

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES EFFECTEURS CANDIDATS  
DE TYPE HOMOLOGUE ET SPÉCIFIQUE À L'HÔTE DE  
*MELAMPSORA LARICI-POPULINA*

THÈSE PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU  
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
CLAIRES LETANNEUR

JUILLET 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

**Direction de recherche :**

---

Hugo Germain

Directeur de recherche

---

Sébastien Duplessis

Codirecteur de recherche

**Jury d'évaluation de la thèse :**

---

Hugo Germain

Directeur de recherche

---

Sébastien Duplessis

Codirecteur de recherche

---

Isabel Desgagné-Penix

Présidente de jury

---

Claire Veneault-Fourrey

Évaluatrice externe

---

François Ouellet

Évaluateur externe

Thèse soutenue le 7 juillet 2022.

*« Il est fréquent que le chemin emprunté  
mène à d'autres endroits que ceux  
que nous avions imaginé. »*

*Maud Ankaoua*

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier les membres du jury d'évaluation, Claire Veneault-Fourrey et François Ouellet pour avoir accepté de lire et m'aider à perfectionner ce manuscrit. During my PhD, I had the chance to meet great scientists around the world. To dive into stromule world, I had the chance to work for two months with Dr. Martin Schattat at Martin Luther University in Germany. This great opportunity made me learn a lot. For that and your warm welcome Martin and Jessica, thank you very much! I would also add a very special thanks to Dr. Kristina Kühn, Dr. Justin Lee, Dr. Karin Krupinska, Dr. Ingo Heilmann, Dr. Marta Fratini and Dr. Irene Stenzel for their help, expert advice and providing important cellular markers.

Le temps est venu pour moi de te remercier. Cela fait maintenant plus de huit ans que je suis passée devant cette porte affichant l'écriteau 'Hugo Germain' et que tu m'as offert cette chance inouïe de franchir le seuil de ton laboratoire. Pendant ces huit dernières années, je suis consciente d'avoir grandi auprès d'un employeur, d'un professeur puis d'un directeur à la vision scientifique de très haut calibre, au leadership inspirant, mais surtout sous l'œil d'un humain bienveillant, patient et passionné aux valeurs qui ont forgé les miennes. Difficile d'exprimer toute la gratitude que j'éprouve pour toute la confiance, la liberté d'entreprendre et le support inébranlable que tu m'as apporté dans ce projet de recherche, mais aussi les multiples autres où j'ai pu m'épanouir. Il est incontestable que ton ombre est dans chacun des succès qui ont illuminé mon parcours. Un merci du fond du cœur Hugo!

Je me sens aussi très chanceuse d'avoir pu côtoyer tant de modèles inspirants pendant mon doctorat. Sébastien, je voudrais te remercier pour tes précieux conseils dans cette codirection, mais aussi pour tes encouragements, ton humour et la pédagogie dont tu as fait preuve lors de mes nombreuses visites à l'INRAE. Isabel, tu es bien plus que la présidente de ce jury de thèse. Modèle d'une femme scientifique engagée, tu es un véritable modèle d'excellence pour chacune des femmes de l'équipe. Syrina, un immense

merci ne fait que pâle figure devant la confiance que tu m'as accordée pour développer l'Experimentarium UQTR. Depuis ces nombreuses années, et tout particulièrement lorsque j'ai entamé la clôture de cette recherche, ton éblouissant talent n'a pas quitté mes pensées Justine. Les mondes de la recherche et de la formation des médecins ont grandi grâce à toi, mais tu nous manques.

Aussi, il est nombre de personnes que je souhaite remercier, car elles ont contribué à mon épanouissement au sein de cette université et de mon domaine de recherche : Monsieur le Doyen Adel Omar Dahmane, Isabelle Dupuis et José Viau, un immense merci pour vos multiples supports dans les projets qui me tiennent à cœur. Merci à Martin Lambert pour sa joie de vivre et son humanité. Chantal Binda, Mina Zitouni et Peter Moffett, merci pour l'attention et le profond soutien que vous m'avez offert au sein de cette grande famille qu'est le Centre SÈVE. Vous avez contribué, sans l'ombre d'un doute, à mon épanouissement en tant que chercheuse en biologie végétale.

Le doctorat c'est une formidable aventure qui nous amène à rencontrer nos limites. Je voudrais donc remercier ces anges qui m'ont aidé à créer ma propre lumière quand mes yeux n'étaient qu'ombre. Max, forgeur d'âme que tu es, il n'est de mots assez forts pour t'exprimer ma reconnaissance et l'importance de notre amitié. À l'image d'une sage-femme, Sylvie merci beaucoup pour ta magnifique aura et ta joie de vivre. My german mom, Janette, you, and your cats gave me so much when I was starving for peacefulness. You don't know how much you changed my life. I am so lucky that I met you. From the bottom of my heart, thank you! I would also like to give a huge hug to you girls, Sedef Özyürek, Sarlita Dwiana, Singe Parlar, Julia Rott, Theresa Schoeller, Khansa Mekkaoui and to you Nico Rössner. My trip to Germany wouldn't have been the same without you! Also, my dear friends from IIT Roorkee, summer school and scientific expedition wouldn't have been that fun without you ladies: thank you, sweet Parul Sirohi, Meenakshee Kanwar, Suchi Baliyan and Sweta Singh.

À l'image d'une graine qui ne peut s'épanouir sans sa matrice, il m'est difficile d'illustrer la force phénoménale que tu m'as donnée maman. Des expressions d'admiration

qu'affichait ton visage quand je t'apportais mes gribouillages d'enfants aux mots réconfortants dans les moments difficiles, je ne saurais te remercier pour ta confiance, pour m'avoir laissé suivre mes intuitions et m'avoir soutenu sans l'ombre d'un doute. Christian et toi m'avez montré que tout était possible, mais surtout qu'un mieux s'exigeait. Parce qu'il n'est de bras plus doux que ceux d'une grand-mère, merci ma petite mamie d'être ma racine la plus profonde. Merci aussi à mon comédien préféré, mon étoile la plus scintillante dans le ciel. Toi qui nous as bercé toute notre enfance de tes récits bouleversant, tu m'as permis de me trouver en guidant mes pas jusqu'à la scène de MT180. Merci à mes sublimes perles, Rose et Alba, pour leurs fulgurances de vie et bien sûr à ma belle Gwen, mon frère, Pierre, et chacun des doux membres de ma famille.

Il est une famille dont on hérite et une que l'on se construit. Teura, Narimane, Geneviève et Mélodie, tant de calories et d'amour partagés avec vous. Projets, mariages, chalets et autres vadrouilles, il faut le dire, toutes les années avec vous m'évoqueront toujours beaucoup de nostalgie! Merci d'être mes compagnonnes dans cette sacrée aventure qu'est la vie, je vous aime. Stéphanie, Jimmy, Talycia, Ryan, mais aussi Snehiji, Ingridos, Mabibel, Valerita, Nicoco, Serge, Anne-Sophitos, Fatimama, Kika, Nikunji, Madina, Saifur, Bulbul, Apu, Andrew, Nicolas, l'ensemble des membres des laboratoires du Pierre Boucher et au-delà, AnnyPier, Pier Olivier, Alexandre C., Dadou, Soumeya, Julius, Amita, Romain, Guilherme et Romaric merci d'avoir apporté des sourires et de la douceur dans mes journées. Marion et Mélanie, merci pour cette belle aventure CapScience et tout le reste. Michelle, merci d'être une tendre amie et un modèle d'engagement. Alexandre B. et Mathias merci pour votre précieuse amitié, votre confiance, votre aide et pour avoir été des cobayes d'enseignements exemplaires. Merci beaucoup aussi à Vickie Beaupré pour nos discussions-cheval qui ont fait tant de bien. Et enfin, quand un retour aux sources est possible, il n'est rien de mieux qu'une régression de l'encéphale en bonne compagnie. Merci à Morgane, Lorelei, Laurie, Clément, Cyril, Jade, Sarah et Paul d'être ces personnes folles et libres que j'adore. Ma Caro, ma douce vétérinaire et ma plus vieille amie... Depuis nos discussions philosophiques, nos promenades canines, nos séances de rédaction d'histoire et bien sûr l'échange de nos aspirations dans les bus qui nous ramenaient chez

nous, on en a fait du chemin! Je suis fière de nous et des jeunes femmes que nous sommes devenues. Toi vétérinaire, moi docteure : We did it!!

Last but not least, mon Jean-Mich'. Je ne savais pas pourquoi je devais y participer, mais je savais que me perdre dans les montagnes de l'Himalaya me permettrait de me trouver. Par bonheur, je m'y suis trouvée, mais j'y ai trouvé bien plus encore. Merci pour le bonheur au quotidien Théoji, pour les repas 4 étoiles, les rires, les chants, les discussions philosophiques... ah oui et aussi pour les relectures des 40 000 mots qui suivent... Je t'aime.

**Finalement, même si cela ne surprendrait que peu ceux qui me connaissent bien, c'est dans cette partie de ma rédaction que je suis certaine d'un oubli. Je voudrais donc compenser les performances catastrophiques de ma mémoire en remerciant très sincèrement l'ensemble des admirables personnes à qui j'ai pu sourire ou qui m'ont fait sourire au cours de ces huit fabuleuses dernières années.**

## AVANT-PROPOS

Le travail recueilli dans cette thèse présente les démarches scientifiques entreprises dans le cadre de mes études doctorales. Dans un souci de les dépeindre dans une rédaction inclusive, lorsque cela sera nécessaire, la règle de l'accord de proximité au genre, approuvée par l'Office québécois de la langue française, sera observée.

