* 17, 1166–1188. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12538>
- Han, X., Kahmann, R., 2019. Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front. Plant Sci.* 10, 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00822>
- Hartmann, M., Kim, D., Bernsdorff, F., Ajami-Rashidi, Z., Scholten, N., Schreiber, S., Zeier, T., Schuck, S., Reichel-Deland, V., Zeier, J., 2017. Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity. *Plant Physiol.* 174, 124–153. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00222>
- Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., Scholten, N., Schuck, S., Bräutigam, A., Hölzel, T., Ganter, C., Zeier, J., 2018. Flavin monooxygenase-generated

N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell* 173, 456–469.e16. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.02.049>

Hashem, A., Tabassum, B., Fathi Abd_Allah, E., 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2019.05.004>

Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B.G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D.A., Xiong, Z., 2016. Root border cells and their role in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 143–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100140>

Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., Zhao, X., 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci.* 5, 128–133. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01556-9)

He, Y., Li, Z., 2018. Epigenetic environmental memories in plants: establishment, maintenance, and reprogramming. *Trends Genet.* 34, 856–866. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2018.07.006>

Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., Ongena, M., 2011. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cell. Microbiol.* 13, 1824–1837. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01664.x>

Huysmans, M., Lema A, S., Coll, N.S., Nowack, M.K., 2017. Dying two deaths — programmed cell death regulation in development and disease. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35, 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2016.11.005>

IPCC, 2019. IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse gas fluxes in Terrestrial Ecosystems. Summ. Policymakers Approv. Draft 74–102. <https://doi.org/10.4337/9781784710644>

Irfan-Maqsood, M., Seddiq-Shams, M., 2014. Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Ind. Biotechnol.* 10, 285–291. <https://doi.org/10.1089/ind.2014.0003>

Iven, T., König, S., Singh, S., Braus-Stromeier, S.A., Bischoff, M., Tietze, L.F., Braus, G.H., Lipka, V., Feussner, I., Dröge-Laser, W., 2012. Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol. Plant* 5, 1389–1402. <https://doi.org/10.1093/mp/sss044>

Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., Likpa, V., Kogel, K.-H., Schäfer, P., 2011. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol.* 156, 726–40. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176446>

Jaskiewicz, M., Conrath, U., Peterhänsel, C., 2011. Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* 12, 50–5. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.186>

Jiang, S., Yao, J., Ma, K.-W., Zhou, H., Song, J., He, S.Y., Ma, W., 2013. Bacterial effector activates

jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog.* 9, e1003715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003715>

Jin, C.W., Ye, Y.Q., Zheng, S.J., 2014. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Ann. Bot.* 113, 7–18. <https://doi.org/10.1093/aob/mct249>

Johann, S., Seiler, T.-B., Tiso, T., Bluhm, K., Blank, L.M., Hollert, H., 2016. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Sci. Total Environ.* 548–549, 155–163. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.01.066>

Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L. V., Gilroy, S., 2006. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell Environ.* 29, 1309–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x>

Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–9. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., Ongena, M., 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 456–468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>

Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L.C., Williams, B., 2017. The life and death of a plant cell. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111655>

Kachroo, A., Robin, G.P., 2013. Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 527–533. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.06.019>

Kachroo, P., Kachroo, A., 2018. Plants pack a quiver full of arrows. *Cell Host Microbe* 23, 573–575. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.04.014>

Kadota, Y., Shirasu, K., Zipfel, C., 2015. Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.* 56, 1472–1480. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv063>

Kandath, P.K., Mitchum, M.G., 2013. War of the worms: how plants fight underground attacks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 457–463. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.07.001>

Kanyuka, K., Rudd, J.J., 2019. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2019.02.005>

Keinath, N.F., Waadt, R., Brugman, R., Schroeder, J.I., Grossmann, G., Schumacher, K., Krebs, M., 2015. Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on Flg22- and chitin-induced transient [Ca²⁺]_{cyt} patterns in Arabidopsis. *Mol. Plant* 8, 1188–1200. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.05.006>

Kim, Y.C., Anderson, A.J., 2018. Rhizosphere pseudomonads as probiotics improving plant health. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2349–2359. <https://doi.org/10.1111/mpp.12693>

- Kong, Q., Qu, N., Gao, M., Zhang, Z., Ding, X., Yang, F., Li, Y., Dong, O.X., Chen, S., Li, X., Zhang, Y., 2012. The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 2225–36. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097253>
- Kownatzki, R., Tümmler, B., Döring, G., 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* (London, England) 1, 1026–7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)92286-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)92286-0)
- Kubicek, C.P., Starr, T.L., Glass, N.L., 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Kumar, A.S., Lakshmanan, V., Caplan, J.L., Powell, D., Czymmek, K.J., Levia, D.F., Bais, H.P., 2012. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *Plant J.* 72, 694–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05116.x>
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., Schäffer, M., Smakowska-Luzan, E., Belkhadir, Y., Vlot, A.C., Chandler, C.E., Schellenberger, R., Schwudke, D., Ernst, R.K., Dorey, S., Hückelhoven, R., Hofmann, T., Ranf, S., 2019. Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in Arabidopsis plants. *Science* 364, 178–181. <https://doi.org/10.1126/science.aau1279>
- Kutschera, A., Ranf, S., 2019. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. *Biochimie* 159, 93–98. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.07.028>
- Labrot, P., 2016. Le micro-monde : Galerie de microphotographie [WWW Document]. URL <http://www.nirgal.net/microscopie/microscopie.html> (accessed 7.30.19).
- Lai, C.-C., Huang, Y.-C., Wei, Y.-H., Chang, J.-S., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167, 609–614. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.01.017>
- Lee, J.-Y., Lu, H., 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends Plant Sci.* 16, 201–210. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2011.01.004>
- Lenarčič, T., Albert, I., Böhm, H., Hodnik, V., Pirc, K., Zavec, A.B., Podobnik, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Pruitt, R., Greimel, P., Yamaji-Hasegawa, A., Kobayashi, T., Zienkiewicz, A., Gömann, J., Mortimer, J.C., Fang, L., Mamode-Cassim, A., Deleu, M., Lins, L., Oecking, C., Feussner, I., Mongrand, S., Anderluh, G., Nürnberger, T., 2017. Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science* (80-.). 358, 1431–1434. <https://doi.org/10.1126/science.aan6874>
- Li, C.-H., Wang, K.-C., Hong, Y.-H., Chu, T.-H., Chu, Y.-J., Chou, I.-C., Lu, D.-K., Chen, C.-Y., Yang, W.-C., Lin, Y.-M., Cheng, C.-P., 2014. Roles of different forms of lipopolysaccharides in *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 471–478. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0248-R>
- Li, J., Wang, X., 2019. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Sci.* 279, 45–

50. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.05.021>

- Li, Y., Héloir, M.-C., Zhang, X., Geissler, M., Trouvelot, S., Jacquens, L., Henkel, M., Su, X., Fang, X., Wang, Q., Adrian, M., 2019. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12809>
- Liu, H., Shao, B., Long, X., Yao, Y., Meng, Q., 2016. Foliar penetration enhanced by biosurfactant rhamnolipid. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 145, 548–554. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2016.05.058>
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D., Coaker, G., 2011. A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor. *Cell Host Microbe* 9, 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2011.01.010>
- Liu, N., Zhang, X., Sun, Y., Wang, P., Li, X., Pei, Y., Li, F., Hou, Y., 2017. Molecular evidence for the involvement of a polygalacturonase-inhibiting protein, GhPGIP1, in enhanced resistance to *Verticillium* and *Fusarium* wilts in cotton. *Sci. Rep.* 7, 39840. <https://doi.org/10.1038/srep39840>
- Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J., Boller, T., 2012. Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* 63, 393–401. <https://doi.org/10.1093/jxb/err291>
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R., 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1938–50. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
- Luna, E., Bruce, T.J.A., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J., 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158, 844–53. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J., 2010. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 183–193. <https://doi.org/10.1094/mpmi-07-10-0149>
- Luzuriaga-Loaiza, W.P., Schellenberger, R., De Gaetano, Y., Obounou Akong, F., Villaume, S., Crouzet, J., Haudrechy, A., Baillieul, F., Clément, C., Lins, L., Allais, F., Ongena, M., Bouquillon, S., Deleu, M., Dorey, S., 2018. Synthetic rhamnolipid bolaforms trigger an innate immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 8, 8534. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26838-y>
- Ma, Z., Ongena, M., Höfte, M., 2017. The cyclic lipopeptide orfamide induces systemic resistance in rice to *Cochliobolus miyabeanus* but not to *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Rep.* 36, 1731–1746. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2187-z>
- Madala, N.E., Molinaro, A., Dubery, I.A., 2012. Distinct carbohydrate and lipid-based molecular patterns within lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to defense-associated differential gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Innate Immun.* 18, 140–154. <https://doi.org/10.1177/1753425910392609>
- Marcec, M.J., Gilroy, S., Poovaiah, B.W., Tanaka, K., 2019. Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling

in plant immune response. Plant Sci. 283, 343–354.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2019.03.004>

Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H., Paszkowski, U., 2010. Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Plant Cell 22, 3177–3187.
<https://doi.org/10.1105/TPC.110.078048>

Marhavý, P., Kurenda, A., Siddique, S., Dénervaud Tendon, V., Zhou, F., Holbein, J., Hasan, M.S., Grundler, F.M., Farmer, E.E., Geldner, N., 2019. Single-cell damage elicits regional, nematode-restricting ethylene responses in roots. EMBO J. 38, e100972.
<https://doi.org/10.15252/embj.2018100972>

Matthiessen, J.N., Kirkegaard, J.A., 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. 25, 235–265.
<https://doi.org/10.1080/07352680600611543>

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., Flors, V., 2017. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. Annu. Rev. Plant Biol. 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

Mauchline, T.H., Malone, J.G., 2017. Life in earth – the root microbiome to the rescue? Curr. Opin. Microbiol. 37, 23–28. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.03.005>

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S.Y., 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell 126, 969–980.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>

Meng, X., Zhang, S., 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annu. Rev. Phytopathol. 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>

Meyer, S., Reeb, C., Bosdeveix, R., 2008. Botanique - Biologie et physiologie végétales, 2ème Édition. Maloine, Paris.

Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M., Bakker, P.A.H.M., 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Mol. Plant Pathol. 6, 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00276.x>

Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., Dubery, I.A., 2018. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. Front. Plant Sci. 9, 112.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>

Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A., 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. Front. Plant Sci. 5, 358. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00358>

Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Le Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M., 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. Plant Cell 22, 973–990. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069658>

- Miotto-Vilanova, L., Jacquard, C., Courteaux, B., Wortham, L., Michel, J., Clément, C., Barka, E.A., Sanchez, L., 2016. *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Front. Plant Sci.* 7, 1236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01236>
- Mithöfer, A., Boland, W., 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Clément, C., Dorey, S., Sarazin, C., Rippa, S., 2018. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological Disorders. *Front. Plant Sci.* 9, 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170>
- Monnier, N., Furlan, A., Buchoux, S., Deleu, M., Dauchez, M., Rippa, S., Sarazin, C., Monnier, N., Furlan, A.L., Buchoux, S., Deleu, M., Dauchez, M., Rippa, S., Sarazin, C., 2019. Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through biophysical studies. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1009. <https://doi.org/10.3390/ijms20051009>
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Mulligan, C.N., Wang, S., 2006. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Eng. Geol.* 85, 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.ENGGEOL.2005.09.029>
- Mur, L.A.J., 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 Physiol.* 140, 249–62. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072348>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nasir, M.N., Lins, L., Crowet, J.-M., Ongena, M., Dorey, S., Dhondt-Cordelier, S., Clément, C., Bouquillon, S., Haudrechy, A., Sarazin, C., Fauconnier, M.-L., Nott, K., Deleu, M., 2017. Differential interaction of synthetic glycolipids with biomimetic plasma membrane lipids correlates with the plant biological response. *Langmuir* 33, 9979–9987. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01264>
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., Zeier, J., 2012. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24, 5123–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103564>
- Nawrath, C., Métraux, J.P., 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393–404.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., Kunst, L., 2013. Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *Arab. B.* 11, e0167. <https://doi.org/10.1199/tab.0167>

- Nickzad, A., Déziel, E., 2014. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 447–453. <https://doi.org/10.1111/lam.12211>
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., Niu, D., 2017. Induced Systemic Resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8, 238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00238>
- Noordman, W.H., Janssen, D.B., 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4502. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4502-4508.2002>
- Oerke, E.-C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oldroyd, G.E.D., Harrison, M.J., Paszkowski, U., 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324, 753–4. <https://doi.org/10.1126/science.1171644>
- Omoboye, O.O., Oni, F.E., Batool, H., Yimer, H.Z., De Mot, R., Höfte, M., 2019. *Pseudomonas* cyclic lipopeptides suppress the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* by induced resistance and direct antagonism. *Front. Plant Sci.* 10, 901. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00901>
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Oni, F.E., Geudens, N., Omoboye, O.O., Bertier, L., Hua, H.G.K., Adiobo, A., Sinnaeve, D., Martins, J.C., Höfte, M., 2019. Fluorescent *Pseudomonas* and cyclic lipopeptide diversity in the rhizosphere of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). *Environ. Microbiol.* 21, 1019–1034. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14520>
- Osborn, A.E., 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821–1831. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1821>
- Pálfi, G., Dézsi, L., 1968. Pipecolic acid as an indicator of abnormal protein metabolism in diseased plants. *Plant Soil* 29, 285–291. <https://doi.org/10.1007/BF01348946>
- Papadopoulou, G. V., Maedicke, A., Grosser, K., van Dam, N.M., Martínez-Medina, A., 2018. Defence signalling marker gene responses to hormonal elicitation differ between roots and shoots. *AoB Plants* 10, ply031. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply031>
- Park, H.-J., Wang, W., Curlango-Rivera, G., Xiong, Z., Lin, Z., Huskey, D.A., Hawes, M.C., VanEtten, H.D., Turgeon, B.G., 2019. A DNase from a fungal phytopathogen is a virulence factor likely deployed as counter defense against host-secreted extracellular DNA. *MBio* 10, e02805-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02805-18>

- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D.F., 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113–6. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>
- Patil, S., C Bheemaraddi, M., T. Shivannavar, C., M Gaddad, S., 2014. Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *IOSR J. Agric. Vet. Sci.* 7, 63–68. <https://doi.org/10.9790/2380-07916368>
- Paulus, J.K., van der Hoorn, R.A.L., 2018. Tricked or trapped—Two decoy mechanisms in host–pathogen interactions. *PLOS Pathog.* 14, e1006761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006761>
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., Lee, J., 2014. The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of ‘VQ-motif’-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytol.* 203, 592–606. <https://doi.org/10.1111/nph.12817>
- Peer, R. van, Niemann, G.J., Schippers, B., 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81, 728. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-728>
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M., 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14, 651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Perrine-Walker, F.M., Prayitno, J., Rolfe, B.G., Weinman, J.J., Hocart, C.H., 2007. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 58, 3343–3350. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm181>
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., Bednarek, P., 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol.* 206, 948–964. <https://doi.org/10.1111/nph.13325>
- Pierucci, B., Ridet, A., 2015. Stimuler les défenses des plantes pour lutter contre les bioagresseurs [WWW Document]. Inst. Natl. Rech. Agron. INRA. URL [http://www.inra.fr/Grand-public/Sante-des-plantes/Tous-les-dossiers/Biocontrôle/Stimuler-les-defenses-des-plantes-pour-lutter-contre-les-bioagresseurs/\(key\)/3](http://www.inra.fr/Grand-public/Sante-des-plantes/Tous-les-dossiers/Biocontrôle/Stimuler-les-defenses-des-plantes-pour-lutter-contre-les-bioagresseurs/(key)/3) (accessed 7.29.19).
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 123–134. <https://doi.org/10.1006/PMPP.2000.0291>
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., 2002. Signalling in Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4, 535–544.

<https://doi.org/10.1055/s-2002-35441>

Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced Systemic Resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Plan EcoPhyto II+, 2018.

Plancot, B., Santaella, C., Jaber, R., Kiefer-Meyer, M.C., Follet-Gueye, M.-L., Leprince, J., Gattin, I., Souc, C., Driouich, A., Vitré-Gibouin, M., 2013. Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiol.* 163, 1584–97. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222356>

Poncini, L., Wyrsh, I., Dénervaud Tendon, V., Vorley, T., Boller, T., Geldner, N., Métraux, J.-P., Lehmann, S., 2017. In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* 12, e0185808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185808>

Prabakaran, G., Hoti, S.L., Prakash Rao, H.S., Vijjapu, S., 2015. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). *Acta Trop.* 148, 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2015.03.003>

R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing.

Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>

Raaijmakers, J.M., Mazzola, M., 2016. Soil immune responses. *Science* (80-.). 352, 1392–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3252>

Ranathunge, K., Thomas, R.H., Fang, X., Peterson, C.A., Gijzen, M., Bernards, M.A., 2008. Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae*. *Phytopathology* 98, 1179–1189. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1179>

Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., Scheel, D., 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Immunol.* 16, 426–433. <https://doi.org/10.1038/ni.3124>

Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J.-P., Thuleau, P., Mazars, C., 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 7, 327. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00327>

Rapicavoli, J.N., Blanco-Ulate, B., Muszyński, A., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., Azadi, P., Dobruchowska, J.M., Castro, C., Cantu, D., Roper, M.C., 2018. Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. *Nat. Commun.* 9, 390. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02861-5>

- Rasmann, S., Agrawal, A.A., 2008. In defense of roots: a research agenda for studying plant resistance to belowground herbivory. *Plant Physiol.* 146, 875–80. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112045>
- Read, R.C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., Taylor, G., Et, A., 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.* 72, 2271–7. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.6.2271>
- Reimer-Michalski, E.-M., Conrath, U., 2016. Innate immune memory in plants. *Semin. Immunol.* 28, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.006>
- Rikalović, M., Vrvic, M., Karadzic, I., 2015. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology. *J. Serbian Chem. Soc.* 80, 279–304. <https://doi.org/10.2298/JSC140627096R>
- Robbins, N.E.I., Trontin, C., Duan, L., Dinnyen, J.R., 2014. Beyond the barrier: communication in the root through the endodermis. *Plant Physiol.* 166, 551. <https://doi.org/10.1104/PP.114.244871>
- Robert-Seilantantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just Jasmonate-Salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B.P.H.J., Mesters, J.R., 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* 2, e00790. <https://doi.org/10.7554/eLife.00790>
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.-H., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in Arabidopsis and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.* 160, 1630–41. <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>
- Saraf, M., Pandya, U., Thakkar, A., 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 169, 18–29. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.08.009>
- Scheler, C., Durner, J., Astier, J., 2013. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 534–539. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.06.020>
- Schellenberger, R., 2019. Identification et caractérisation des acteurs protéiques de la membrane plasmique impliqués dans la perception des rhamnolipides chez *Arabidopsis thaliana*. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Schellenberger, R., Touchard, M., Clément, C., Baillieul, F., Cordelier, S., Crouzet, J., Dorey, S., 2019. Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Mol. Plant Pathol.* mpp.12857. <https://doi.org/10.1111/mpp.12857>
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 941–950.

<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2008.06.011>

- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., Lee, J., 2014. Ca²⁺ signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytol.* 204, 782–790. <https://doi.org/10.1111/nph.13031>
- Shang-Guan, K., Wang, M., Htwe, N.M.P.S., Li, P., Li, Y., Qi, F., Zhang, D., Cao, M., Kim, C., Weng, H., Cen, H., Black, I.M., Azadi, P., Carlson, R.W., Stacey, G., Liang, Y., 2018. Lipopolysaccharides trigger two successive bursts of reactive oxygen species at distinct cellular locations. *Plant Physiol.* 176, 2543–2556. <https://doi.org/10.1104/PP.17.01637>
- Shoresh, M., Gal-On, A., Leibman, D., Chet, I., 2006. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for trichoderma-conferred plant resistance. *Plant Physiol.* 142, 1169–79. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082107>
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.-A., Parrilli, M., 2005. The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J. Biol. Chem.* 280, 33660–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506254200>
- Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.441>
- Singh, R.P., Shelke, G.M., Kumar, A., Jha, P.N., 2015. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Front. Microbiol.* 6, 937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., Mauch-Mani, B., 2012. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol.* 158, 835–43. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191593>
- Smith, J.M., Heese, A., 2014. Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leave tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods* 10, 6. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-6>
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., Déziel, E., 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>
- Soltani Dashtbozorg, S., Kohl, J., Ju, L.-K., 2016. Rhamnolipid adsorption in soil: factors, unique features, and considerations for use as green antizootic agents. *J. Agric. Food Chem.* 64, 3330–3337. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00215>
- Somerville, M., Taylor, G.W., Watson, D., Rendell, N.B., Rutman, A., Todd, H., Davies, J.R., Wilson, R., Cole, P., Richardson, P.S., 1992. Release of mucus glycoconjugates by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids into feline trachea *in vivo* and human bronchus *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6, 116–122. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.6.1.116>
- Spoel, S.H., 2019. Signal transduction in systemic immunity. *Plant Cell* 31, 1412–1413.

<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00349>

- Spoel, S.H., Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzeliuss, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., Pieterse, C.M.J., 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., Rowe, M.L., 2002. Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* 14, 1405–1415. <https://doi.org/10.1105/tpc.000885>
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., Waller, F., 2008. Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* 49, 1747–1751. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn147>
- Steinhorst, L., Kudla, J., 2014. Signaling in cells and organisms — calcium holds the line. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2014.08.003>
- Stringlis, I.A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M.C., Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J., 2018a. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J.* 93, 166–180. <https://doi.org/10.1111/tpj.13741>
- Stringlis, I.A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M.C., Berendsen, R.L., Bakker, P.A.H.M., Feussner, I., Pieterse, C.M.J., 2018b. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
- Sun, Z., Zhang, K., Chen, C., Wu, Y., Tang, Y., Georgiev, M.I., Zhang, X., Lin, M., Zhou, M., 2018. Biosynthesis and regulation of cyanogenic glycoside production in forage plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8559-z>
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X., 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952–6. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>
- Tateda, C., Zhang, Z., Shrestha, J., Jelenska, J., Chinchilla, D., Greenberg, J.T., 2014. Salicylic acid regulates Arabidopsis microbial pattern receptor kinase levels and signaling. *Plant Cell* 26, 4171–87. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131938>
- Teixeira, M.A., Wei, L., Kaloshian, I., 2016. Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* roots. *New Phytol.* 211, 276–287. <https://doi.org/10.1111/nph.13893>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A.,

- Browse, J., 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Thomma, B., Cammue, B., Thevissen, K., 2002. Plant defensins. *Planta* 216, 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., Joosten, M.H.A.J., 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23, 4–15. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- Thulasi Devendrakumar, K., Li, X., Zhang, Y., 2018. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2981–2989. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2839-3>
- Tisserant, L.-P., Aziz, A., Jullian, N., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., Boitel-Conti, M., 2016. Enhanced stilbene production and excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot noir hairy root cultures. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21121703>
- Tomasi, N., De Nobili, M., Gottardi, S., Zanin, L., Mimmo, T., Varanini, Z., Römheld, V., Pinton, R., Cesco, S., 2013. Physiological and molecular characterization of Fe acquisition by tomato plants from natural Fe complexes. *Biol. Fertil. Soils* 49, 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0706-1>
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2005. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 37, 1130–1134. <https://doi.org/10.1038/ng1639>
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., Raaijmakers, J.M., 2007. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* 175, 731–742. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02138.x>
- Tran, T.M., MacIntyre, A., Hawes, M., Allen, C., 2016. Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathog.* 12, e1005686. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005686>
- Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., Poinssot, B., 2014. The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytol.* 201, 1371–1384. <https://doi.org/10.1111/nph.12592>
- Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F., Déziel, E., 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9, 2622–2630. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01396.x>
- Van den Ackerveken, G., 2017. How plants differ in toxin-sensitivity. *Science* 358, 1383–1384. <https://doi.org/10.1126/science.aar4188>

- van der Ent, S., Koornneef, A., Ton, J., Pieterse, C.M.J., 2018. Induced resistance - Orchestrating defence mechanisms through crosstalk and priming, in: Annual Plant Reviews. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 334–370. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0371>
- Van der Ent, S., Van Hulten, M., Pozo, M.J., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Pieterse, C.M.J., Ton, J., 2009. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol.* 183, 419–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02851.x>
- Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M.J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J., Pieterse, C.M., 2008. MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146, 1293–304. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113829>
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Van Loon, L.C., 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. <https://doi.org/10.1006/PMPP.1999.0213>
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *Plant Cell* 6, 1191–1192. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1191>
- Varden, F.A., De la Concepcion, J.C., Maidment, J.H., Banfield, M.J., 2017. Taking the stage: effectors in the spotlight. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2017.04.013>
- Varnier, A.-L., Sanchez, L., Vasta, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.-H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant. Cell Environ.* 32, 178–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x>
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., Dorey, S., 2010. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5095–108. <https://doi.org/10.3390/ijms11125095>
- Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 895–908.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J., 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing Systemic Acquired Resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959–965. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.7.959>
- Vos, I.A., Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., 2013. Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathol.* 62, 43–55. <https://doi.org/10.1111/ppa.12105>

- Wang, H., Hu, Y., Pan, J., Yu, D., 2015. Arabidopsis VQ motif-containing proteins VQ12 and VQ29 negatively modulate basal defense against *Botrytis cinerea*. *Sci. Rep.* 5, 14185. <https://doi.org/10.1038/srep14185>
- Wang, Y., Schuck, S., Wu, J., Yang, P., Döring, A.-C., Zeier, J., Tsuda, K., 2018. A MPK3/6-WRKY33-ALD1-Pipecolic acid regulatory loop contributes to Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 30, 2480–2494. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00547>
- Wawra, S., Fesel, P., Widmer, H., Timm, M., Seibel, J., Leson, L., Kessler, L., Nostadt, R., Hilbert, M., Langen, G., Zuccaro, A., 2016. The fungal-specific β -glucan-binding lectin FGB1 alters cell-wall composition and suppresses glucan-triggered immunity in plants. *Nat. Commun.* 7, 13188. <https://doi.org/10.1038/ncomms13188>
- Wen, F., VanEtten, H.D., Tsaprailis, G., Hawes, M.C., 2007. Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiol.* 143, 773–783. <https://doi.org/10.1104/PP.106.091637>
- Wen, F., White, G.J., VanEtten, H.D., Xiong, Z., Hawes, M.C., 2009. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *PLANT Physiol.* 151, 820–829. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142067>
- Wen, J., McLaughlin, M.J., Stacey, S.P., Kirby, J.K., 2010. Is rhamnolipid biosurfactant useful in cadmium phytoextraction? *J. Soils Sediments* 10, 1289–1299. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0229-z>
- Wen, J., Stacey, S.P., McLaughlin, M.J., Kirby, J.K., 2009. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2214–2221. <https://doi.org/10.1016/j.SOILBIO.2009.08.006>
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant graphics for data analysis, Use R! Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–565. <https://doi.org/10.1038/35107108>
- Withers, J., Dong, X., 2016. Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathog.* 12, e1005707. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005707>
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., Zhang, R., 2018. Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31, 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Wyrsh, I., Domínguez-Ferreras, A., Geldner, N., Boller, T., 2015. Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in Arabidopsis *fls2* mutants. *New Phytol.* 206, 774–784. <https://doi.org/10.1111/nph.13280>
- Xin, D.-W., Liao, S., Xie, Z.-P., Hann, D.R., Steinle, L., Boller, T., Staehelin, C., 2012. Functional analysis

of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS Pathog.* 8, e1002707. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002707>

Xing, S., Li, M., Liu, P., 2013. Evolution of S-domain receptor-like kinases in land plants and origination of S-locus receptor kinases in Brassicaceae. *BMC Evol. Biol.* 13, 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-69>

Xing, Z., Liu, Y., Cai, W., Huang, X., Wu, S., Lei, Z., 2017. Efficiency of Trichome-Based Plant Defense in *Phaseolus vulgaris* Depends on Insect Behavior, Plant Ontogeny, and Structure. *Front. Plant Sci.* 8, 2006. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02006>

Xu, N., Luo, X., Li, W., Wang, Z., Liu, J., 2017. The bacterial effector AvrB-induced RIN4 hyperphosphorylation is mediated by a Receptor-Like Cytoplasmic Kinase complex in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 502–512. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0017-R>

Xu, Z., Shi, M., Tian, Y., Zhao, P., Niu, Y., Liao, M., 2019. Dirhamnolipid produced by the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and its herbicidal activity. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24162969>

Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., Xie, D., 2009. The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* 21, 2220–36. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.065730>

Yu, K., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., 2019. Beneficial microbes going underground of root immunity. *Plant. Cell Environ.* pce.13632. <https://doi.org/10.1111/pce.13632>

Yu, M.-H., Zhao, Z.-Z., He, J.-X., 2018. Brassinosteroid signaling in plant-microbe interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19124091>

Yu, X., Feng, B., He, P., Shan, L., 2017. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>

Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J., 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 139–150. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0179>

Zeng, G., Fu, H., Zhong, H., Yuan, X., Fu, M., Wang, W., Huang, G., 2007. Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation* 18, 303–310. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9064-8>

Zhang, L., Zhang, F., Melotto, M., Yao, J., He, S.Y., 2017. Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *J. Exp. Bot.* 68, erw478. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw478>

Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 1, 125–144.