Les racines de cette recherche ont pris leur source outre-Atlantique dans le laboratoire du codirecteur de ce travail, Dr Sébastien Duplessis, à l'INRAE, Nancy Grand EST en France puis se sont établies au cœur du laboratoire d'Immunité Végétale Génomique Fonctionnelle du Dr Hugo Germain, à l'Université du Québec à Trois-Rivières. Dans le souci de parfaire l'expertise présentée subséquemment, deux mois de ces travaux ont été complétés à l'Université Martin-Luther dans le laboratoire de Biologie et Physiologie Végétale du Dr Martin Schattat à Halle en Allemagne.

Cette thèse est présentée sous sa forme classique afin d'atteindre le lectorat francophone. La majorité du travail rapporté, ici, est destinée à la publication d'un article scientifique (« Host specific and homologous pairs of *Melampsora larici-populina* effectors unveil novel *Nicotiana benthamiana* stromule induction mechanism »). De ce fait, la narration de cette thèse est conduite en français, mais les figures présentées sont formatées en anglais. Dans un souci de lisibilité de la pensée scientifique, le chapitre II Matériels et Méthodes, regroupe les méthodes employées en fonction des objectifs et non en fonction des types de ces méthodes.

Toutes les abréviations ou les acronymes employés dans cette thèse sont répertoriés dans une table prévue à cet effet. Lors de la première apparition dans le texte, les abréviations sont spécifiées et celles citées dans des figures seront définies dans les légendes associées.

La présente thèse s'est employée à explorer un sujet visant deux applications : la caractérisation chez *Melampsora larici-populina* de paires d'effecteurs candidats

homologues présentant des profils d'expression spécifiques à l'hôte, mais aussi la caractérisation des voies d'induction des stromules dans un contexte de potentiels stresseurs biotiques.

## RÉSUMÉ

Chaque année, les parasites fongiques de la famille des Rouilles sont à l'origine de pertes économiques considérables sur les cultures de grands champs, mais aussi forestières. Les forêts de bois d'œuvre exploitant le peuplier sont régulièrement frappées par la Rouille du peuplier. La mise en lumière de méthodes pour contrôler durablement cette menace passe tout d'abord par l'étude de ce pathosystème particulier : le pathogène (*Melampsora larici-populina*) et ses hôtes (le peuplier et le mélèze). Biotrophe obligatoire, la propagation de ce champignon repose potentiellement sur l'action de 1184 petites protéines sécrétées par le champignon dans l'hôte (Candidate Secreted Effector Protein, CSEP). Une étude récente a démontré que ce pathogène adaptait son sécrétome en fonction de l'hôte ciblé. Parmi ces CSEPs, certaines partagent de fortes homologies de séquences avec d'autres CSEPs du même pathogène, mais qui, elles, adoptent un profil d'expression opposé : des paires de CSEPs homologues et à l'expression spécifique à l'hôte (CSEPs-HSH). L'étude des interactions hôte-pathogène permet d'apporter des solutions aux ravages causés, mais aussi d'approfondir les mécanismes des réponses de défense chez les végétaux. Actuellement, la place du chloroplaste est repensée avec un plus large spectre d'action dans l'immunité végétale notamment grâce à sa particularité de former des extensions tubulaires à partir de sa membrane : des stromules. Des effecteurs de *M. larici-populina* (*Mlp*) ont déjà été caractérisés comme localisant au chloroplaste.

Ce projet de recherche s'est attelé à caractériser les CSEPs-HSH de *Mlp* par le biais de l'identification d'interactants potentiels, de leurs localisations subcellulaires, ainsi que par l'étude de leurs impacts sur l'induction de stromules dans l'épiderme de la plante modèle *Nicotiana benthamiana*.

Des analyses comparatives des transcriptomes de *Mlp* puis des études phylogéniques des CSEPs ont conduit à identifier quatre couples d'effecteurs candidats correspondant à ces critères. Ensuite, à l'aide de la technique de criblage en double hybride chez la levure, des listes d'interactants potentiels uniques et communs aux paires de CSEPs ont été dressées. Aussi, les localisations subcellulaires de chacun des neuf CSEPs ont été approfondies par microscopie confocale. Finalement, une exploration des voies d'induction de stromules par le biais de plusieurs mutants délétères de *N. benthamiana* a été possible grâce à sept de ces CSEPs.

Six des CSEPs ont présenté des interactions potentielles avec des protéines des hôtes auxquels elles sont spécifiques. Deux paires de CSEPs, les familles 1 et 7, partagent notamment des interactants communs malgré la distance taxonomique entre les deux hôtes. Les homologues de la famille 1, *Mlp104486* et *Mlp123281* ainsi que *Mlp53845* de la famille 33, présentent des localisations nucléaires, cytosoliques et dans des corps cytosoliques. Étonnamment, cinq des CSEPs présentent une localisation partielle ou complète au chloroplaste (*Mlp123281*, *Mlp51690*, *Mlp107359*, *Mlp72983*, *Mlp86274*).

La CSEP Mlp108708, et possiblement son homologue de la famille 51, Mlp107359, présentent la particularité de localiser sur le réseau endomembranaire. La CSEP Mlp52166 présente une localisation non concluante au noyau et au cytoplasme. Finalement, excepté la paire de la famille 1, les sept autres CSEPs étudiées induisent significativement des stromules. La paire de la famille 33, Mlp51690 et Mlp53845, démontre une dépendance complète à *EDS1* pour cette induction. Mlp107359 et Mlp108708 ainsi que la CSEP de la famille 7 Mlp52166, démontrent une induction de stromule partiellement dépendante à *EDS1*. Les deux autres membres de la famille 7, Mlp72983 et Mlp86274, démontrent une induction dépendante à *NRG1*. Ces cinq dernières CSEPs-HSH (Mlp107359, Mlp108708, Mlp52166 et Mlp72983, Mlp86274) présentent des profils d'induction encore jamais rapportés dans la littérature et contribuent donc à l'approfondissement de la compréhension des cascades d'induction de stromules.

En somme, nos résultats suggèrent que les CSEPs-HSH de *Mlp* ont une propension à localiser au chloroplaste et que ces derniers modifient sa morphologie en induisant des stromules par des voies diverses mais caractéristique à chaque famille. Cette recherche contribue donc à l'effort de caractérisation des CSEPs du pathosystème de *Mlp* mais aussi fournit de nouveaux éléments, et outils, dans l'approfondissement des fonctions chloroplastiques lors d'une interaction hôte-pathogène.

**Mots-clés :** *Melampsora larici-populina*, effecteurs candidats homologues et spécifiques à l'hôte, stromules, Peuplier, Mélèze, *Nicotiana benthamiana*

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>iv</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>xviii</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1    Les méandres de l'immunité végétale .....	1
1.1.1    Les plantes et le règne fongique .....	1
1.1.2    Empreintes historiques des maladies fongiques .....	2
1.1.3    Les deux paliers de l'immunité.....	4
1.2    Biologie cellulaire de l'immunité .....	10
1.2.1    Coopération des organelles .....	10
1.2.2    Le chloroplaste.....	13
1.3 <i>Melampsora larici-populina</i> , le phytopathogène qui joue sur deux tableaux ....	23
1.3.1    Cycle de vie .....	24
1.3.2    Processus infectieux.....	25
1.3.3 <i>Larix</i> spp. .....	27
1.3.4 <i>Populus</i> spp. ....	29
1.3.5    Processus de caractérisation : la science de l'effectomique .....	32
1.3.6    Coévolution et homologie fonctionnelle.....	37
1.4    Objectifs de recherche et hypothèse .....	40
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>43</b>
2.1    Processus de sélection des CSEPs au profil HSH .....	43
2.1.1    Analyse comparative des transcriptomes de <i>Mlp</i> .....	43
2.1.2    Étude des familles de CSEPs .....	44

2.2	Identification d'interactants candidats des CSEPs HSH .....	45
2.2.1	Extraction d'ARN .....	45
2.2.2	Génération des banques de transcrits des hôtes : deux librairies .....	46
2.2.3	Clonage des CSEPs HSH.....	47
2.2.4	Criblage par double hybride .....	48
2.2.5	Identification des interactants candidats .....	49
2.2.6	Identification des interactomes spécifiques et communs.....	50
2.3	<i>N. benthamiana</i> et conditions de croissance.....	50
2.4	Expression transitoire .....	51
2.4.1	Clonage en phase avec la eGFP .....	51
2.4.2	Agroinfiltration .....	51
2.5	Microscopie confocale.....	52
2.6	Microscopie à épi-fluorescence .....	52
2.7	Étude de l'induction de stromules .....	53
<b>CHAPITRE III</b> <b>RÉSULTATS</b> .....	<b>54</b>	
3.1	L'étude des transcriptomes de Mlp révèle des CSEPs homologues aux profils d'expressions opposés .....	54
3.2	Interactomes solubles des CSEPs HSH des familles 1 et 7 .....	57
3.3	Les CSEPs HSH localisent dans divers compartiments cellulaires.....	60
3.4	Les CSEPs HSH modifient la fréquence d'induction de stromule dépendamment et indépendamment de <i>eds1</i> et <i>nrg1</i> .....	68
<b>CHAPITRE IV</b> <b>DISCUSSION</b> .....	<b>74</b>	
4.1	Processus de sélection et d'étude des CSEPs HSH .....	74
4.2	Potentiel d'action des homologues Mlp104486 et Mlp123281 .....	81
4.3	Mlp51690 et Mlp53845, des profils différents, mais un même chemin d'induction.....	83
4.4	Mlp107359 et Mlp108708 : qu'en est-il des membranes? .....	84
4.5	Mlp52166, Mlp72983, Mlp86274, un « troupe » particulier.....	86
4.6	Mise en relief de la notion d'homologie.....	89
4.7	Le chloroplaste semble être une cible de choix pour les CSEPs HSH .....	91
4.8	Une avancée quant à la caractérisation de l'induction biotique des stromules...	92