Zhang, X., Dodds, P.N., Bernoux, M., 2017. What do we know about NOD-like receptors in plant

immunity? Annu. Rev. Phytopathol. 55, 205–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035250>

Zhang, Y., Li, X., 2019. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 50, 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2019.02.004>

Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., Dong, X., 2012. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. Cell Host Microbe 11, 587–96. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>

Zheng, Z., Gong, Q., Liu, T., Deng, Y., Chen, J.-C., Chen, G.-Q., 2004. Thioesterase II of *Escherichia coli* plays an important role in 3-hydroxydecanoic acid production. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3807–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3807-3813.2004>

Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., Wu, K., 2005. HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. Plant Cell 17, 1196–204. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028514>

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., Felix, G., 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. Cell 125, 749–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>

***Annexe 1 : Apoplastic invasion patterns
triggering plant immunity: plasma
membrane sensing at the frontline***



Microreview

Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline

ROMAIN SCHELLENBERGER[†], MATTHIEU TOUCHARD[†], CHRISTOPHE CLÉMENT,
FABIENNE BAILLIEUL, SYLVAIN CORDELIER, JÉRÔME CROUZET AND STÉPHAN DOREY* 

University of Reims Champagne-Ardenne, RIBP EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Reims, 51100, France

SUMMARY

Plants are able to effectively cope with invading pathogens by activating an immune response based on the detection of invasion patterns (IPs) originating from the pathogen or released by the plant after infection. At a first level, this perception takes place at the plasma membrane through cell surface immune receptors and although the involvement of proteinaceous pattern recognition receptors (PRRs) is well established, increasing data are also pointing out the role of membrane lipids in the sensing of IPs. In this review, we discuss the evolution of various conceptual models describing plant immunity and present an overview of well-characterized IPs from different natures and origins. We summarize the current knowledge on how they are perceived by plants at the plasma membrane, highlighting the increasingly apparent diversity of sentinel-related systems in plants.

Keywords: invasion patterns, lipids, pattern-triggered immunity, plasma membrane, PRR.

INTRODUCTION

At the base of the food web, plants are targeted by a wide range of organisms belonging to multiple branches of the evolutionary tree. To counter pathogen attack, plants use two distinct mechanisms: (i) constitutive defences, including pre-existing physical and chemical barriers, and (ii) inducible defences activated after perception of the invader (Heath, 2000; Lee *et al.*, 2017; Veronese *et al.*, 2003).

In the 2000s, a general concept was proposed to describe plant immunity as a 'zigzag model' (Jones and Dangl, 2006). In this model, the recognition by the plant of pathogen- or microbial-associated molecular patterns (PAMPs or MAMPs)

that are typically essential components of whole classes of pathogens/microorganisms, results in PAMP-triggered immunity (PTI). The concept of PTI was then extended to molecules that may arise from the plant itself because of the damage caused by microbes and called damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Boller and Felix, 2009). PTI activation classically involves cell surface-localized pattern recognition receptors (PRRs), including membrane receptor kinases (RKs) or receptor-like proteins (RLPs) (Boutrot and Zipfel, 2017). To proliferate, pathogens have developed the capacity to block PTI (now also called pattern- or PRR-triggered immunity) by secreting effectors that interfere with perception or immunity-related signaling (Białas *et al.*, 2018; Varden *et al.*, 2017). In the zigzag model, resistant plants are able to directly or indirectly sense effectors through intracellular nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (LRR) receptors (NLRs; a.k.a. nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors) (Adachi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017). Sensing of effectors by NLRs leads to NLR-triggered immunity (NTI; a.k.a. effector-triggered immunity (ETI) (Boutrot and Zipfel, 2017). Pathogens may then evolve new effector(s) able to suppress NTI and plants can evolve new NLRs in order to counter pathogen infection. Although this zigzag model is mainly valid and still largely used, it does not take into account some cases of plant immunity, suggesting that there may be no clear distinction between PTI and NTI or MAMPs/DAMPs and effectors. For instance, some apoplastic avirulence (Avr) proteins secreted by microorganisms and also considered as effectors are recognized by PRRs (de Wit, 2016b). To address the limitations and inconsistencies of the zigzag model, alternative concepts of plant immunity have been proposed recently and are based on the recognition of microbial invasion via invasion patterns (IPs) that include all microbe-derived or plant-derived molecules (Cook *et al.*, 2015; Kanyuka and Rudd, 2019). IPs therefore encompass MAMPs, effectors (both apoplastic and cytosolic) and DAMPs, as well as any other microbe-derived or plant-derived evolutionary conserved or variable molecules

*Correspondence: Email: stephan.dorey@univ-reims.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

that signal the pathogen invasion and trigger an immune response (Kanyuka and Rudd, 2019). In these models, IPs are sensed by IP receptors (IPRs). In the most recent model, IPRs are divided either in cell surface immune receptors (CSIRs) synonymous to PRRs that include RKs and RLPs or intracellular immune receptors (IIRs), mainly synonymous to NLRs (Kanyuka and Rudd, 2019). In the present review, to avoid any ambiguity, we will therefore use the general term of IPs that encompasses all molecules perceived by the plant as a danger without distinction of their origin or their potential function.

Although IP sensing at the plasma membrane through proteinaceous PRRs is well documented, an increasing number of studies has highlighted a key role of membrane lipids in the direct or indirect recognition of some IPs by plant cells. Indeed, several molecules such as necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like (NLP) proteins, harpins, rhamnolipids and lipopeptides trigger plant immunity through lipid receptors and/or potential membrane lipid-raft structure perturbations (Farace *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2011; Klemptner *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 2012). Moreover, several synthetic compounds that mimic IP-triggered plant signalling or perception are known to interact with biological or biomimetic lipid-based membranes and trigger plant immunity (Bektas and Eulgem, 2015; Luzuriaga-Loaiza *et al.*, 2018; Nasir *et al.*, 2017).

In this context, the main goal of this review is to present an overview of well-characterized apoplastic IPs (either microbe- or plant-derived) and summarize the current knowledge on their mode of perception at the plasma membrane through proteinaceous PRRs and/or lipid-driven processes.

IPs sensed by PRRs or involving known RK co-receptors

Apoplastic IPs display a large diversity of biochemical nature, including (glyco)protein-, polysaccharide- and lipid-based structures (summarized in Table 1). Most of these IPs characterized to date are known to be sensed by PRRs. For the majority of these IP/PRR couples, evidence for direct binding has been given through biochemical experiments. Proteinaceous PRRs are generally composed of an extracellular domain that binds the IP, a transmembrane domain and for some of them an intracellular kinase domain. A first distinction between PRRs can be made based on the nature of the extracellular domain such as LRR-, LysM-, Lectin-, EGF-like-based domains (Fig. 1). A second distinction among PRRs can be made between RKs that display an intracellular kinase domain and RLPs without a kinase domain. In addition, IP perception through PRR activation has been linked to RK co-receptors involved in signal transduction. The RK co-receptors BAK1, SOBIR1 (both with an extracellular LRR-type domain) and CERK1 (with an extracellular LysM-type domain) are the best known and are major modulators of PTI (Couto and Zipfel, 2016) (Fig. 1).

Protein-derived IPs sensed by LRR-RK-type PRRs

Bacterial protein-derived IPs are the most studied apoplastic plant immune-inducing molecules. Among them, flagellin, a subunit protein of the flagellum present in many bacteria including *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species, is the best characterized. As flagella are essential structures for bacterial fixation to host cells and motility, flagellin is an optimal target for the plant immune system. Flagellin monomers can be found in the extracellular space either during flagellum construction or due to damage to flagellar filaments (Gómez-Gómez and Boller, 2002). It was recently demonstrated in *Nicotiana benthamiana* that plant-secreted β -galactosidase 1 (BGAL1) promotes hydrolytic release of the active IP from glycosylated flagellin. BGAL1 acts in immunity against pathogenic *Pseudomonas syringae* strains only when they carry a terminal modified viosamine in the flagellin O-glycan. Interestingly, *P. syringae* pathovars are able to evade host immunity by using BGAL1-resistant O-glycans or by producing a BGAL1 inhibitor (Buscaill *et al.*, 2019). Although flagellin is perceived by a large set of plants, the peptide sequence necessary for recognition and the cognate PRRs vary among plant species (Boller and Felix, 2009; Trdá *et al.*, 2015). For instance, a 22-amino acid peptide (flg22), originating from the N-terminal extremity of flagellin is perceived by FLS2, a LRR-RK present in several monocots and eudicots (Chinchilla *et al.*, 2006; Gómez-Gómez and Boller, 2000; Gómez-Gómez *et al.*, 1999). In tomato, FLS3 senses another part of flagellin, flgII-28, independently of FLS2 (Hind *et al.*, 2016).

Elf18, an 18-amino acid-long sequence originating from the N-terminal part of bacterial elongation factor Tu (EF-Tu), has also been widely studied for its ability to induce a plant immune response (Zipfel *et al.*, 2006). EF-Tu is localized at the bacterial surface (in outer membrane vesicles) and in the secretome of several bacteria (Katsir and Bahar, 2017; Zipfel *et al.*, 2006). EF-Tu and its elf18 peptide are perceived by the LRR-RK EFR in *Arabidopsis thaliana* (hereafter, *Arabidopsis*). Interestingly, elf18 does not trigger immunity-related mechanisms in plants outside the Brassicaceae, unlike flg22 (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Similarly, the conserved domains of bacterial cold shock protein (CSP), csp15 and csp22, are perceived by the LRR-RK CORE that is only present in Solanaceae (Felix and Boller, 2003; Wang *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2018). CSPs are intracellular (cytoplasmic) proteins and how they become available for perception by PRRs is still nebulous. XUP25 peptide, originating from *P. syringae* uracil/xanthine permease, induces immunity through the LRR-RK XPS1 in *Arabidopsis* (Mott *et al.*, 2016). How the peptide is liberated from the main protein remains unknown. Plant proteases that participate in plant immunity could be involved in the process (Balakireva and Zamyatnin, 2018). Until now, no RK co-receptor required for signal transduction has been associated with XPS1. It should be noted that the majority of the protein-derived IPs

Table 1 Examples of apoplastic invasion patterns (IPs) with known or putative perception systems in plants

IPs	Perception	Phylogenetic origin	Cellular origin	References
IPs sensed by PRRs or involving known RKs				
<i>Protein-derived IPs sensed by LRR-RK-type PRRs</i>				
Flg22	LRR-RK FLS2	Bacteria	Flagella	Chinchilla <i>et al.</i> (2006); Gómez-Gómez and Boller (2000); Gómez-Gómez <i>et al.</i> (1999)
FlgII-28	LRR-RK FLS3	Bacteria	Flagella	Hind <i>et al.</i> (2016)
Elf18	LRR-RK EFR	Bacteria	Cytoplasm, secretome, cell surface	Kunze <i>et al.</i> (2004); Zipfel <i>et al.</i> (2006)
CSP	LRR-RK CORE	Bacteria	Cytoplasm	Felix and Boller, (2003); Wang <i>et al.</i> (2016), Wei <i>et al.</i> (2018)
XUP25	LRR-RK XPS1	Bacteria	Plasma membrane	Mott <i>et al.</i> (2016)
RaxX	LRR-RK XA21	Bacteria	Secretome	Pruitt <i>et al.</i> (2015)
<i>(Glyco)protein-derived IPs sensed by RLP-type PRRs</i>				
PGNs	LysM-RLPs LYM1/LYM3 and LYP4/LYP6	Bacteria	Cell wall	Gust <i>et al.</i> (2007)
NLPs	LRR-RLP RLP23	Bacteria, oomycete, fungi	Secretome	Albert <i>et al.</i> (2019); Böhm <i>et al.</i> (2014)
Elicitins	LRR-RLP ELR (INF1) and S-domain lectin RK NgRLK1 (capsicein)	Oomycete	Secretome	Du <i>et al.</i> (2015); Kim <i>et al.</i> (2010)
Ave1	LRR-RLP Ve1	Fungi, bacteria	Secretome	de Jonge <i>et al.</i> (2012)
Avr4	LRR-RLP Cf-4	Fungi	Secretome	Postma <i>et al.</i> (2016)
Avr9	LRR-RLP Cf-9	Fungi	Secretome	Rowland <i>et al.</i> (2005)
Avr2	LRR-RLP Cf-2 by targeting Rcr3	Fungi	Secretome	de Wit (2016b); Rooney <i>et al.</i> (2005); Van't Klooster <i>et al.</i> (2011)
Gr-VAP1	LRR-RLP Cf-2 by targeting Rcr3	Nematode	Secretome	Lozano-Torres <i>et al.</i> (2012)
EIX	LRR-RLP LeEix2	Fungi	Secretome	Bar <i>et al.</i> (2010); Ron and Avni (2004)
PGs	LRR-RLP RBPG1	Fungi	Secretome	Zhang <i>et al.</i> (2014)
<i>Protein-derived IPs sensed by unidentified PRRs but requiring RK co-receptors</i>				
CBEL	Co-receptor BAK1	Oomycete	Cell wall	Larroque <i>et al.</i> (2013)
GroEL	Co-receptor BAK1	Bacteria (aphid endosymbiont)	Cytoplasm	Chaudhary <i>et al.</i> (2014)
BcSpl1	Co-receptor BAK1	Fungi	Secretome	Frías <i>et al.</i> (2011, 2013)
RcCDI1	Co-receptors BAK1 and SOBIR1	Fungi	Secretome	Franco-Orozco <i>et al.</i> (2017)
VmE02	Co-receptor BAK1	Fungi	Secretome	Nie <i>et al.</i> (2019)
BcXyl1	Co-receptors BAK1 and SOBIR1	Fungi	Secretome	Yang <i>et al.</i> (2018)
XEG1	Co-receptor BAK1	Oomycete	Secretome	Ma <i>et al.</i> (2015)
<i>Lipid-derived and polysaccharide-derived IPs from microbial origin</i>				
LPS/LOS	Co-receptor CERK1	Bacteria	Cell wall	Desaki <i>et al.</i> (2018)
Medium-chain 3-hydroxy fatty acids	Bulb-type lectin RK LORE	Bacteria	Unknown	Kutschera <i>et al.</i> (2019)