<b>CHAPITRE V</b>	
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>96</b>
5.1 Conclusion .....	96
5.2 Perspectives .....	99
5.2.1 Avenues à court terme .....	99
5.2.2 Avenues à long terme .....	100
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>102</b>
<b>ANNEXE A</b>	
<b>AMORCES .....</b>	<b>127</b>
<b>ANNEXE B</b>	
<b>INTERACTANTS CANDIDATS DE MLP104486, MLP123281, MLP53845, MLP72983, MLP52166 ET MLP86274.....</b>	<b>128</b>
<b>ANNEXE C</b>	
<b>INDUCTION DE STROMULES DANS LA LIGNÉE NBFNR::EGFP_NRG1-5.....</b>	<b>135</b>
<b>ANNEXE D</b>	
<b>LOCALISATIONS INCERTAINES OU DIFFÉRENTES ENTRE MLP104486 ET MLP107359 AVEC PLUSIEURS MARQUEURS CELLULAIRES .....</b>	<b>136</b>
<b>ANNEXE E</b>	
<b>CORRECTION DU MOUVEMENT VESICULAIRE .....</b>	<b>138</b>
<b>ANNEXE F</b>	
<b>LOCALISATION DE MLP72983 DANS DES CORPS NUCLÉAIRES.....</b>	<b>140</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau</b>		<b>Page</b>
3.1	Neuf CSEPs issues de quatre familles présentent le profil HSH .....	56
4.1	Comparaison des localisations prédictes et observées.....	78

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Symptômes de maladies fongiques .....	4
1.2 Mécanismes généraux des réponses immunitaires.....	6
1.3 Les voies PTI et ETI sont interreliées .....	9
1.4 Dynamique du système endomembranaire en contexte de stress biotique .....	12
1.5 Structure du chloroplaste.....	14
1.6 Mouvements spatiaux du chloroplaste .....	17
1.7 Caractérisation de la nature des stromules dans les cellules de l'épiderme abaxiale de <i>N. benthamiana</i> .....	20
1.8 Modèle de la cascade d'induction de stromules spécifique à XopQ .....	21
1.9 Cycle de vie de <i>Melampsora larici-populina</i> .....	25
1.10 Processus d'infection de <i>Melampsora larici-populina</i> : exemple du cycle végétatif (urédiniospores).....	26
1.11 Conséquences des contournements de résistance de <i>Melampsora larici-populina</i> pathotype E4 .....	30
1.12 Hypothèse de sécrétion des CSEPs et détournement des nutriments de l'hôte vers le parasite .....	34
1.13 Les effecteurs CTP1, CTP2 et CTP3 localisent au chloroplaste.....	36
1.14 Modèles de coévolution dans un scénario d'interaction de parasitisme et divergence des polymorphismes associés .....	38
2.1 Génération des librairies par la technologie de synthèse SMART cDNA et recombinaison <i>in vivo</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
2.2 L'interaction Bait-Prey (CSEP-protéine de l'hôte) induit l'expression de quatre gènes rapporteurs sous trois éléments promoteurs hétérologues reconnus par GAL4 .....	49
2.3 Identification des différentes formes de stromule et exemples de comptage...	53

3.1	Processus de sélection des CSEPs au profil HSH .....	55
3.2	Étapes des criblages des interactants candidats : exemple de la famille 1 .....	58
3.3	Les CSEPs des familles 1 et 7 interagissent avec des protéines communes ....	59
3.4	Les CSEPs HSH ciblent diverses localisations subcellulaires .....	63
3.5	Les CSEPs HSH colocalisent avec différents marqueurs subcellulaires .....	67
3.6	Les CSEPs HSH des familles 33, 51 et 7 induisent des stromules chez NbFNR::eGFP_WT.....	69
3.7	L’induction de stromules des CSEPs HSH des familles 33, 51 et 7 est significativement supprimée, réduite ou inchangée par la délétion <i>eds1</i> .....	71
3.8	Mlp72983 et Mlp86274 induisent des stromules de façon dépendante à NRG1 .....	73
4.1	Localisations subcellulaires des CSEPs de <i>Melampsora larici-populina</i> caractérisées à ce jour chez <i>A. thaliana</i> ou <i>N. benthamiana</i> .....	79
4.2	Cinq CSEPs comportent des séquences prédictes pour une liaison à l’ADN (DBS) et Mlp72983 pourrait porter un signal de localisation au noyau (NLS).....	81
4.3	Trois zones pour distinguer le niveau de confiance quant à l’homologie entre deux séquences.....	90
4.4	Les CSEPs HSH induisent des stromules par le biais de nouvelles voies .....	94

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAT	Aspartate Aminotransferase
ABA	Abscisic Acid
ADR1	Activated Disease Resistance gene 1
AVR	Avirulence
BAK1	Brassinosteroid insensitive 1-associated Receptor Kinase
CAZymes	Carbohydrate active enzymes
CC-NBS-LRR	Coiled-Coil Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat
CCVs	Clathrin-coated vesicles
CDPK	Calcium-Dependant Protein Kinase
CERK	Chitin Elicitor Receptor Kinase 1
CHUP1	Chloroplastic-Unusual Positioning 1
CNLs	Coiled-Coil Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat
CoIP	Co-immunoprécipitation
CPG	Cluster of paralogous genes
CSEPs	Candidate Secreted Effector Proteins, Protéine effectrice sécrétée candidate
CTP1/2/3	Chloroplast-Targeted Protein 1/2/3
dpi	Day post infiltration, jour post-infiltration
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1
EE	Early Endosomes
EHM	Extrahautorial membrane
EHMx	Extrahautorial matrix
ER	Endoplasmic reticulum

ETI	Effector-Triggered Immunity, Immunité spécifique aux effecteurs
ETS	Effector-Triggered Susceptibilité, Susceptibilité aux effecteurs
EXPO	Exocyt-Positive Organelle
ExTI	Extracellular Triggered Immunity
FNR	Ferredoxin NADP(H) oxidoreductase
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GA	Golgi Apparatus
GFP	Green Fluorescent Protein
HSH	Homologues et spécifiques à l'hôtes
HHS	Homologous with host-specificity
Hop	Hypersensitive response and pathogenicity Outer Protein
hpi	Heure post-infiltration
HR	Hypersensitive response, réponse hypersensitive
HSP70	Heat Shock Protein 70
ICS1	Isochorismate Synthase 1
InTI	Intracellular Triggered Immunity
JA	Jasmonic acid
KCBP	Kinesine-like Calmodulin-Binding Protein
LE	Late Endosomes
LHC	Light-Harvesting Complex
LRRs	Leucine Rich Repeats
LYK5	Lysin motif receptor kinase 5
MAMP	Microbes Associated Molecular pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
<i>Mlp</i>	<i>Melampsora larici-populina</i>

MVB	Multivesicular bodies
NEP	Nuclear-Encoded RNA Polymerase
NLR	Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat
NLS	Nuclear localization signal
NMI	NLR-Mediated Immunity
NRG1	N Requirement Gene 1
NRIP1	N Receptor Interacting Protein 1
OPT	Oligopeptid Transporter
ORF	Open Reading Frame
OD <sub>600</sub>	Densité optique à 600nm
O/N	Over night, pour toute une nuit
PAB2	Poly(A)binding protein 2
PAD4	Phytoalexin deficient 4
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PAP	3'-phosphoadenosine 5'phosphate
PCD	Programed cell death
PEP	Plastid-Encoded RNA Polymerase
PM	Plasma Membrane
PMI	PRR-Mediated Immunity
PTI	PAMP-Triggered Immunity
PR	Pathogenesis Related
PRR	Pattern-Recognition Receptors
RFP	Red Fluorescent Protein
RLK	Receptor-Like Protein
RNL	RPW8-like coiled-Coil Nucleotide-Binding Site Leucine Rich Repeat

ROQ1	Recognition of XopQ
ROS	Reactive Oxygen species
RPW8	Resistance to Powdery Mildew 8
SA	Salicylic Acid
SAG101	Senescence Associated Genes 101
SAR	Systemic Acquired Resistance
SIPK	Salicylic Acid-Induced Protein Kinase
siRNA bodies	Vésicules à ARN interférents courts
SGS3	Suppressor of Gene Silencing 3
SSPs	Small Secreted Proteins
SWIB	SWItch/Sucrose Non-Fermentable complex B
T3SS	Type three Secretion System
TBK	Serine/threonine TANK-binding kinase
TFs	Transcription Factors
TMV	Tobacco Mosaic Virus
ToxABP1	ToxA Binding Protein 1
TuMV	Turnip Mosaic Virus
TNLs	Toll-Interleukin-1 Nucleotide binding Leucine rich repeat protein
UAS <sub>G</sub>	Galactose upstream activating sequence
V	Vacuole
WT	Wild type
XRNs	5'-3' exoribonuclease
Y2H	Yeast Two Hybrid, Système double hybride chez la levure

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Les méandres de l'immunité végétale

#### 1.1.1 Les plantes et le règne fongique

Remontant à environ 407 millions d'années depuis la première interaction entre les organismes photosynthétiques et ceux du règne fongique, cette longue co-évolution a conduit à de multiples types de relations champignons-plantes (Spatafora et al. 2017).