(Continues)

Table 1 (Continued)

IPs	Perception	Phylogenetic origin	Cellular origin	References
Chitin	LysM-RLPs CEBIP and LYP4/ LYP6 LysM-RKs LYK5 and VvLYK1-1 /VvLYK1-2	Fungi, arthropod, oomycete	Cell wall, exoskeleton	Cao <i>et al.</i> (2014); Hayafune <i>et al.</i> (2014); Liu <i>et al.</i> (2012)
Chitosan	Potential WAK1 and GsSRK receptors LysM-RKs VvLYK1-1 / VvLYK1-2	Fungi	Cell wall	Brulé <i>et al.</i> (2018); Liu <i>et al.</i> (2018)
IPs from plant origin				
AtPep1/2/3	LRR-RKs PEPR1/PEPR2	Plant	Cytoplasm	Krol <i>et al.</i> (2010)
PIP1/2	LRR-RK RLK7	Plant	Secretome	Hou <i>et al.</i> (2014)
Systemin	LRR-RKs SYR1/SYR2 and LRR-RK PORK1	Plant	Cytoplasm	Santamaria <i>et al.</i> (2018); Wang <i>et al.</i> (2018); Xu <i>et al.</i> (2018)
eATP	L-type lectin RK DORN1	All reign	Cytoplasm	Choi <i>et al.</i> (2014)
β -(1,3)- glucans	Co-receptor CERK1	Plant	Vacuole	Mélida <i>et al.</i> (2018)
OGs	WAK1 RK	Plant	Cell wall	Brutus <i>et al.</i> (2010)
IPs sensed through plasma membrane lipid interaction				
Proteinaceous IPs				
NLPs	GIPCs	Bacteria, oomycete, fungi	Secretome	Lenarčič <i>et al.</i> (2017)
Harpins	Lipids	Bacteria	Secretome	Choi <i>et al.</i> (2013); Lee <i>et al.</i> (2001)
Elicitins	Sterols	Oomycete	Secretome	Derevnina <i>et al.</i> (2016); Gerbeau-Pissot <i>et al.</i> (2014)
Lipid-based IPs				
Ergosterol	Lipid raft disturbance	Fungi	Plasma membrane	Rossard <i>et al.</i> (2010); Xu <i>et al.</i> (2001)
Lipopeptides	Phospholipids	Bacteria	Secretome	Henry <i>et al.</i> (2011)
RLs	Phosphatidylcholines/POPC/ phosphatidylinositol/ phosphatidylglycerol/ β -sitosterol/ glucosylceramide	Bacteria	Secretome	Sanchez <i>et al.</i> (2012); Monnier <i>et al.</i> (2019)
SRBs	PLPC/ β -sitosterol	Synthetic	/	Luzuriaga-Loiaza <i>et al.</i> (2018)
Ac-RL/ Alk-RL	PLPC/ β -sitosterol	Synthetic	/	Nasir <i>et al.</i> (2017)
Polysaccharide-derived structures				
Chitosan	Phospholipids	Fungi	Cell wall	Amorabé <i>et al.</i> (2000); Rossard <i>et al.</i> (2010)

GIPC, glycosyl inositol phosphoryl ceramide (sphingolipid); PLPC, 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (phospholipid); POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (phospholipid).

originating from microbes and sensed by LRR-RK-type PRRs are not secreted but are microbial constituents. To date, the RaxX tyrosine-sulphated protein that is secreted by Gram-negative bacteria (in particular *Xanthomonas* species) and sensed by the rice LRR-RK XA21 (Pruitt *et al.*, 2015) is the only exception. Interestingly, XA21 interacts with the rice BAK1 orthologue, OsSERK2. All these PRRs (excepted XPS1 for which it has not yet been investigated) require the co-receptor BAK1 or an orthologue to trigger signal transduction.

(Glyco)protein-derived IPs sensed by RLP-type PRRs

The bacterial cell wall is well known to be a source of IPs. Peptidoglycans (PGNs), which provide rigidity and structure to the bacterial cell wall in both Gram-negative and Gram-positive bacteria, induce innate immunity in monocots and eudicots. Muropeptides that are PGN breakdown products from *Agrobacterium* and *Xanthomonas* are sensed by *Arabidopsis* (Erbs *et al.*, 2008). In addition, *Staphylococcus aureus* PGNs mediate immune stimulation in *Arabidopsis* based on recognition of

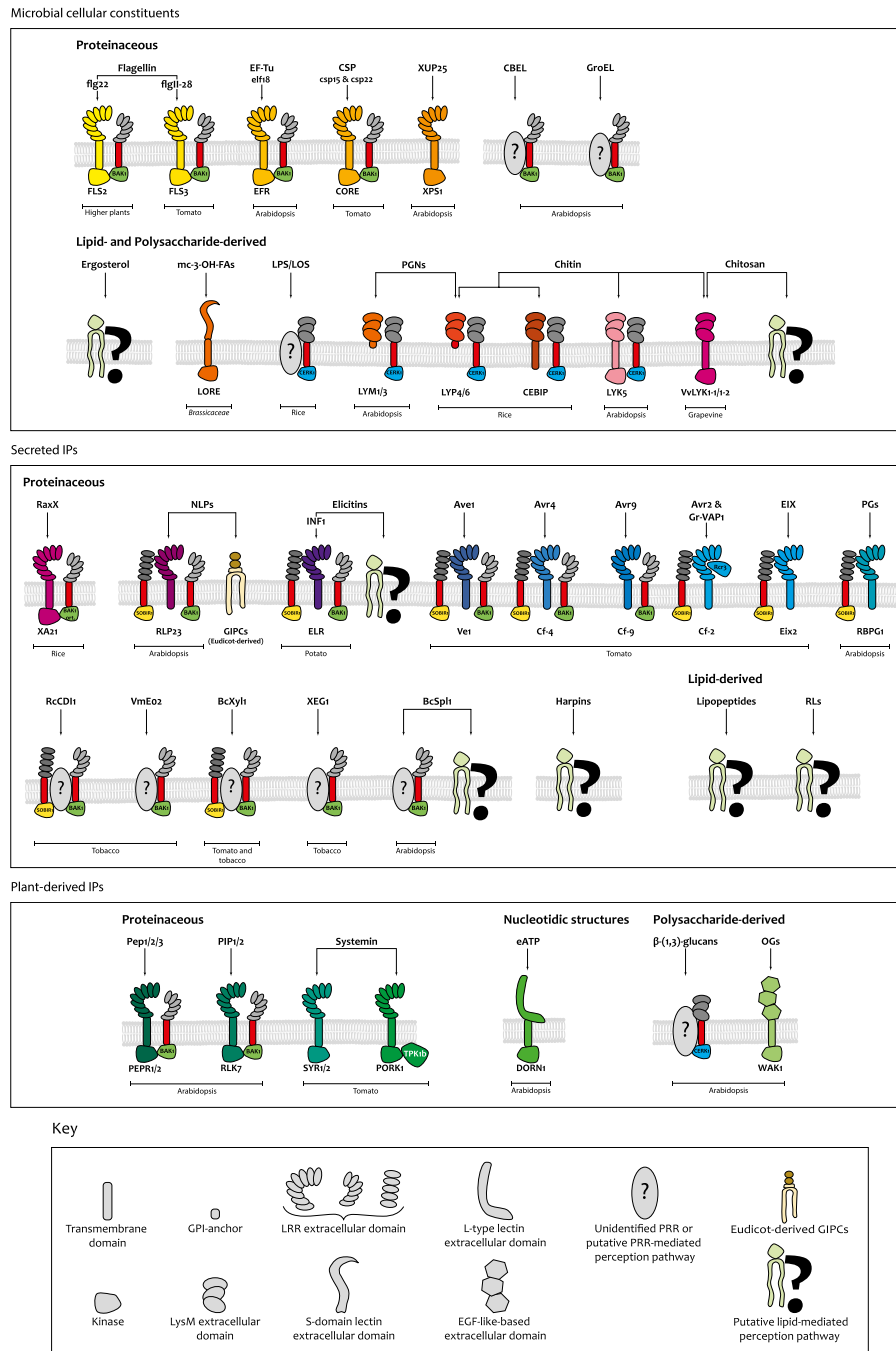


Fig. 1 Representation of invasion pattern (IP) perception through known or potential pattern recognition receptors (PRRs) or involving plasma membrane lipids. CBEL, cellulose binding elicitor lectin; CSP, cold shock protein; EIX, ethylene-inducing xylanase; GIPC, glycosyl inositol phosphoryl ceramide; GPI, glycosylphosphatidylinositol; LOS, lipooligosaccharides; LPS, lipopolysaccharides; LRR, leucine-rich repeat; NLP, necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like; OGs, oligogalacturonides; ort., orthologue; PGNs, peptidoglycans; PGs, endopolysaccharides; RLs, rhamnolipids.

the PGN sugar backbone (Gust *et al.*, 2007). Perception of PGNs in *Arabidopsis* involves the co-receptor CERK1 and the LysM domain RLPs LYM1 and LYM3 (Willmann *et al.*, 2011). Notably, CERK1 is also necessary for signal transduction upon chitin perception in this plant (Miya *et al.*, 2007). In rice, LYP4 and LYP6, the homologous RLPs of LYM1 and LYM3, mediate PGNs and chitin sensing by interacting with CERK1 (Cao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012). Whereas the majority of protein-derived IPs is perceived by LRR-type PRRs, it is interesting to notice that PGNs are sensed by LysM-type PRRs, clearly suggesting that it is the glycan part of the molecule that is recognized by plants. Although PGNs are present in the outer leaflet of Gram-positive bacteria, they are localized in the periplasmic space under the outer membrane in Gram-negative bacteria and are therefore hardly available for perception by PRRs (Silipo *et al.*, 2010). However, plants can produce apoplastic PGN hydrolases such as LYS1 that could release elicitor PGN fragments from insoluble bacterial cell walls (Liu *et al.*, 2014).

Numerous protein-derived IPs are secreted in the apoplast by pathogens. Their direct accessibility to PRRs makes them interesting targets for the plant immune system. NLPs form a family of proteins secreted by phytopathogenic bacteria, oomycetes and fungi (Gijzen and Nurnberger, 2006; Lenarčič *et al.*, 2017). These proteins, characterized by their necrosis-inducing *Phytophthora* protein1 (NPP1) domain, induce plant immunity and cell death in eudicot plant species (Lenarčič *et al.*, 2017; Qutob *et al.*, 2006). The PRR-mediated sensing of nlp20, a conserved 20-mer fragment from NLPs, has been identified in *Arabidopsis* and involves the LRR-RLP RLP23 and the SOBIR1/BAK1 complex (Albert *et al.*, 2015; Böhm *et al.*, 2014). Elicitins, first characterized in the 1980s, are IPs secreted by the oomycetes *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. (Ricci *et al.*, 1989). They induce defence responses and a localized programmed cell death called hypersensitive response (HR) in various plant species (Derevnina *et al.*, 2016). The LRR-RLP ELR from potato is able to sense the elicitor INF1 and associates with BAK1 and SOBIR1 to activate defence responses (Domazakis *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2015). In tomato, elicitor perception involves the co-receptor/adaptor kinase SOBIR1 that associates with several RLPs to induce plant immunity (Gust and Felix, 2014; Peng *et al.*, 2015). Interestingly, unlike INF1, the *Phytophthora capsici* capsicein was shown to interact *in vitro* with the S-domain lectin RK NgRLK1 from *Nicotiana glutinosa* (Kim *et al.*, 2010).

Several IPs, often referred to as apoplastic effectors according to the zigzag model, are perceived by RLP-type PRRs. Ave1 secreted by *Verticillium dahliae* is sensed by the RLP Ve1 in tomato (de Jonge *et al.*, 2012) and this perception requires BAK1 (Fradin *et al.*, 2009) and SOBIR1 (Liebrand *et al.*, 2013). Interestingly, Ave1 is homologous to plant natriuretic peptides (PNPs), which are mobile signalling hormones secreted in the apoplast under

biotic and abiotic stresses and for which a cognate plasma membrane LRR-RK has been characterized in *Arabidopsis* (Turek and Gehring, 2016). Avr4 and Avr9 are two other fungal proteins secreted by *Cladosporium fulvum*. They promote, respectively, Cf-4 and Cf-9 RLP association with BAK1 to initiate an immune response in tomato. Avr2, another *C. fulvum* effector, is recognized by the RLP Cf-2. Cf-4- and Cf-2-mediated immunity both require SOBIR1 as co-receptor (Liebrand *et al.*, 2013; Postma *et al.*, 2016). Interestingly, Avr2 is also able to inhibit the apoplastic tomato cysteine protease Rcr3 and the direct interaction is necessary to trigger Cf-2-dependent HR and resistance to *C. fulvum* (Rooney *et al.*, 2005; Van't Klooster *et al.*, 2011). Reminiscent of the Avr2/Rcr3/Cf-2 mechanism of perception, the nematode venom allergen-like protein Gr-VAP1, involved in *Globodera rostochiensis* virulence, targets the Rcr3 protein from *Solanum pimpinellifolium* (Lozano-Torres *et al.*, 2012).