Omniprésents dans les forêts tempérées, les lichens comme *Flavoparmelia carperata* représentent un exemple de la relation symbiotique entre le champignon surnommé et une algue verte unicellulaire du genre *Trebouxia sp.* (Brodo et al. 2001). L'association intime et bénéfique entre un champignon et une plante vasculaire peut être qualifiée d'endophytique ou de relation mycorhizienne dépendamment de l'organe abritant l'interaction (racines, feuille, système vasculaire) et l'équilibre entre les bénéfices et l'intimité des échanges (Deng et Cao 2017, Bennett et Grotel 2022). La rhizosphère, région restreinte environnant les racines, est le lieu de nombreuses interactions plante-champignon. La relation mutualiste (endophytique) entre les racines du Brome des toits, *Bromus tectorum* et la morille induit un gain de croissance ainsi qu'une meilleure tolérance des graines aux feux de forêt de cette plante annuelle (Baynes et al. 2012). Composante intégrante du phytobiome, les interactions bénéfiques plantes-champignons se combinent aussi avec le microbiome bactérien endogène (Igiehon et Babalola 2018, Nanjundappa et al. 2019). De plus, les communautés bactériennes et fongiques peuvent agir sur le développement de l'autre communauté. C'est le cas de *Pseudomonas fluorescens* F113 qui sécrète la molécule antifongique DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol). Sans effet sur le champignon mycorhizien arbusculaire

*Glomus mosseae*, cette molécule stimule même sa croissance autour des racines de tomates (Barea et al. 1998).

Il est estimé que 85 % des plantes vasculaires forment des associations bénéfiques avec des mycorhizes arbusculaires. En colonisant les racines, ces champignons contribuent à une meilleure nutrition, promeuvent la croissance de la plante associée et participent à réduire la susceptibilité contre certains stress biotiques et abiotiques (Fiorilli et al. 2018, D Aljawasim et al. 2020, Sagar et al. 2021).

Ces interactions bipartite ou tripartite bénéfiques peuvent aussi contribuer à une meilleure résistance envers des phytopathogènes fongiques, bactériens, viraux ou encore des ravageurs (Fritz et al. 2006, Igiehon et Babalola 2018, Miozzi et al. 2019, Nanjundappa et al. 2019).

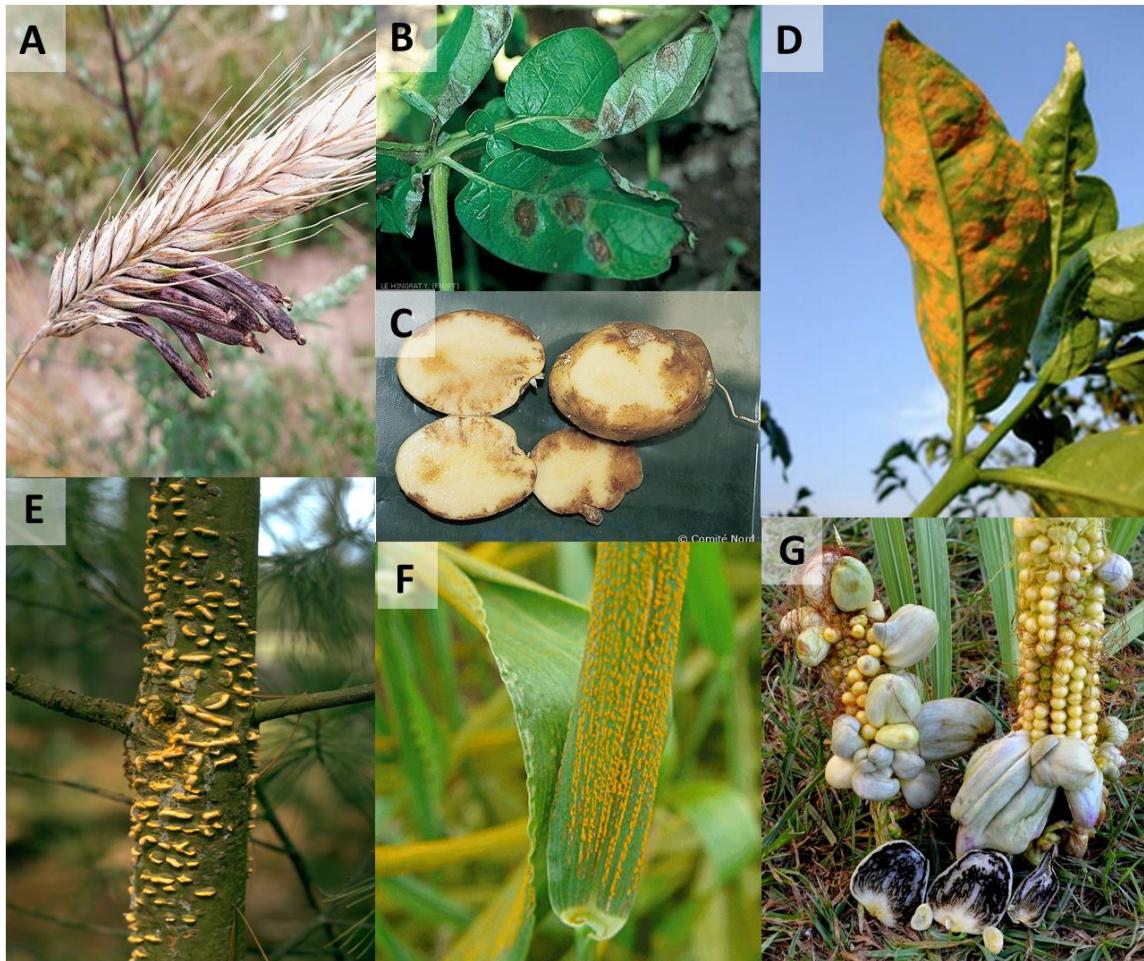
Les phytopathogènes sont classés en fonction des relations trophiques établies avec l'hôte. Celles-ci se déclinent en trois classes : biotrophe, hémibiotrophe et nécrotrophe. Les relations biotrophes sont le fruit d'une longue co-évolution hôte-pathogène. Comme pour le cas de nombreuses Rouilles, cela se manifeste en une forte spécialisation du pathogène pour son hôte. Ce dernier dépend des nutriments détournés de son hôte pour mener à bien son développement. Les hémibiotrophes se distinguent par l'installation d'une relation biotrophique puis à un basculement vers une phase nécrotrophique. Finalement, les nécrotrophes sont des pathogènes provoquant la mort de leur hôte, par l'émission de toxines par exemple, et captant les nutriments libérés.

### 1.1.2 Empreintes historiques des maladies fongiques

Issue des mots latin *funus* (mort) et *ago* (je produis), le règne fongique a, au travers de l'Histoire, régulièrement marqué les civilisations humaines. Aussi appelé le « Calice de la mort », l'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*), fut à l'origine d'un réversement de pouvoir en faveur de l'empereur Néron, en l'an 54, grâce à l'empoisonnement de son prédécesseur l'empereur romain Claude IV (Benjamin 2013). En 1722, c'est le Tsar de

toutes les Russies, Pierre le Grand, qui en fait les frais sur les rives de la Volga en voyant la gangrène décimer la majorité de son armée après avoir consommé de la farine contaminée par les ergotoxines de *Claviceps purpurea* (Figure 1.1, panneau A) (Bennett et Bentley 1999). L'oomycète, tristement célèbre, *Phytophthora infestans*, a aussi été à l'origine d'une des plus grandes vagues d'immigration aux États-Unis vers 1860 après avoir anéanti les productions de pommes de terre irlandaises pendant plus de 6 ans et entraîné la famine de plus de huit millions de personnes (Figure 1.1, panneau B et C) (Gullino 2021). La consommation de thé typiquement anglaise fût aussi forgée par un phytopathogène fongique. La Rouille orangée du caféier, *Hemileia vastatrix*, a dévasté en 1869 l'ensemble de la caféculture de l'île de Ceylan, aujourd'hui le Sri Lanka, qui approvisionnait l'empire britannique (Figure 1.1, panneau D) (Gullino 2021). Plus récemment, c'est l'apparition de la rouille vésiculeuse du pin blanc, *Cronartium ribicola*, dans les forêts québécoises, en 1917, qui a précipité la création du Service forestier du Québec et a amorcé l'âge d'or des études et politiques de gestion agroforestières dans la province (Figure 1.1, panneau E) (Connors 1972, Laflamme 2008). Encore aujourd'hui, la majorité des cultures de grands champs comme le riz, le lin, l'orge ou le blé sont l'objet de surveillance étroite afin de prévenir les milliards de dollars de dommages engendrés par des pathogènes fongiques comme *Magnaporthe oryzae*, *Melampsora lini*, *Blumeria graminis* ou *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Figure 1.1, panneau F). À l'inverse, pour la préparation du plat traditionnel *Huitlacoche*, certains agriculteurs au Mexique, ensemencent sciemment leurs champs de maïs afin d'induire l'hypertrophie des grains provoquée par la production des téliospores de *Ustilago maydis* (Figure 1.1, panneau G) (Dean et al. 2012).

Depuis la sédentarisation des premières civilisations humaines, les vagues de phytopathogènes ont ainsi régulièrement mis en évidence la dépendance de l'humain envers les cultures végétales. Source d'alimentation, de matériaux, de molécules médicinales ou d'énergie, il est ainsi nécessaire d'approfondir les connaissances scientifiques quant aux pathosystèmes qui mettent en danger ces cultures afin de garantir le maintien des productions au-dessus des seuils de sécurité alimentaire et matériel.



**Figure 1.1 Symptômes de maladies fongiques.**

- A. Épi de seigle infecté par *Claviceps purpurea* (crédit : Stiller Beobachter, Ansbach). B. et C. Feuilles et tubercules de pomme de terre infectés par *Phytophthora infestans* (ephytia.inrae.fr). D. Feuilles de cafiers infectées par *Hemileia vastatrix* (crédit : American Phytopathological Society). E. Tronc de pin blanc, *Pinus strobus*, infecté par *Cronartium ribicola* (credit : Petr Kapitola, Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture). F. Feuille de blé infectée par *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Dean et al. 2012). G. Épis de maïs infectés par *Ustilago maydis* (crédit : José Ignacio Fernández Simón).

### 1.1.3 Les deux paliers de l'immunité

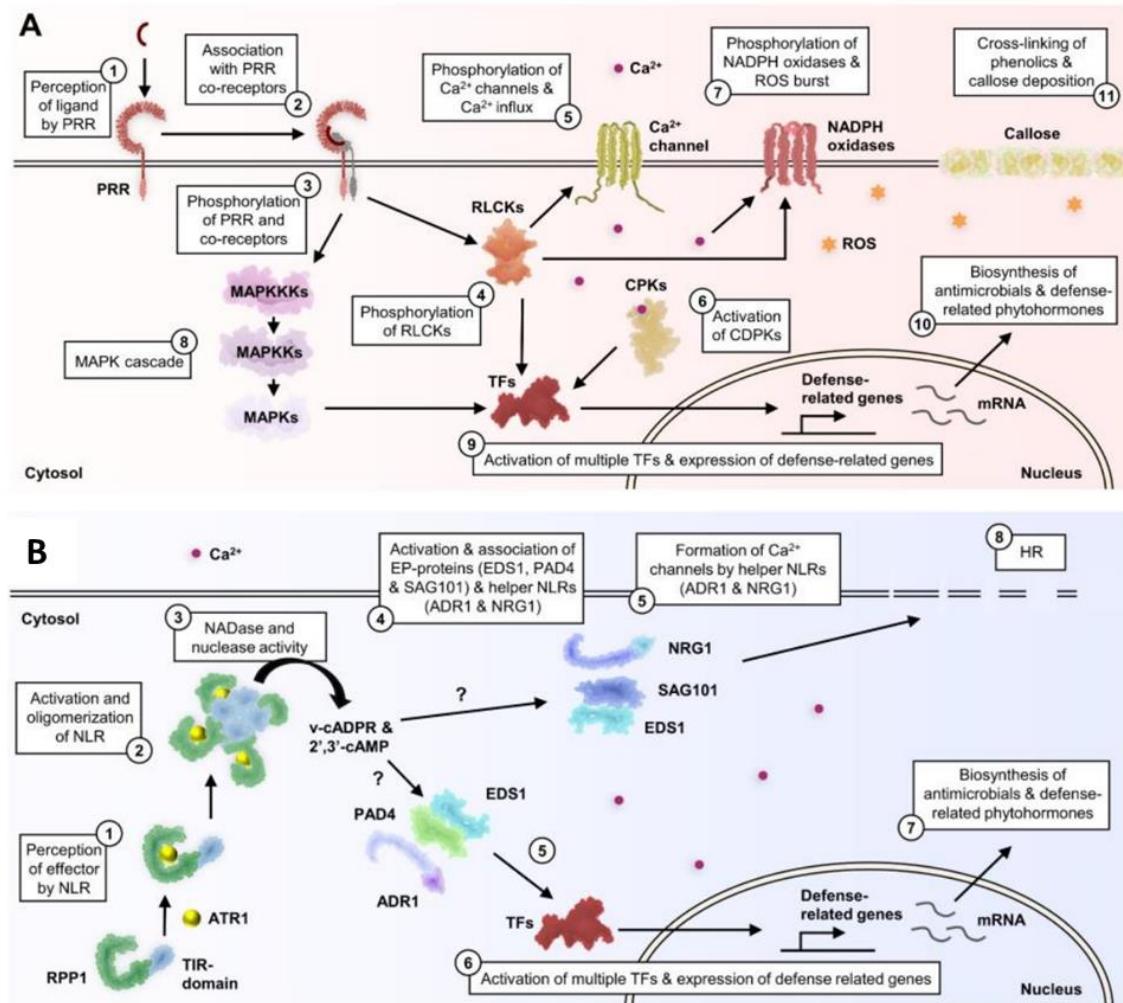
L'environnement de la plante l'expose à de nombreux stress divisés en deux classes. Tout d'abord, les stress abiotiques sont induits par des conditions environnementales comme les variations de température, les concentrations en éléments minéraux, en ions,

en gaz, l’hygrométrie ou encore la nature et l’intensité lumineuse (Zhu 2016, Karmous et al. 2017, Morton et al. 2019, Roeber et al. 2021). La seconde classe regroupe les stress dits, biotiques, qui impliquent un contact avec un virus, un micro ou un macroorganisme. Les mécanismes de réponses immunitaires décrits ci-dessous offrent un horizon des cascades de signalisation engendrées lors d’un stress biotique bactérien ou fongique. Celui-ci est engendré dans le cas où les barrières physiques de la plante ont été insuffisantes pour protéger la plante.

Le processus de réponse d’une plante à un tel stress va dépendre du pathogène impliqué. Malgré tout, il est possible d’énoncer un continuum entre deux voies : la PTI et l’ETI. Tout d’abord, la réponse immune innée primaire, est déclenchée par l’interaction entre des Damage/Pathogen/Microbe/Herbivore-Associated Molecular Patterns (D/P/M/HAMPs), tels que le  $\beta$ -glucane, la chitine ou la flagelline, et les récepteurs membranaires de l’hôte, les Pattern-Recognition Receptors (PRRs). Comme illustré par le panneau A de la figure 1.2, les ligands reconnus par les PRR déclencheront l’activation de kinases, l’accroissement de l’flux calcique vers le cytosol, la production d’espèces réactives de l’oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) puis l’activation de facteurs de transcriptions (TFs) et l’accumulation de callose. Ces réactions engendrées par la PAMP Triggered Immunity (PTI) peuvent être défaites par un pathogène par le biais de la sécrétion des molécules effectrices (Figure 1.3, panneau A). Ces dernières visent à moduler les mécanismes de résistance de la plante afin d’installer un contexte de susceptibilité; une interaction compatible.

Le panneau B de la figure 1.2 schématise le système cytosolique de détection immunitaire de la plante basé sur les récepteurs Nucleotide Binding Domain Leucine-Rich Repeat (NLRs). Dépendamment de leurs structures, les NLRs se divisent en trois groupes : les COILED-COIL (CNLs), les DOMAINE RPW8 LIKE COILED-COIL (RNLs) et les domaine TIR, TOLL/INTERLEUKIN-1 RECEPTOR PROTEIN (TNLs). Au contact d’un effecteur, une large diversité d’homo et hétérocomplexes de ces NLRs conduiront à l’induction de l’Effector Triggered Immunity (ETI). Par exemple, ACTIVATED DISEASE RESISTANCE GENE 1 (ADR1) et N REQUIREMENT GENE 1 (NRG1) sont

des RNLs respectivement nécessaires dans la modulation de la réponse et l'induction de la réaction d'hypersensibilité (HR) médiée par ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1), PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) et SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101 (SAG101) chez *A. thaliana* (EDS1-PAD4-ADR1) et *N. benthamiana* (EDS1-SAG101-NRG1) (Lapin et al. 2019, Sun et al. 2021). La délétion de *EDS1* chez *A. thaliana* accroît sa susceptibilité à l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsis* (Fabro et al. 2011, Germain et al. 2018). En somme, cette réponse immunitaire vise à établir la résistance de la plante (Figure 1.3, panneau A).