Some phytopathogenic fungi, mostly necrotrophs, secrete cell wall-degrading enzymes (CWDE) (Kubicek *et al.*, 2014). Some of these enzymes are directly recognized by plant cells and not through the DAMPs that could be produced by their lytic activity. This is the case of xylanases involved in hemicellulose degradation. The fungal ethylene-inducing xylanase (EIX) is directly perceived by tomato cells through the RLP Eix2, leading to activation of defence responses and induction of an HR (Bar *et al.*, 2010; Ron and Avni, 2004). Moreover, Eix2 interacts with SOBIR1 (Liebrand *et al.*, 2013). Endopolygalacturonases (PGs) are other fungal CWDEs that degrade pectins and act as virulence factors for several fungal pathogens. In *Arabidopsis*, the LRR-RLP RBPG1 has been identified as a receptor for BcPG2, BcPG3, BcPG4 and BcPG6 originating from *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger*. This recognition process involves the co-receptor SOBIR1 (Zhang *et al.*, 2014). In grapevine, BcPG1, an endopolygalacturonase from *B. cinerea*, was shown to activate plant defence responses independently of its enzymatic activity, also suggesting a direct recognition in this plant (Poinssot *et al.*, 2003). Remarkably, all these LRR-type RLPs lacking the cytoplasmic signalling competent moiety require the RK co-receptors SOBIR1 and/or BAK1 for signal transduction (Liebrand *et al.*, 2014).

Protein-derived IPs sensed by unidentified PRRs but requiring RK co-receptors

Many of the previously described RK or RLP PRRs have been identified through forward or reverse genetic approaches and for most of them a direct interaction with the corresponding IP has been confirmed by receptor-ligand binding experiments. However, for a number of IPs known to induce plant immunity, their cognate receptor is not yet identified albeit the involvement of RK co-receptors has been highlighted.

CBEL (cellulose binding elicitor lectin), a glycoprotein from the cell wall of *Phytophthora nicotianae*, is perceived by *Arabidopsis* and tobacco. In *Arabidopsis*, BAK1 is necessary for CBEL-mediated immunity (Larroque *et al.*, 2013). Interestingly, its cellulose-binding domain (CBD) is sufficient to induce plant defence responses (Gaulin *et al.*, 2006). The intracellular chaperonin GroEL from the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* was also shown to induce a BAK1-dependent immune response in *Arabidopsis* (Chaudhary *et al.*, 2014). BcSpl1, an abundant cerato-platanin protein present in the secretome of the necrotrophic fungus *B. cinerea*, triggers a BAK1-dependent HR in tomato, tobacco and *Arabidopsis* (Frias *et al.*, 2011, 2013). Similarly, the small cysteine-rich protein VmE02 secreted by another necrotrophic fungus *Valsa mali* and XEG1, a *Phytophthora sojae* secreted glycoside hydrolase, triggers plant defences and cell death in a BAK1-dependent manner in tobacco (Ma *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2019). For some IPs, the involvement of both BAK1 and SOBIR1 in plant immunity associated with an HR has been demonstrated. This is the case for RcCD11, a small protein with an unknown function secreted by *Rhynchosporium commune*, which is only recognized by eudicots (Franco-Orozco *et al.*, 2017) and the *B. cinerea* xylanase BcXyl1 active on tobacco and tomato (Yang *et al.*, 2018). It should be noted that the co-receptors BAK1 and SOBIR1 are only involved in the perception of protein-derived IPs so far. In addition, SOBIR1 has only been linked to the perception of secreted IPs.

Lipid-derived and polysaccharide-derived IPs from microbial origin

Lipopolysaccharides (LPS) and lipooligosaccharides (LOS) are major constituents of bacterial Gram-negative cell walls and are well known for inducing immunity in several plant species (Desender *et al.*, 2006; Dow *et al.*, 2000). LPS consist of a lipid A portion, an oligosaccharide core and an *O*-polysaccharidic extremity. In tobacco, treatment with lipid A induces late-phase defence responses while the oligosaccharide core induces early immune responses (Erbs and Newman, 2012; Silipo *et al.*, 2005). In *Arabidopsis*, the lipid A fragment carries the minimal molecular pattern recognized by plants (Ranf *et al.*, 2015). Recently, it was shown that the Brassicaceae specific bulb-type lectin RK LORE recognizes medium-chain 3-hydroxy fatty acid (mc-3-OH-FA) metabolites present in the lipid A structures from *Pseudomonas* and *Xanthomonas* bacteria (Kutschera *et al.*, 2019). mc-3-OH-FAs are sensed in a chain length- and hydroxylation-specific manner. Interestingly, bacterial compounds comprising mc-3-OH-acyl building blocks but devoid of free mc-3-OH-FAs (such as lipid A but also lipopolysaccharides, rhamnolipids, lipopeptides and acyl-homoserine-lactones) do not trigger LORE-dependent immunity (Kutschera *et al.*, 2019). Recently, it has also been shown that

LPS can induce LORE-independent immunity in *Arabidopsis* (Shang-Guan *et al.*, 2018). Interestingly, in rice the perception of LPS is partly dependent on CERK1, while this co-receptor is not involved in LPS sensing in *Arabidopsis* (Desaki *et al.*, 2018; Ranf *et al.*, 2015). This indicates that LPS perception mechanisms in monocots and eudicots could require different receptor complexes and potentially different molecular patterns. LPS, as constituents of the cell wall, are hardly available for plant cell perception and the exact mechanisms of LPS delivery to plant cells is not fully understood. Surfactants were shown to promote the release of LPS from bacterial cells (Al-Tahhan *et al.*, 2000) and plant lipid binding protein (LBP)-like proteins or bacterial outer membrane vesicles could also be involved in LPS delivery (Iizasa *et al.*, 2016; Katsir and Bahar, 2017).

Plant genomes encode several hydrolytic enzymes, including chitinases and glucanases commonly known as pathogenesis-related (PR) proteins that can use the fungal cell wall as a substrate to release chitin and glucans (Pusztahelyi, 2018). Chitin, an homopolymer of β -(1,4)-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) present in fungi and oomycete cell wall and arthropod exoskeleton, is a widespread IP perceived by monocot and eudicot plants. Perception of chitin and chitin-derived oligosaccharide structures by plants depends on the acetylation and/or the polymerization degree of these compounds (Pusztahelyi, 2018). Chitin perception in rice and *Arabidopsis* implies PRRs sharing a similar extracellular LysM domain (Cao *et al.*, 2014). In rice, the RLP OsCEBIP binds chitin and interacts with OsCERK1 to trigger signalling events (Hayafune *et al.*, 2014). The LYP4 and LYP6 CEBIP-like RLPs from rice are also able to bind chitin and are partially involved in its recognition by the plants (Liu *et al.*, 2012). In *Arabidopsis*, CERK1 is also necessary for chitin sensing. This LysM-containing RK interacts with chitin and LYK5, another LysM RK, to induce defence responses (Cao *et al.*, 2014). Chitosan, a modified form of chitin only found in fungi that possess deacetylase enzymes, is also perceived by several plants (Hadwiger, 2013; Zuppini *et al.*, 2004). Chitosan oligosaccharide binding proteins were recently identified from the plasma membrane of wheat leaf cell and include W5G2U8, a potential WAK1 receptor protein, and W5HY42 and W5I0R4, which are potential GsSRK (G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinases) receptor proteins (Liu *et al.*, 2018). Whether these proteins directly interact with chitosan is still unknown. Recently, it was demonstrated that chitin and chitosan perception involves VvLYK1-1 and VvLYK1-2 in grapevine (Brulé *et al.*, 2018). β -(1,6)-glucans, important polysaccharides from fungi and oomycetes, have been extensively studied for their capacity to induce an immune response in plants. How these molecules are sensed by plants, however, is poorly understood (Fesel and Zuccaro, 2016). Remarkably, the extracellular domains of PRRs involved in the recognition of polysaccharide-derived IPs from microbes and characterized to date are only from LysM-types.

IPs from plant origin

Plants are able to detect damage caused by pathogens or pests (Gust *et al.*, 2017). Among IP endogen peptides, AtPeps are the best known. AtPep1, AtPep2 and AtPep3 are perceived by the LRR-RKs PEPR1 and PEPR2 in *Arabidopsis* (Krol *et al.*, 2010). AtPep1 is derived from the C-terminus part of PROPEP1 protein and is over-expressed following wounding, cell wall degradation and IP perception (Krol *et al.*, 2010). Similarly, PIP1 and PIP2, two other pathogen-inducible endogen peptides, are recognized by plants. After infection, prePIP1 and prePIP2 are secreted in the extracellular space and cleaved at the C-terminus. The LRR-RK RLK7 participates in the perception of PIP1 (Hou *et al.*, 2014).

Systemin is an 18 amino acid peptide from Solanaceae released in the apoplast by an unknown mechanism. Systemin interacts with the LRR-RKs SYR1 and SYR2 to induce defence against insect herbivory (Wang *et al.*, 2018). PORK1, another LRR-RK from tomato closely related to the SYR1 and SYR2 proteins, is also required for systemin-induced defences (Xu *et al.*, 2018). Whether SYR1/2 could act in concert with PORK1 remains to be investigated. PORK1 interacts and phosphorylates the protein kinase TPK1b to induce systemin-driven immunity. Interestingly, systemin treatment does not induce ROS production and phosphorylation cascade activation is not reduced in the PORK1 RNAi line (Xu *et al.*, 2018), suggesting that systemin also induces PORK1-independent defence mechanisms in plants.

DORN1, a purinoreceptor from the L-type lectin RK family, senses extracellular ATP (eATP) in *Arabidopsis* and is necessary for eATP-mediated defence induction. Interestingly, it only perceives eATP and no other eNTPs (Choi *et al.*, 2014). How eATP is available for perception by the PRR remains unknown. One hypothesis could be a release by cellular lysis upon pathogen infection. Even though other nucleotidic molecules like bacterial RNAs (Lee *et al.*, 2016) and extracellular small DNA fragments (Duran-flores and Heil, 2018) are known to induce plant immunity, only eATP was identified with a cognate PRR.

Although β -(1,6)-glucans are generally specific of fungi and oomycetes, β -(1,3)-glucans are naturally present in plant cell walls (Fesel and Zuccaro, 2016). In *Arabidopsis*, it was recently shown that non-branched β -(1,3)-glucans sensing requires CERK1, the co-receptor also involved in chitin perception (Mélida *et al.*, 2018). Laminarin, a β -(1,3)-glucan polymer with β -(1,6) branches produced by *Laminaria digitata* alga, induces a PTI in several plants, including grapevine (Aziz *et al.*, 2003), tobacco (Klarzynski *et al.*, 2000) and *Arabidopsis* (Ménard *et al.*, 2004). Interestingly, a sulphated-derived structure of this β -(1,3)-glucan is even more active (Menard *et al.*, 2004; Trouvelot *et al.*, 2008). Oligogalacturonides (oligomers of α -(1,4)-linked galacturonosyl residues, OGs), released from pectin after degradation by fungal polygalacturonases, associate with WAK1, a singular EGF-like-RK to trigger plant immunity (Brutus *et al.*, 2010). Overall, plant protein-derived IPs are sensed by receptors carrying an LRR

domain (like microbial IPs) and more specifically belonging to the RK family. In addition, plant β -(1,3)-glucan recognition requires the co-receptor CERK1, which is mainly associated with LysM-type PRRs and is also involved in the sensing of polysaccharide-derived IPs from microbes.

IPs sensed through plasma membrane lipid interaction

Like proteins, lipids are major components of plasma membranes. Lipids, as the first components encountered by IPs able to bind or insert into plant plasma membranes, could participate in their initial sensing and the establishment of a 'danger'-related immune response. Various studies suggest that some IPs may directly interact with lipids (and not PRRs) either modulating plasma membrane physical properties (driven by insertion between lipids and/or membrane damages) or, as demonstrated more recently, using lipid decoration as the receptor/target (Mamode-Cassim *et al.*, 2019). In all cases, this interaction of IPs with plasma membrane lipids could change the behaviour and functions of membrane microdomains/nanodomains containing a variety of integral membrane proteins, such as mechanoreceptors, ion channels, membrane receptors and enzymes. The changes in location and/or activity of membrane proteins after lipid binding could lead to immune signalling activation (Fig. 1). IPs interacting with plasma membrane lipids are often of hydrophobic or amphiphilic nature and include proteinaceous, lipid-derived or polysaccharide-derived structures (Table 1). Moreover, some of these compounds can be classified as or are related to toxin-like compounds.

Proteinaceous IPs

The best recent example of IPs directly binding to lipids is represented by cytotoxic NLPs. NLP-mediated phytotoxicity and plant defence gene expression are closely related, suggesting that toxin-mediated interference with host integrity triggers plant immunity-associated responses. This phytotoxin-mediated activation of plant immunity is reminiscent of microbial toxin-induced inflammasome activation in vertebrates, which results in secretion of cytokines and programmed pro-inflammatory cell death (Ottmann *et al.*, 2009; Qutob *et al.*, 2006). Even though a 20-mer conserved fragment from NLPs induces plant immunity through RLP23/SOBIR1/BAK1 protein complex, cytotoxic NLPs also directly bind to glycosyl inositol phosphoryl ceramide (GIPC) (Lenarčič *et al.*, 2017). GIPCs are the most abundant sphingolipids in plant membranes and comprise 60–80% lipids in the outer leaflet of the plasma membrane (Lenarčič *et al.*, 2017; Van den Ackerveken, 2017). NLPs can bind terminal monomeric hexose moieties of GIPCs, resulting in conformational changes within the protein. The NLP/GIPC binding has been quantified by surface plasmon resonance analysis with a dissociation constant of

around 300 nM in *Arabidopsis*. Only eudicot plants are affected by NLPs. Insensitivity of monocot plants to NLPs may be explained by the length of the GIPC headgroup, consisting of three-terminal hexoses instead of two for eudicots (Lenarčič *et al.*, 2017; Van den Ackerveken, 2017). NLPs are known as toxin-like or virulence factors, therefore sphingolipids described as 'receptors' could also be considered as 'targets' for NLPs. However, it can be assumed that both the PRR recognition and the toxin-like effects through lipid binding could act in concert to be used by the plant to perceive a 'danger' and to activate a strong innate immune response leading to an active plant cell death process (Qutob *et al.*, 2006). Similarly, the cerato-platanin BcSpl1 secreted by a necrotrophic fungus could be recognized as a 'danger' signal via a BAK1-dependent process and a less specific and indirect sensing through lipid-driven perturbation. Accordingly, BcSpl1 was shown to associate with the plant plasma membrane, triggering rapid morphological changes at the cellular level (Frias *et al.*, 2014).

Harpins are proteins secreted by type III secretion systems of Gram-negative bacteria like *Erwinia amylovora* and have been very well known as IPs since the 1990s (Baker *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1992). Harpins induce defence responses in several plant species (Choi *et al.*, 2013). They are able to interact with lipids to form pores in artificial membranes and they participate in virulence to several bacteria (Choi *et al.*, 2013). Interestingly, a non-proteinaceous harpin binding site has been characterized in tobacco plasma membranes. It mediates activation of the PR gene *HIN1* through mitogen-activated protein kinase activity, independently of extracellular calcium fluxes (Lee *et al.*, 2001). Elicitins and cryptogein in particular are known to bind sterols and other lipids with various affinities. Independent studies have revealed that elicitors can act as sterol carriers by scavenging sterols from synthetic liposomes and plant plasma membranes (Derevnina *et al.*, 2016). Elicitor-induced cell death could be due to disruption of plant plasma membrane integrity upon interaction. Interestingly, long-chain bases sphingolipids (LCBs) and their phosphorylated derivatives present in the plasma membrane differentially regulate cryptogein-induced production of reactive oxygen species (ROS) in tobacco cells (Coursol *et al.*, 2015). In addition, the use of fluorescence recovery after photobleaching revealed an increase in plasma membrane fluidity induced by cryptogein, but not by flagellin (Gerbeau-Pissot *et al.*, 2014). As for NLPs, it can be postulated that both PRR recognition and lipid-driven perturbations could act participate in elicitor-related strong immune responses.

Lipid-based IPs

Several lipid-derived IPs have already been discovered, including arachidonic acid, eicosapolyenoic acid (Bostock *et al.*, 1981, 2011; Robinson and Bostock, 2015) and cerebroside (Umemura

et al., 2002, 2004). However, little is known about their perception by plants.

Ergosterol, a fungi-specific sterol, induces immunity-related markers in tobacco and tomato (Klemptner *et al.*, 2014). Interestingly, this molecule triggers apoplastic medium alkalization in tomato, unlike plant sterols (Granado *et al.*, 1995). It has been hypothesized that plants either possess an ergosterol receptor or that ergosterol uptake could lead to perturbations of lipid raft structures because of their ability to form very stable microdomains (Klemptner *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2001). In this respect, ergosterol directly affects *Beta vulgaris* plasma membrane H⁺-ATPase activities, indicating that it could impact the structural organization of lipid rafts from this plant plasma membrane (Rossard *et al.*, 2010).

Cyclic lipopeptides are amphiphilic molecules produced by a large variety of bacteria such as *Streptomyces*, *Pseudomonas* and *Bacillus* (Raaijmakers *et al.*, 2010). Lipopeptides have emerged as key players in the induction of plant immunity driven by beneficial microorganisms (Falardeau *et al.*, 2013; Raaijmakers *et al.*, 2010). *Bacillus subtilis* is known to produce three main families of cyclic lipopeptides, namely surfactins, iturins and fengycins (Falardeau *et al.*, 2013). Mycosubtilin, a lipopeptide from the iturin family, plipastatin from the fengycin family and surfactin activate immunity-related markers in grapevine, cotton and *Arabidopsis* (Debois *et al.*, 2015; Farace *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015). Mycosubtilin and fengycin are known to interact with membrane lipids (Deleu *et al.*, 2005, 2008; Maget-Dana and Ptak, 1990; Nasir *et al.*, 2010). Massetolide A, secreted by *Pseudomonas fluorescens* SS101, also induces plant defence mechanisms in tomato (Tran *et al.*, 2007) and orfamide produced by *Pseudomonas* spp. has recently been shown to induce rice and bean immunity (Ma *et al.*, 2016, 2017). Surfactin studies highlighted that the lipopeptide structure strongly impacts its ability to trigger an immune response. Surfactins with C14 and C15 chain length induce extra-cellular medium alkalization, unlike C12 and C13 (Jourdan *et al.*, 2009). Importantly, it was demonstrated that surfactin has to target the lipid fraction of the plant plasma membrane in order to induce immune-related defence responses (Henry *et al.*, 2011). Longer chain length surfactins displayed stronger interactions with membranes compared to C12 and C13 variants. Moreover, there was no refractory state induced by repeated stimulations with surfactin. It was therefore proposed that surfactin perception relies on a lipid-driven process rather than a direct sensing by high-affinity protein receptors (Henry *et al.*, 2011). Rhamnolipids (RLs) are amphiphilic molecules secreted by *Pseudomonas* and *Burkholderia* species and involved in bacterial motility and biofilm formation (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). RLs are able to induce *Brassica napus*, *Arabidopsis* and *Vitis vinifera* immunity (Monnier *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2012; Varnier *et al.*, 2009). Rhamnolipid alone is not responsible for this immune response (Varnier *et al.*, 2009). Given their amphiphilic nature, it was postulated that

RLs could interact with plant membrane lipids (Sanchez *et al.*, 2012). Recently it has been demonstrated that RLs fit into plant lipid-based membrane models and are located near the lipid phosphate group of the phospholipid bilayers, near phospholipid glycerol backbones (Monnier *et al.*, 2019). RL insertion inside the lipid bilayer does not strongly affect lipid dynamics but the nature of the phytosterols could influence the effect of RLs on plant plasma membrane destabilization. These subtle changes in lipid dynamics could be linked with plant defence induction (Monnier *et al.*, 2019). Interestingly, synthetic molecules derived from the RL structure are also known to induce plant immunity. Synthetic rhamnolipid bolaforms (SRBs), composed of two rhamnosides separated by a fatty acid chain (Obounou Akong *et al.*, 2015), trigger an immune response in *Arabidopsis* that varies according to fatty acid chain length (Luzuriaga-Loaiza *et al.*, 2018). Ac-RLs and Alk-RLs, only differing from natural RLs by the terminal group of the carbon chain (with a methyl for Alk-RLs and a carboxylic acid for Ac-RLs), induce ROS production in *Arabidopsis* (Nasir *et al.*, 2017). Interestingly, these synthetic RLs are able to interact with membrane lipids, suggesting that perception of these molecules could involve a lipid-driven process (Luzuriaga-Loaiza *et al.*, 2018; Nasir *et al.*, 2017). Alk-RLs were more favourably inserted into model membranes and induced a higher response than Ac-RL, suggesting that differences in the biological activity of these molecules could be linked to their amphiphilic nature and their capacity to interact with the membrane (Nasir *et al.*, 2017). The synthetic 3-tetradecylamino-*tert*-butyl-*N*-tetradecylpropionamide (diC₁₄) lipid is known to induce TLR4-dependent mechanisms in mammals. It has also been studied for its eliciting properties in *Arabidopsis* and interestingly the plant defence response induced by the molecule is independent from CERK1 (Cambiagno *et al.*, 2015). The chain length of the lipid influences the immune response in *Arabidopsis*. diC₁₄ and diC₁₆ induce defence-related gene expression in this plant, but diC₁₆ leads to weaker responses. diC₁₄ pretreatment triggers *Arabidopsis* resistance against *P. syringae*, unlike diC₁₆ (Cambiagno *et al.*, 2015). It was therefore hypothesized that the interaction of diC₁₄ with plant plasma membrane lipids may alter the organization, compartmentalization or composition of this membrane to somehow boost the activity of the plant defence system (Cambiagno *et al.*, 2015).

Polysaccharide-derived IPs

Some studies have shown that the LysM domain of CERK1 has very weak binding affinity to chitosan (Iizasa *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Moreover, defence genes are up-regulated by chitosan, both in wild-type *Arabidopsis* and chitin-insensitive *cerk1* mutant, demonstrating that chitosan is perceived through a CERK1-independent pathway (Povero *et al.*, 2011). In addition, chitosan can interact with phospholipids bilayers (Fang *et al.*, 2001). As proposed for several IPs, chitosan

could induce membrane structure modifications, stimulating plant immunity (Iriti and Varoni, 2015). As for ergosterol, it was also demonstrated that chitosan directly affects plasma membrane H⁺-ATPase, giving rise to a possible link between chitosan-triggered plant innate immunity and its putative impact on the structural organization of lipid rafts from the plant plasma membrane (Amborabé *et al.*, 2008; Rossard *et al.*, 2010).

CONCLUSION

Apoplastic IPs are diverse in their molecular nature: some are kingdom-specific or even specific to species, while others are present in several kingdoms, such as chitin, which is found in fungi, bacteria and arthropods. The majority of apoplastic IPs characterized to date are perceived by plants at the plasma membrane through PRRs. Interestingly, more and more studies are also suggesting a new perception system based on direct sensing through membrane lipids without the involvement of specific proteinaceous PRRs. This sensing system monitors membrane perturbations and is driven by amphiphilic compounds or toxin-like compounds. Interestingly, some IPs, such as NLPs, elicitors or chitosan, can be perceived through direct interaction with PRRs and/or by lipid-mediated mechanisms. In addition, IPs known or suspected to be perceived through membrane lipids are only from microbial origin. Many studies are still required to understand how IPs are sensed by plants and it seems that a large variety of processes are involved. Further integrative investigations, including biophysical approaches and functional biology on plasma membrane lipids, are required to characterize lipid-based IP perception and its potential relationship with PRR-mediated mechanisms. The understanding of IP-triggered immunity is a first step in the development of new plant breeding strategies. PRR engineering and modification of the lipid composition of the plasma membrane could impact the ability of plants to perceive IPs and are examples of biotechnologies that could be used to optimize plant resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grants from the Rhamnolipids and ResIGLi projects, both co-funded by Region Grand Est and the European Union FEDER programme. Support from the MESRI (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation) and the Federative Research Structure SFR Condorcet are gratefully acknowledged. We thank the reviewers for critical reading and very useful comments to improve the manuscript.

REFERENCES

- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F. and Déziel, E. (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1323–1336.

- Van den Ackerveken, G. (2017) How plants differ in toxin-sensitivity. *Science*, **358**, 1383–1384.
- Adachi, H., Derevnina, L. and Kamoun, S. (2019) NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 121–131.
- Albert, I., Böhm, H., Albert, M., Feiler, C.E., Imkamp, J., Wallmeroth, N., Brancato, C., Raaymakers, T.M., Oome, S., Zhang, H., Krol, E., Grefen, C., Gust, A.A., Chai, J., Hedrich, R., Van den Ackerveken, G. and Nürnberger, T. (2015) An RLP23-SOBIR1-BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nat. Plants*, **1**, 15140.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A. and Maier, R.M. (2000) Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3262–3268.
- Amborabé, B.E., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. (2008) Early events induced by chitosan on plant cells. *J. Exp. Bot.* **59**, 2317–2324.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.M. and Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **16**, 1118–1128.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W. and Mock, N.M. (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* **102**, 1341–1344.
- Balakireva, A.V. and Zamyatnin, A.A. (2018) Indispensable role of proteases in plant innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 629.
- Bar, M., Sharfman, M., Ron, M. and Avni, A. (2010) BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant J.* **63**, 791–800.
- Bektas, Y. and Eulgem, T. (2015) Synthetic plant defense elicitors. *Front. Plant Sci.* **5**, 804.
- Białas, A., Zess, E.K., De la Concepcion, J.C., Franceschetti, M., Pennington, H.G., Yoshida, K., Upson, J.L., Chanclud, E., Wu, C.H., Langner, T., Maqbool, A., Varden, F.A., Derevnina, L., Belhaj, K., Fujisaki, K., Saitoh, H., Terauchi, R., Banfield, M.J. and Kamoun, S. (2018) Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **31**, 34–45.
- Böhm, H., Albert, I., Oome, S., Raaymakers, T.M., Van den Ackerveken, G. and Nürnberger, T. (2014) A conserved peptide pattern from a widespread microbial virulence factor triggers pattern-induced immunity in *Arabidopsis*. *PLoS pathogens*, **10**, e1004491.
- Boller, T. and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Bostock, R.M., Kuc, J.A. and Laine, R.A. (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, **212**, 67–69.
- Bostock, R.M., Savchenko, T., Lazarus, C. and Dehesh, K. (2011) Eicosapolyenoic acids. *Plant Signal. Behav.* **6**, 531–533.
- Boutrot, F. and Zipfel, C. (2017) Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 257–286.
- Brulé, D., Villano, C., Davies, L.J., Trdá, L., Claverie, J., Héloir, M.C., Chiltz, A., Adrian, M., Darblade, B., Tornero, P., Stransfeld, L., Boutrot, F., Zipfel, C., Dry, I.B. and Poinssot, B. (2018) The grapevine (*Vitis vinifera*) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitinoligosaccharide-triggered immunity. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 812–825.
- Brutus, A., Sicilia, F., Maccone, A., Cervone, F. and Lorenzo, G.D. (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9452–9457.
- Buscaill, P., Chandrasekar, B., Sanguankiatichai, N., Kourelis, J., Kaschani, F., Thomas, E.L., Morimoto, K., Kaiser, M., Preston, G.M., Ichinose, Y. and van der Hoorn, R.A.L. (2019) Glycosidase and glycan polymorphism control hydrolytic release of immunogenic flagellin peptides. *Science*, **364**, Available at <https://doi.org/10.1126/science.aav0748>.
- Cambiagno, D.A., Loney, C., Ruyschaert, J.M. and Alvarez, M.E. (2015) The synthetic cationic lipid diC14 activates a sector of the *Arabidopsis* defence network requiring endogenous signalling components. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 963–972.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A. and Stacey, G. (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife*, **3**. <https://doi.org/10.7554/eLife.03766>.
- Chaudhary, R., Atamian, H.S., Shen, Z., Briggs, S.P. and Kaloshian, I. (2014) GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 8919–8924.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G. (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, **18**, 465–476.
- Choi, M.S., Kim, W., Lee, C. and Oh, C.S. (2013) Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **26**, 1115–1122.
- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S.Y. and Stacey, G. (2014) Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science*, **343**, 290–294.
- Cook, D.E., Mesarich, C.H. and Thomma, B.P.H.J. (2015) Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 541–563.
- Coursol, S., Fromentin, J., Noiro, E., Brière, C., Robert, F., Morel, J., Liang, Y.K., Lherminier, J. and Simon-Plas, F. (2015) Long-chain bases and their phosphorylated derivatives differentially regulate cryptogin-induced production of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells. *New Phytol.* **205**, 1239–1249.
- Couto, D. and Zipfel, C. (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 537–552.
- Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauw, E. and Ongena, M. (2015) Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 570–582.
- Deleu, M., Paquot, M. and Nylander, T. (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface – implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid. Interface Sci.* **283**, 358–365.
- Deleu, M., Paquot, M. and Nylander, T. (2008) Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys. J.* **94**, 2667–2679.
- Derevnina, L., Dagdas, Y.F., la Concepcion, J.C.D., Bialas, A., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Du, J., Wu, C.H., Lin, X., Aguilera-Galvez, C., Cruz-Mireles, N., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Kamoun, S. (2016) Nine things to know about elicitors. *New Phytol.* **212**, 888–895.
- Desaki, Y., Kouzai, Y., Ninomiya, Y., Iwase, R., Shimizu, Y., Seko, K., Molinaro, A., Minami, E., Shibuya, N., Kaku, H. and Nishizawa, Y. (2018) OsCERK1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. *New Phytol.* **217**, 1042–1049.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.R., Andrivon, D. and Val, F. (2006) Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* induce different defence response patterns in tobacco, tomato, and potato. *Plant Biol.* **8**, 636–645.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 539–548.