**Figure 1.2** Mécanismes généraux des réponses immunitaires.

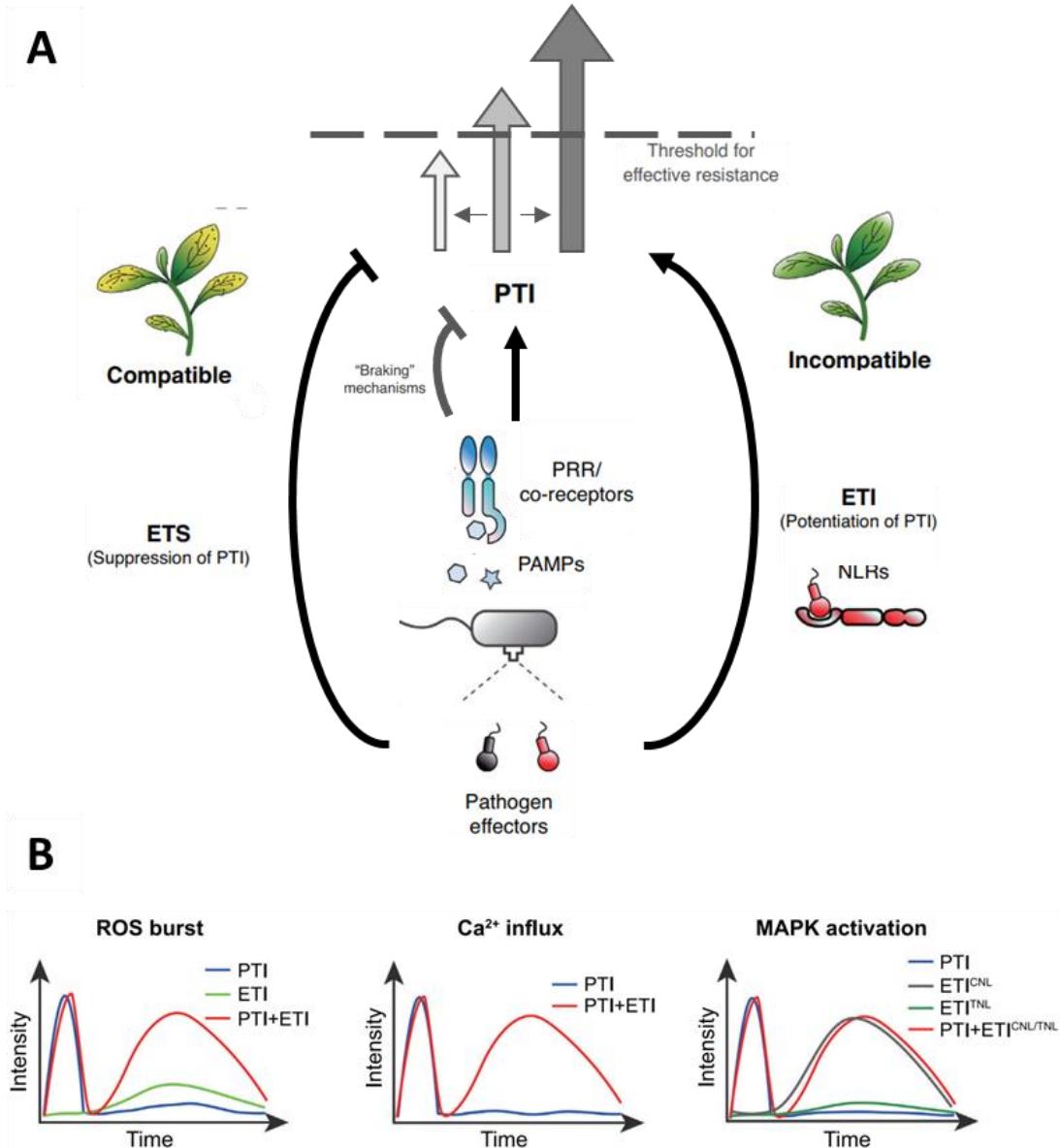
**A.** Mécanismes induits par l'activation des récepteurs PRR (PMI).

**B.** Mécanismes induits par l'activation des NLRs, (NMI). Figure modifiée issue de (Ngou et al. 2022).

La PTI et l'ETI ont souvent été envisagées pour être deux mécanismes distincts et unidirectionnels. En effet, les connaissances accumulées évoquaient la reconnaissance de signaux pathogéniques différents par des récepteurs distincts et conduisant à des réactions d'ampleur différentes. Cependant, la récente littérature s'accorde aujourd'hui sur une association plus intime entre la PTI et l'ETI. En effet, l'accumulation de nouveaux mécanismes évoque une convergence des cascades de signalisation vers l'expression de gènes de résistances communs (Ngou et al. 2021). En outre, certains mécanismes de reconnaissance entrecroisent le diptyque PAMP-PRR et Effecteur-NLR. Par exemple, l'effecteur apoplastique Avr4 de l'ascomycète *Cladosporium fulvum* limite la libération d'oligomères de N-acetyl glucosamine en liant la chitine afin de minimiser le déclenchement de la PTI. Seulement, le PRR Cf-4 va déclencher l'ETI lors de son interaction avec Avr4 (van den Burg et al. 2006, Kombrink et al. 2011). Ces découvertes mènent actuellement à l'émergence de nouveaux qualificatifs d'induction des voies menant à une réponse immune : par le type de récepteur activé (PRR-Mediated Immunity, PMI et NLR-Mediated Immunity, NMI), ou encore par la localisation cellulaire de l'interaction (Extracellular Triggered Immunity, ExTI, et Intracellular Triggered Immunity, InTI) (Lacaze et Joly 2020, Ngou et al. 2022).

Sommairement, les transductions des signaux de reconnaissance vont induire une relocalisation cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la production et la libération de ROS. Comme rapporté par le panneau B de la figure 1.3, l'amplitude et la pérennité de ces signaux sont variables en fonction des origines d'induction. Ces derniers conduiront à l'activation des cascades de signalisation à l'aide des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et des kinases dépendantes à l'influx calcique Calcium Dependant Protein Kinase (CDPK) (Mizoguchi et al. 1997, Boudsocq et al. 2010, Lu et al. 2010, Meng et Zhang 2013). Les MAPK et les CDPK modulent l'intensité et la persistance de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de la phosphorylation de TFs. Par exemple, le couple MPK3/MPK6 phosphoryle les TFs ERF6, WRK22 et WRK29 qui participent à la résistance de certains stress environnementaux et pathogènes fongiques chez *Arabidopsis* (Asai et al. 2002, Chen et al. 2002, Pandey et Somssich 2009, Meng et Zhang 2013). Réaction d'une intensité et une durabilité supérieure à la PTI, les mécanismes induits par l'ETI conduisent

à la résistance systémique acquise (SAR) qui permet une réponse de défense spécifique aux effecteurs reconnus par la plante (Zhang et al. 2018). La translocation de TFs au noyau conduira finalement à l'expression de gènes de résistance, la libération de phytohormones, comme l'éthylène, l'acide jasmonique (JA) ou l'acide salicylique (SA), la rigidification des parois cellulaires par l'accumulation de callose, mais aussi l'accumulation de protéines Pathogenesis-Related (PR) à la membrane et dans l'apoplaste. En dernier recours, l'ETI peut mener à l'induction de la réponse hypersensible (HR) et le déclenchement de la mort cellulaire dépendamment de la libération cytoplasmique de ROS. Chez *N. benthamiana*, ce sont les MAPK induites par l'acide salicylique (SIPK) qui participent à la HR en phosphorylant le facteur de transcription WRKY1 (Menke et al. 2005).



**Figure 1.3** Les voies PTI et ETI sont interreliées.

A. Relations entre les voies PTI et ETI. ETS : Effecter Triggered Susceptibility. B. Dynamiques des accumulations de ROS, de calcium et l'activation de MAPK en fonction de l'induction des voies PTI, ETI, PTI et ETI combinées. Les auteurs font la distinction entre l'induction de l'ETI par les récepteurs CNL et TNL. Figures modifiées issues de (Yuan et al. 2021).

Les différentes voies empruntées permettraient de moduler l'intensité et la durabilité de ces réactions. Aussi, comme rapporté dans le panneau B de la figure 1.3, la PTI et l'ETI présentent des rôles synergiques dans le déclenchement, le maintien de la production de ROS, l'influx calcique et finalement l'activation des MAPK. La réaction

d'hypersensibilité est aussi conditionnelle à cette synergie chez *A. thaliana* en présence du pathogène bactérien *Pseudomonas syringae* (Ngou et al. 2021).

## 1.2 Biologie cellulaire de l'immunité

Le déclenchement et les mécanismes de défense engagés par le système immunitaire des plantes impliquent de nombreux éléments notamment des flux ioniques, une perturbation des équilibres oxydo-reducteurs et l'accumulation de protéines, de métabolites spécialisés et de phytohormones. L'ensemble de ces phénomènes sont reliés à des fonctions remplies par des organelles. Les processus moléculaires dépeints plus haut sont donc dépendants d'une communication et d'une coordination entre ces dernières.