- Domazakis, E., Wouters, D., Visser, R.G.F., Kamoun, S., Joosten, M.H.A.J. and Vleeshouwers, V.G.A.A. (2018) The ELR-SOBIR1 complex functions as a two-component receptor-like kinase to mount defense against *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **31**, 795–802.
- Dow, M., Newman, M.A. and von Roepenack, E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 241–261.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L.C.P., Zhou, J., Liebrand, T.W.H., Xie, C., Govers, F., Robatzek, S., van der Vossen, E.A.G., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., Kamoun, S. and Vleeshouwers, V.G.A.A. (2015) Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants*, **1**, 15034.
- Duran-Flores, D. and Heil, M. (2018) Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain Behav. Immun.* **72**, 78–88.
- Erbs, G. and Newman, M.A. (2012) The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 95–104.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.A. and Cooper, R.M. (2008) Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem. & Biol.* **15**, 438–448.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L. and Avis, T.J. (2013) Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* **39**, 869–878.
- Fang, N., Chan, V., Mao, H.Q. and Leong, K.W. (2001) Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromol.* **2**, 1161–1168.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C. and Dorey, S. (2015) Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 177–187.
- Felix, G. and Boller, T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* **278**, 6201–6208.
- Fesel, P.H. and Zuccaro, A. (2016) β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biol.* **90**, 53–60.
- Fradin, E.F., Zhang, Z., Juarez Ayala, J.C., Castroverde, C.D.M., Nazar, R.N., Robb, J., Liu, C.M. and Thomma, B.P.H.J. (2009) Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant Physiol.* **150**, 320–332.
- Franco-Orozco, B., Berepiki, A., Ruiz, O., Gamble, L., Griffe, L.L., Wang, S., Birch, P.R.J., Kanyuka, K. and Avrova, A. (2017) A new proteinaceous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) identified in Ascomycete fungi induces cell death in Solanaceae. *New Phytol.* **214**, 1657–1672.
- Frias, M., González, C. and Brito, N. (2011) BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* **192**, 483–495.
- Frias, M., Brito, N. and González, C. (2013) The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 191–196.
- Frias, M., Brito, N., González, M. and González, C. (2014) The phytotoxic activity of the cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif on the protein surface. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 342–351.
- Gaulin, E., Dramé, N., Lafitte, C., Torto-Alalibo, T., Martinez, Y., Ameline-Torregrosa, C., Khatib, M., Mazarguil, H., Villalba-Mateos, F., Kamoun, S., Mazars, C., Dumas, B., Bottin, A., Esquerré-Tugayé, M.T. and Rickauer, M. (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell*, **18**, 1766–1777.
- Gerbeau-Pissot, P., Der, C., Thomas, D., Anca, I.A., Grosjean, K., Roche, Y., Perrier-Cornet, J.M., Mongrand, S. and Simon-Plas, F. (2014) Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogin. *Plant Physiol.* **164**, 273–286.
- Gijzen, M. and Nürnberger, T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochem.* **67**, 1800–1807.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **5**, 1003–1011.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**, 251–256.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 277–284.
- Granado, J., Felix, G. and Boller, T. (1995) Perception of fungal sterols in plants (subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in Tomato cells). *Plant Physiol.* **107**, 485–490.
- Gust, A.A. and Felix, G. (2014) Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**, 104–111.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. and Nürnberger, T. (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **282**, 32338–32348.
- Gust, A.A., Pruitt, R. and Nürnberger, T. (2017) Sensing danger: key to activating plant immunity. *Trends Plant Sci.* **22**, 779–791.
- Hadwiger, L.A. (2013) Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. *Plant Sci.* **208**, 42–49.
- Han, Q., Wu, F., Wang, X., Qi, H., Shi, L., Ren, A., Liu, Q., Zhao, M. and Tang, C. (2015) The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environ. Microbiol.* **17**, 1166–1188.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., Molinaro, A., Kaku, H. and Shibuya, N. (2014) Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, E404–413.
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 315–319.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P. and Ongena, M. (2011) The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cell. Microbiol.* **13**, 1824–1837.
- Hind, S.R., Strickler, S.R., Boyle, P.C., Dunham, D.M., Bao, Z., O'Doherty, I.M., Baccile, J.A., Hoki, J.S., Viox, E.G., Clarke, C.R., Vinatzer, B.A., Schroeder, F.C. and Martin, G.B. (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat. Plants*, **2**, 16128.
- Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turrà, D., Di Pietro, A. and Zhang, W. (2014) The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS Pathog.* **10**, e1004331.
- Iizasa, E., Mitsutomi, M. and Nagano, Y. (2010) Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. *J. Biol. Chem.* **285**, 2996–3004.

- Iizasa, S., Iizasa, E., Matsuzaki, S., Tanaka, H., Kodama, Y., Watanabe, K. and Nagano, Y. (2016) Arabidopsis LBP/BPI related-1 and -2 bind to LPS directly and regulate PR1 expression. *Sci. Rep.* **6**, 27527.
- Iriti, M. and Varoni, E.M. (2015) Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 2935–2944.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- de Jonge, R., Peter van Esse, H., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V. and Thomma, B.P.H.J. (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5110–5115.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P. and Ongena, M. (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **22**, 456–468.
- Kanyuka, K. and Rudd, J.J. (2019) Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 1–8.
- Katsir, L. and Bahar, O. (2017) Bacterial outer membrane vesicles at the plant-pathogen interface. *PLoS Pathog.* **13**, e1006306.
- Kim, Y.T., Oh, J., Kim, K.H., Uhm, J.Y. and Lee, B.M. (2010) Isolation and characterization of NgRLK1, a receptor-like kinase of *Nicotiana glauca* that interacts with the elicitor of *Phytophthora capsici*. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 717–727.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B. and Fritig, B. (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **124**, 1027–1038.
- Klemptner, R.L., Sherwood, J.S., Tugizimana, F., Dubery, I.A. and Piater, L.A. (2014) Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Mol. Plant Pathol.* **15**, 747–761.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arens, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A.S., Becker, D. and Hedrich, R. (2010) Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J. Biol. Chem.* **285**, 13471–13479.
- Kubicek, C.P., Starr, T.L. and Glass, N.L. (2014) Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 427–451.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, **16**, 3496–3507.
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., Schäffer, M., Smakowska-Luzan, E., Belkadir, Y., Vlot, A.C., Chandler, C.E., Schellenberger, R., Schwudke, D., Ernst, R.K., Dorey, S., Hükelhoven, R., Hofmann, T. and Ranf, S. (2019) Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in *Arabidopsis* plants. *Science*, **364**, 178–181.
- Larroque, M., Belmas, E., Martinez, T., Vergnes, S., Ladouce, N., Lafitte, C., Gaulin, E. and Dumas, B. (2013) Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **64**, 3615–3625.
- Lee, J., Klessig, D.F. and Nürnberger, T. (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**, 1079–1093.
- Lee, B., Park, Y.S., Lee, S., Song, G.C. and Ryu, C.M. (2016) Bacterial RNAs activate innate immunity in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **209**, 785–797.
- Lee, H.A., Lee, H.Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S.B., Oh, S., Choi, Eunbi, Choi, Eunhye, Lee, S.E. and Choi, D. (2017) Current understandings of plant nonhost resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **30**, 5–15.
- Lenarčič, T., Albert, I., Böhm, H., Hodnik, V., Pirc, K., Zavec, A.B., Podobnik, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Pruitt, R., Greimel, P., Yamaji-Hasegawa, A., Kobayashi, T., Zienkiewicz, A., Gömann, J., Mortimer, J.C., Fang, L., Mamode-Cassim, A., Deleu, M., Lins, L., Oecking, C., Feussner, I., Mongrand, S., Anderluh, G. and Nürnberger, T. (2017) Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science*, **358**, 1431–1434.
- Liebrand, T.W., van den Berg, G.C., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J.H., America, A.H., Sklenar, J., Jones, A.M., Tameling, W.I., Robatzek, S., Thomma, B.P. and Joosten, M.H. (2013) Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10010–10015.
- Liebrand, T.W., van den Burg, H.A. and Joosten, M.H. (2014) Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends Plant Sci.* **19**, 123–132.
- Liu, B., Li, J.F., Ao, Y., Qu, J., Li, Z., Su, J., Zhang, Y., Liu, J., Feng, D., Qi, K., He, Y., Wang, J. and Wang, H.B. (2012) Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell*, **24**, 3406–3419.
- Liu, X., Grabherr, H.M., Willmann, R., Kolb, D., Brunner, F., Bertsche, U., Kühner, D., Franz-Wachtel, M., Amin, B., Felix, G., Ongena, M., Nürnberger, T. and Gust, A.A. (2014) Host-induced bacterial cell wall decomposition mediates pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *eLife*, **3**. <https://doi.org/10.7554/eLife.01990>
- Liu, D., Jiao, S., Cheng, G., Li, X., Pei, Z., Pei, Y., Yin, H. and Du, Y. (2018) Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell. *Int. J. Biol. Macromol.* **111**, 1083–1090.
- Lozano-Torres, J.L., Wilbers, R.H.P., Gawronski, P., Boshoven, J.C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J.H.G., America, A.H.P., Overmars, H.A., Van 't Klooster, J.W., Baranowski, L., Sobczak, M., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A.L., Schots, A., de Wit, P.J.G.M., Bakker, J., Goverse, A. and Smant, G. (2012) Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 10119–10124.
- Luzuriaga-Loaiza, W.P., Schellenberger, R., Gaetano, Y.D., Akong, F.O., Villaume, S., Crouzet, J., Haudrechy, A., Baillieul, F., Clément, C., Lins, L., Allais, F., Ongena, M., Bouquillon, S., Deleu, M. and Dorey, S. (2018) Synthetic rhamnolipid bolaforms trigger an innate immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **8**, 8534.
- Ma, Y., Han, C., Chen, J., Li, H., He, K., Liu, A. and Li, D. (2015) Fungal cellulase is an elicitor but its enzymatic activity is not required for its elicitor activity. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 14–26.
- Ma, Z., Hua, G.K.H., Ongena, M. and Höfte, M. (2016) Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Env. Microbiol. Reports*, **8**, 896–904.
- Ma, Z., Ongena, M. and Höfte, M. (2017) The cyclic lipopeptide orfamide induces systemic resistance in rice to *Cochliobolus miyabeanus* but not to *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Rep.* **36**, 1731–1746.
- Maget-Dana, R. and Ptak, M. (1990) Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 34–40.
- Mamode-Cassim, A., Gouguet, P., Gronnier, J., Laurent, N., Germain, V., Grison, M., Boutté, Y., Gerbeau-Pissot, P., Simon-Plas, F. and Mongrand, S. (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog. Lipid Res.* **73**, 1–27.
- Mélida, H., Sopena-Torres, S., Bacete, L., Garrido-Arandia, M., Jordá, L., López, G., Muñoz-Barrios, A., Pacios, L.F. and Molina, A. (2018) Non-branched β -1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **93**, 34–49.
- Ménard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Yvin, J.-C. and Kauffmann, S. (2004) Beta-1,3 glucan sulfate, but not

- beta-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 3020–3032.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N. (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19613–19618.
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Clément, C., Dorey, S., Sarazin, C. and Rippa, S. (2018) Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1170.
- Monnier, N., Furlan, A.L., Buchoux, S., Deleu, M., Dauchez, M., Rippa, S. and Sarazin, C. (2019) Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through biophysical studies. *Int. J. Mol. Sci.* Available at <https://doi.org/10.3390/ijms20051009>.
- Mott, G.A., Thakur, S., Smakowska, E., Wang, P.W., Belkadir, Y., Desveaux, D. and Guttman, D.S. (2016) Genomic screens identify a new phytochemical microbe-associated molecular pattern and the cognate *Arabidopsis* receptor-like kinase that mediates its immune elicitation. *Gen. Biol.*, **17**, 98.
- Nasir, M.N., Thawani, A., Kouzayha, A. and Besson, F. (2010) Interactions of the natural antimicrobial mycosubtilin with phospholipid membrane models. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **78**, 1723.
- Nasir, M.N., Lins, L., Crowet, J.-M., Ongena, M., Dorey, S., Dhondt-Cordelier, S., Clément, C., Bouquillon, S., Haudrechy, A., Sarazin, C., Fauconnier, M.L., Nott, K. and Deleu, M. (2017) Differential interaction of synthetic glycolipids with biomimetic plasma membrane lipids correlates with the plant biological response. *Langmuir*, **33**, 9979–9987.
- Nie, J., Yin, Z., Li, Z., Wu, Y. and Huang, L. (2019) A small cysteine-rich protein from two kingdoms of microbes is recognized as a novel pathogen-associated molecular pattern. *New Phytol.*, **222**, 995–1011.
- Obounou Akong, F. and Bouquillon, S. (2015) Efficient syntheses of bolaform surfactants from l-rhamnose and/or 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid. *Green Chem.*, **17**, 3290–3300.
- Ottmann, C., Luberacki, B., Küfner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H.U., Nürnberger, T. and Oecking, C. (2009) A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 10359–10364.
- Peng, K.C., Wang, C.W., Wu, C.H., Huang, C.T. and Liou, R.F. (2015) Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitor perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, **28**, 913–926.
- Petutschnig, E.K., Jones, A.M.E., Serazetdinova, L., Lipka, U. and Lipka, V. (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **285**, 28902–28911.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. and Pugin, A. (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, **16**, 553–564.
- Postma, J., Liebrand, T.W.H., Bi, G., Evrard, A., Bye, R.R., Mbengue, M., Kuhn, H., Joosten, M.H.A.J. and Robatzek, S. (2016) Avr4 promotes Cf-4 receptor-like protein association with the BAK1/SERK3 receptor-like kinase to initiate receptor endocytosis and plant immunity. *New Phytol.*, **210**, 627–642.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggese, A. and Perata, P. (2011) Transcript profiling of chitosan-treated *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Res.*, **124**, 619–629.
- Pruitt, R.N., Schwessinger, B., Joe, A., Thomas, N., Liu, F., Albert, M., Robinson, M.R., Chan, L.J.G., Luu, D.D., Chen, H., Bahar, O., Daudi, A., De Vleeschauwer, D., Caddell, D., Zhang, W., Zhao, X., Li, X., Heazlewood, J.L., Ruan, D., Majumder, D., Chern, M., Kalbacher, H., Midha, S., Patil, P.B., Sonti, R.V., Petzold, C.J., Liu, C.C., Brodbelt, J.S., Felix, G. and Ronald, P.C. (2015) The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Sci. Adv.*, **1**, e1500245.
- Pusztahelyi, T. (2018) Chitin and chitin-related compounds in plant-fungal interactions. *Mycology*, **9**, 189–201.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Küfner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberacki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischign, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M. and Nürnberger, T. (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell*, **18**, 3721–3744.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O. and Ongena, M. (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 1037–1062.
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J. and Scheel, D. (2015) A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Immunol.*, **16**, 426–433.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.*, **183**, 555–563.
- Robinson, S.M. and Bostock, R.M. (2015) β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant–oomycete interactions: past and present. *Front. Plant Sci.*, **5**, 797.
- Ron, M. and Avni, A. (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**, 1604–1615.
- Rooney, H.C.E., Klooster, J.W., van't Hoorn, R.A.L. van der Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G. and de Wit, P.J.G.M. (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, **308**, 1783–1786.
- Rossard, S., Roblin, G. and Atanassova, R. (2010) Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1807–1816.
- Rowland, O., Ludwig, A.A., Merrick, C.J., Baillieu, F., Tracy, F.E., Durrant, W.E., Fritz-Laylin, L., Nekrasov, V., Sjölander, K., Yoshioka, H. and Jones, J.D.G. (2005) Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell*, **17**, 295–310.
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J.H., Clément, C., Baillieu, F. and Dorey, S. (2012) Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol.*, **160**, 1630–1641.
- Santamaria, M.E., Arnaiz, A., Gonzalez-Melendi, P., Martinez, M. and Diaz, I. (2018) Plant perception and short-term responses to phytophagous insects and mites. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1356.
- Shang-Guan, K., Wang, M., Htwe, N.M.P.S., Li, P., Li, Y., Qi, F., Zhang, D., Cao, M., Kim, C., Weng, H., Cen, H., Black, I.M., Azadi, P., Carlson, R.W., Stacey, G. and Liang, Y. (2018) Lipopolysaccharides trigger two successive bursts of reactive oxygen species at distinct cellular locations. *Plant Physiol.*, **176**, 2543–2556.

- Sidhu, V.K., Vorhölter, F.J., Niehaus, K. and Watt, S.A. (2008) Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiol.* **8**, 87.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.A. and Parrilli, M. (2005) The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J. Biol. Chem.* **280**, 33660–33668.
- Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J.M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.-A. and Molinaro, A. (2010) Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiol.* **20**, 406–419.
- Tran, H., Ficke, A., Asimwe, T., Höfte, M. and Raaijmakers, J.M. (2007) Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* **175**, 731–742.
- Trdá, L., Boutrot, F., Claverie, J., Brulé, D., Dorey, S. and Poinssot, B. (2015) Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Front. Plant Sci.* **6**, 219.
- Trouvelot, S., Varnier, A.-L., Allègre, M., Mercier, L., Baillieu, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.M., Pugin, A. and Daire, X. (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 232–243.
- Turek, I. and Gehring, C. (2016) The plant natriuretic peptide receptor is a guanylyl cyclase and enables cGMP-dependent signaling. *Plant Mol. Biol.* **91**, 275–286.
- Umemura, K., Ogawa, N., Koga, J., Iwata, M. and Usami, H. (2002) Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* **43**, 778–784.
- Umemura, K., Tanino, S., Nagatsuka, T., Koga, J., Iwata, M., Nagashima, K. and Amemiya, Y. (2004) Cerebroside elicitor confers resistance to fusarium disease in various plant species. *Phytopathology*. **94**, 813–818.
- Van't Klooster, J.W., Van der Kamp, M.W., Vervoort, J., Beekwilder, J., Boeren, S., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J. and De Wit, P.J.G.M. (2011) Affinity of Avr2 for tomato cysteine protease Rcr3 correlates with the Avr2-triggered Cf-2-mediated hypersensitive response. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 21–30.
- Varden, F.A., De la Concepcion, J.C., Maidment, J.H. and Banfield, M.J. (2017) Taking the stage: effectors in the spotlight. *Curr. Opin. Plant Biol.* **38**, 25–33.
- Varnier, A.L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clement, C., Baillieu, F. and Dorey, S. (2009) Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell Environ.* **32**, 178–193.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Narasimhan, M.L. (2003) In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.* **131**, 1580–1590.
- Wang, L., Albert, M., Einig, E., Fürst, U., Krust, D. and Felix, G. (2016) The pattern-recognition receptor CORE of Solanaceae detects bacterial cold-shock protein. *Nat. Plants*, **2**, 16185.
- Wang, L., Einig, E., Almeida-Trapp, M., Albert, M., Fliegmann, J., Mithöfer, A., Kalbacher, H. and Felix, G. (2018) The systemin receptor SYR1 enhances resistance of tomato against herbivorous insects. *Nat. Plants*, **4**, 152–156.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85–88.
- Wei, Y., Caceres-Moreno, C., Jimenez-Gongora, T., Wang, K., Sang, Y., Lozano-Duran, R. and Macho, A.P. (2018) The *Ralstonia solanacearum* csp22 peptide, but not flagellin-derived peptides, is perceived by plants from the Solanaceae family. *Plant Biotech. J.* **16**, 1349–1362.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Götz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A. and Nürnberger, T. (2011) *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 19824–19829.
- de Wit, P.J. (2016a) *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* **54**, 1–23.
- de Wit, P.J.G.M. (2016b) Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytol.* **212**, 805–813.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J. Biol. Chem.* **276**, 33540–33546.
- Xu, S., Liao, C.J., Jaiswal, N., Lee, S., Yun, D.J., Lee, S.Y., Garvey, M., Kaplan, I. and Mengiste, T. (2018) Tomato PEPR1 ORTHOLOGUE RECEPTOR-LIKE KINASE1 regulates responses to systemin, necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell*, **30**, 2214–2229.
- Yang, Y., Yang, X., Dong, Y. and Qiu, D. (2018) The *Botrytis cinerea* xylanase BcXyl1 modulates plant immunity. *Front. Microbiol.* **9**, 2535.
- Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrand, T.W.H., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G. and van Kan, J.A.L. (2014) Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES. *Plant Physiol.* **164**, 352–364.
- Zhang, X., Dodds, P.N. and Bernoux, M. (2017) What do we know about NOD-like receptors in plant immunity? *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 205–229.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749–760.
- Zuppin, A., Baldan, B., Millioni, R., Favaron, F., Navazio, L. and Mariani, P. (2004) Chitosan induces Ca²⁺-mediated programmed cell death in soybean cells. *New Phytol.* **161**, 557–568.

Annexe 2 : Composition du RLsec



Molécule	% (masse sèche)
mc-3-OH-FAs	
3-OH-C8:0, 3-OH-C10:0, 3-OH-C12:0	0.37
HAAs	3.68
HAA-C8:8	0.23
HAA-C8:10	0.85
HAA-C10:10	2.13
HAA-C10:12	0.26
HAA-C8:12-1	0.09
HAA-C10:12-1	0.12
HAA-C12:12-1	0.07
Mono-RLs	51
Rha-C8:10	5.28
Rha-C10:10	37.67
Rha-C10:12	3.53
Rha-C12:12	0.06
Rha-C8:12-1	0.72
Rha-C10:12-1	3.55
Rha-C12:12-1	0.19
Di-RLs	44.95
Rha-Rha-C8:8	0.36
Rha-Rha-C8:10	4.33
Rha-Rha-C10:10	33.14
Rha-Rha-C10:12	4.22
Rha-Rha-C12:12	0.1
Rha-Rha-C8:12-1	0.64
Rha-Rha-C10:12-1	1.88
Rha-Rha-C12:12-1	0.27

Caractérisation de la perception racinaire et de la résistance systémique induite par les rhamnolipides et leurs précurseurs chez *Arabidopsis thaliana*

Dans leur environnement, les plantes sont fréquemment soumises à des attaques de microorganismes pathogènes. Pour leur faire face, elles mettent en place des mécanismes de défense activés suite à la détection du microorganisme via des motifs moléculaires ou IPs (Invasion Patterns). Les rhamnolipides (RLs) sont des molécules glycolipidiques amphiphiles produites par des bactéries des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Ces molécules sont capables d'induire, au niveau foliaire chez différentes plantes, une résistance locale contre des microorganismes phytopathogènes. L'acide 3-hydroxydécanoïque (3-OH-C10:0), le constituant de base de la partie lipidique des RLs, active aussi une réponse immune dans la partie aérienne de la plante *Arabidopsis thaliana*. Cette réponse immune est déclenchée suite à sa perception par le récepteur kinase S-lectine LORE. Les travaux menés au cours ce projet de thèse ont permis de mettre en évidence que le 3-OH-C10:0 est perçu au niveau racinaire par LORE, conduisant à l'activation d'une réponse immune innée et à la mise en place d'une résistance systémique (ISR) efficace contre le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. D'autre part, ces travaux ont révélés que les RLs sont aussi perçus au niveau racinaire et activent une ISR contre *B. cinerea* n'impliquant pas le récepteur LORE. L'ensemble de ces résultats montrent que les RLs ainsi que le 3-OH-C10:0, sont deux IPs reconnus par *A. thaliana* au niveau racinaire via des mécanismes indépendants et tous deux conduisant à l'activation d'une résistance systémique.

Immunité végétale, Rhamnolipides, mc-3-OH-FA, Perception racinaire, Résistance systémique induite, *Arabidopsis thaliana*

Characterization of root perception and induced systemic resistance by rhamnolipids and their precursors in *Arabidopsis thaliana*

In their environment, plants are frequently challenged by pathogenic microorganisms. Plants are able to trigger an innate immune response to fight against the infection. This immune response is activated after perception of the microorganisms through Invasion Patterns (IPs). Rhamnolipids (RLs) are amphiphilic glycolipidic molecules produced by some bacterial species including *Pseudomonas* and *Burkholderia*. RLs are able to induce an immune response in the aerial part of several plant which is effective against phytopathogens. 3-hydroxydecanoic acid (3-OH-C10:0), a lipid building block from RLs, is known to trigger *Arabidopsis thaliana* immune responses in leaves after its perception by the bulb-type lectin receptor kinase LORE. In the present work, we showed that the 3-OH-C10:0 is also sensed by roots through LORE, triggering local immune responses and a systemic induced resistance (ISR) effective against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. In addition, this work revealed that RLs are also recognized by root cells, activating a LORE-independent ISR against *B. cinerea*. This work shows that RLs and 3-OH-C10:0 are different IPs independently recognized by *A. thaliana* roots but both inducing a systemic resistance in plants.

Plant immunity, Rhamnolipids, mc-3-OH-FA, Root perception, Induced systemic resistance, *Arabidopsis thaliana*

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

Unité de Recherche Résistance Induite et Bio-protection des Plantes - EA 4707

Campus du Moulin de la Housse – Bâtiment 18

BP 1039 – 51687 Reims Cedex 2, France