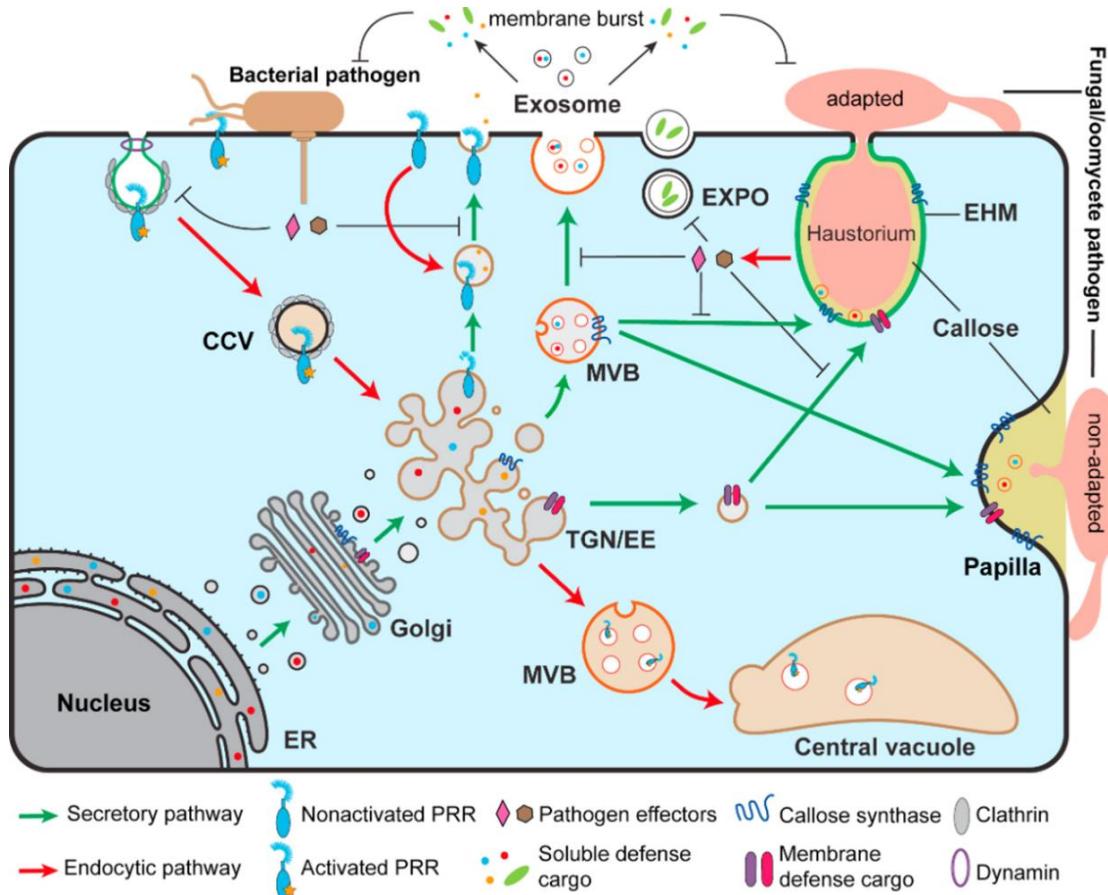
### 1.2.1 Coopération des organelles

Il est possible de caractériser plusieurs types de communication : antérograde (noyau-organelle), rétrograde (organelles-noyau) et inter-organelles. L'ensemble des organelles est dépendant des signaux antérogrades pour leurs biogénèses et le maintien de leurs homéostasies. Essentielle à l'homéostasie du chloroplaste, la coordination avec le transcriptome nucléaire est déterminante dans l'accomplissement des dernières étapes de synthèse des lipides des membranes thylakoides, de la chlorophylle, mais aussi pour des protéines des photosystèmes (Blanco et al. 2014). Le signal rétrograde est considéré comme l'ensemble des signaux émanant des organelles qui vont moduler l'expression du génome nucléaire. La convergence vers le noyau de ces signaux venant de multiples organelles pourrait contribuer à la coordination cellulaire, l'adaptation des homéostasies et des fonctions cellulaires au contexte identifié (croissance ou stress) (Woodson et Chory 2008, Chan et al. 2016). Pour cela, des protéines présentant de multiples localisations dites *dual targeted proteins* peuvent y contribuer (Carrie et al. 2009). Dues aux similarités entre le chloroplaste et la mitochondrie (endosymbiose, gestion de l'énergie cellulaire), ces dernières pourraient partager jusqu'à 400 *dual targeted proteins* (Mitschke et al. 2009). Ces similarités s'illustrent par le partage de plusieurs voies de signaux rétrogrades synergiques (WRKY40/63) ou par des voies d'inter-régulation (Van Aken et al. 2013,

Wurzinger et al. 2018). Pour exemple, la phosphatase chloroplastique et mitochondriale 3'-phosphoadenosine 5'phosphate phosphatase (SAL1-PAP) régule les niveaux de 3'-phosphoadenosine 5'phosphate (PAP). L'accumulation de ROS active la SAL1-PAP qui provoque le transport de PAP vers le cytoplasme puis le noyau. Finalement, la localisation nucléaire de PAP va moduler l'expression de gènes par le biais de 5'-3' exoribonuclease (XRNs) (Crisp et al. 2018). Le chloroplaste et la mitochondrie présentent aussi des voies d'inter-régulation. En effet, lors d'un éventuel excès de lumière, le processus de photoinhibition de la respiration mitochondriale régule l'équilibre *redox* chloroplastique pour prévenir les dommages liés à un excès oxydant (Blanco et al. 2014). La compartimentation de certaines voies de synthèse implique aussi une coordination constante entre les organelles. Par exemple, l'assimilation de nitrate chez le tournesol semble être reliée à la photorespiration dont le mécanisme se partage entre les chloroplastes, les mitochondries et les peroxisomes (Busch et al. 2018).

La coopération entre les organelles d'une cellule est un point fondamental à l'adaptabilité d'une cellule à un stress. Plaque tournante permettant l'adressage de nombreuses protéines, le réticulum endoplasmique (ER) est régulièrement mis en lumière pour sa fonction de coordination. Cet incroyable réseau membranaire héberge la traduction et les modifications post-traductionnelles d'une partie conséquente du protéome d'une cellule. Ces protéines peuvent alors être orientées vers l'apoplaste, la membrane plasmique, l'ensemble des vésicules cytosoliques, la vacuole, mais aussi les mitochondries et les chloroplastes (Bellucci et al. 2018, Liu et Li 2019). À plus grande échelle, le système endomembranaire *vesicule trafficking* au travers du réseau du ER, de l'appareil de golgi (GA), du réseau trans-golgi (TGN), des endosomes précoces (EE) et tardifs (LE), de la vacuole (V), des corps multi vésiculaire (MVB) jusqu'à la membrane plasmique (PM) est fortement modulé en fonction des stress perçus (Figure 1.4) (Rosquete et Drakakaki 2018). En effet, la dynamique de ces membranes sous stress abiotique (sels, température) démontre une sensibilité aux variations de pH et de potentiel oxydo-réducteur offrant à la cellule une rapidité de réponse et d'ajustement au stress (Krebs et al. 2010, Wang et al. 2011). La complexité de ce réseau n'est encore que peu caractérisée, mais son rôle potentiel dans la rapidité de réponse à un stress pourrait être fondamental dans les

mécanismes de résistance. Les balbutiements de l'étude des glycomes et des populations des cargos des vésicules du TGN en contexte de stress enrichira certainement la notion de coordination inter-organelles dans les prochaines années (Parsons et Lilley 2018, Voiniciuc et al. 2018, Placidi et Campa 2021).



**Figure 1.4** Dynamique du système endomembranaire en contexte de stress biotique.

Les protéines reliées à la défense portant un peptide signal sont traduites et subissent les modifications post-traductionnelles nécessaires à leurs formes matures par l'intermédiaire du ER. Dirigées vers le TGN, elles peuvent être adressées pour une exocytose, une fusion à la membrane ou encore un entreposage dans la vacuole via les MVB. Des protéines de manteaux de la famille des Clathrines (CCV, CLATHRIN-COATED VESICULES) peuvent induire l'endocytose de PRRs ou de cargos liés à la membrane favorisant l'induction/le maintien de la réponse de défense. Des vésicules de type EXPO (EXOCYT POSITIVE ORGANELLE) peuvent aussi être sécrétées afin de se fusionner à la membrane du pathogène et d'y relâcher le contenu de leurs cargos. Figure issue de (Gu et al. 2017).

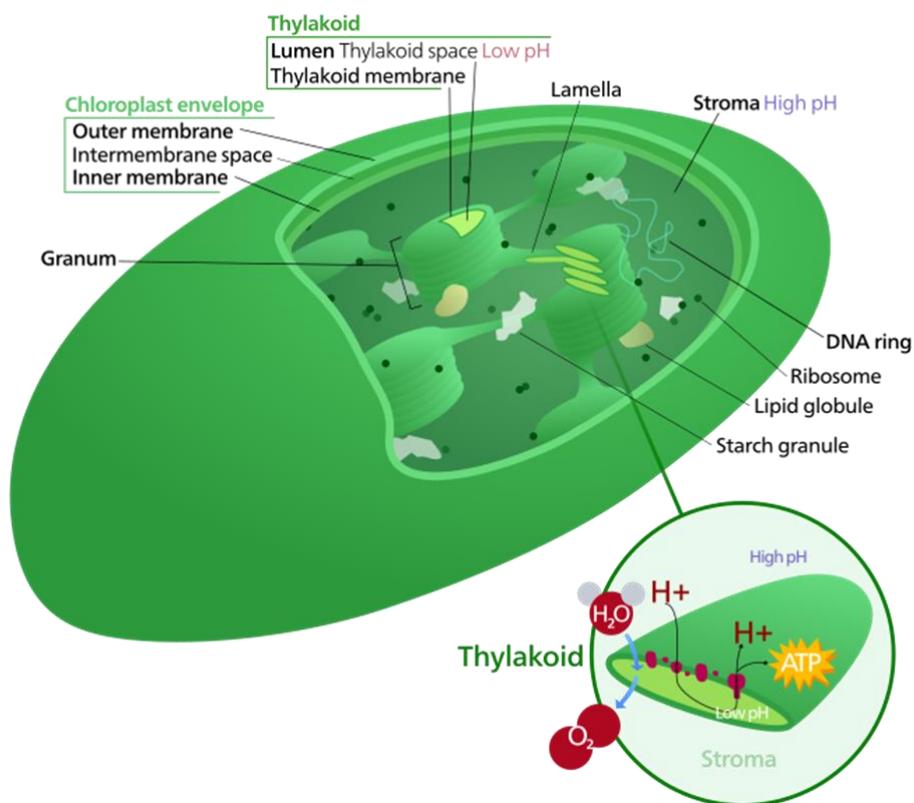
Molécule signal d'importance, trois organelles hébergent des ROS : les chloroplastes, les mitochondries ainsi que les peroxysomes (Foyer et Noctor 2009). Hormis la production de ROS et d'oxyde nitrique (NO), les rôles directs de l'implication de la mitochondrie dans le processus d'immunité végétale sont encore peu connus (Li et al. 2017, Xu et al. 2020). En revanche, ces trois organelles présentent la capacité d'étendre leurs membranes afin de former respectivement des stromules, des matrixules et des peroxules lors d'accumulation de ROS ou de NO (Mathur 2021). La nature et les fonctions de ces extensions membranaires sont encore peu décrites dans la littérature. L'hypothèse principale de ces structures dynamiques est à des fins de communication grâce à un accroissement de surface de contact avec d'autres organelles et/ou le noyau (voir la partie *1.2.2.2 Dynamique structurelle et stromules*) (Caplan et al. 2015, Terrón-Camero et al. 2020). Dans la dernière décennie, la diversité des fonctions chloroplastiques a été mise en lumière au travers de ses rôles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, comme senseur ou même outils de réponse aux stress.

## 1.2.2 Le chloroplaste

Reliquat de l'endosymbiose entre une cyanobactérie et une cellule eucaryote il y a un peu plus de 1 milliard d'années, le chloroplaste se délimite par une double membrane (Figure 1.5) (McFadden et al. 1994). Site de l'assimilation de carbone par la photosynthèse, les chloroplastes sont aussi le site d'entreposage des granules d'amidon et de lipides et abritent des étapes de la synthèse des bases azotées, d'acides aminés, de lipides ou encore de phytohormones (Sakamoto et Takami 2018). Les thylakoides comportent des membranes riches en glycolipides qui accueillent les complexes protéiques et les pigments des photosystèmes. Les régions riches en empilement de ces thylakoides, les grana, peuvent même contenir jusqu'à 80 % de protéines (Kirchhoff et al. 2002).

Retrouvé en de nombreuses copies, le génome chloroplastique s'associe à la protéine SWITCH/SUCROSE NON-FERMENTABLE COMPLEX 4 (SWIB4) qui permet sa compaction au sein des nucléoïdes (Melonek et al. 2012). Les nucléoïdes sont associés à

la membrane interne et/ou celles des thylakoides notamment par l'intermédiaire d'oligomère du facteur de transcription WHIRLY1 (Grabowski et al. 2008, Foyer et Noctor 2009). WHIRLY1 participe à la stabilité du génome chloroplastique (ADN, mais aussi ARN) (Prikryl et al. 2008). Chez les plantes vasculaires, aucune protéine homologue aux histones n'a, pour le moment, été rapportée dans les nucléoïdes chloroplastiques (Sakamoto et Takami 2018). Toutefois, Majeran et al. ont identifié plusieurs complexes protéiques impliqués dans la réplication, la réparation et la transcription du génome chloroplastique chez le maïs (Majeran et al. 2012). Ils formulent l'hypothèse que la nature des protéines associées aux nucléoïdes, et donc au génome chloroplastique, dépend du stade de développement et de son profil d'expression.



**Figure 1.5 Structure du chloroplaste.**

L'enveloppe du chloroplaste se compose d'une membrane externe et interne. Dans le stroma se retrouvent les grana : empilements de thylakoides. C'est dans la membrane de ces derniers que les pigments et les complexes des PSI et PSII se rassemblent pour fixer le carbone gazeux à l'aide du cycle de Calvin; la photosynthèse. Les nucléoïdes (DNA ring)

représentent les multiples copies du génome chloroplastique présents dans chaque plaste. Des gouttelettes lipidiques et des granules d'amidon sont aussi retrouvées dans le stroma chloroplastique. Figure produite par Kelvinsong, Wikimedia Commons.

La longue co-évolution noyau-chloroplaste a entraîné une réduction de la taille du génome chloroplastique en faveur du génome nucléaire (Zoschke et Bock 2018). En effet, alors qu'un chloroplaste se constitue de plus de 3 000 protéines différentes, son génome n'en code qu'entre 50 et 200 (Leister 2003). En ce sens, l'expression de l'ARN polymérase NUCLEAR-ENCODED RNA POLYMERASE (NEP) agit de concert avec la PLASTID-ENCODED RNA POLYMERASE (PEP) dans la transcription du génome chloroplastique (Börner et al. 2015). L'importation de telles protéines s'effectue par un mécanisme relativement bien caractérisé par la littérature : le processus de translocation TRANSLOCON AT INNER MEMBRANE OF CHLOROPLAST/TRANSLOCON AT OUTER MEMBRANE OF CHLOROPLAST (TIC/TOC) (Shi et Theg 2013). Celui-ci nécessite le clivage d'un peptide de transit souvent positionné en N terminal des préprotéines. Cependant, la nature des acides aminés et la longueur de ce peptide (de 13 à 146 acides aminés) est très variable (Zhang et Glaser 2002, Teixeira et Glaser 2013). D'autres mécanismes de translocation de cargos de protéines sont à l'étude. Un processus de translocation par le biais de N-glycosylation nucléotidique et des vésicules issues du GA est envisagé (Baslam et al. 2016). Finalement, d'autres protéines telles que la grande sous-unité de la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO), certaines sous-unités des complexes des photosystèmes I et II ou encore des ARN ribosomaux, de transferts ou des protéines ribosomales restent exprimées par le génome chloroplastique (Allen et al. 2011, Green 2011).

### **1.2.2.1 *Signalisation rétrograde***

En une quinzaine d'année, la littérature a reconnu l'importance de la communication rétrograde chloroplaste-noyau. Cette dernière intervient dans un contexte de biogénèse des plastes (assemblage et maintien des photosystèmes), de croissance tissulaire (morphologie foliaire, fructification) ou un ajustement à un contexte de stress biotique et

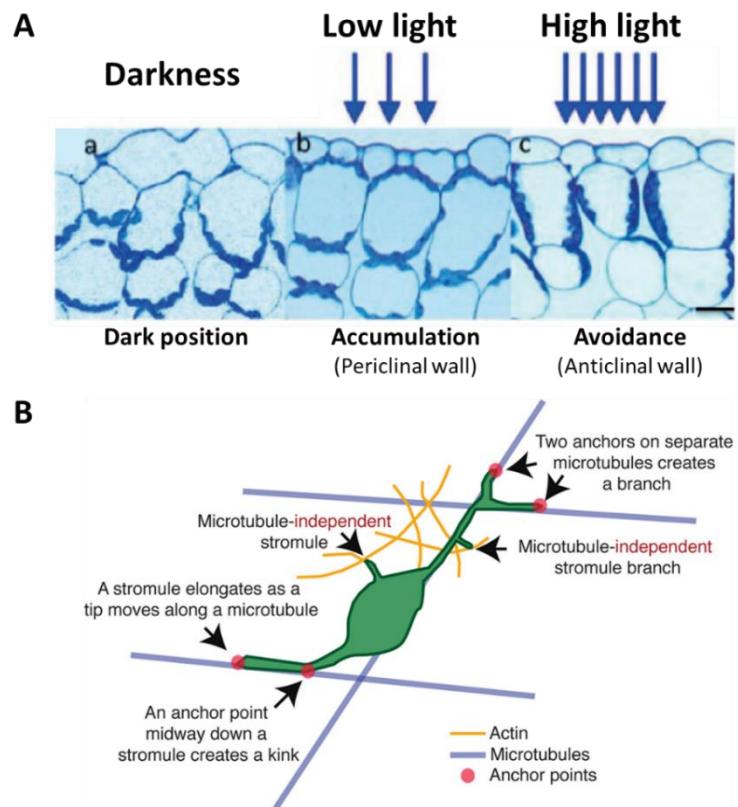
abiotique (fermeture des stomates, surexcitation des photosystèmes) (Chan et al. 2016, Kacprzak et al. 2019). L'ensemble de ces facteurs vont altérer l'homéostasie chloroplastique en modifiant les conditions oxydo-réductrices (GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup>) ou les niveaux de phosphorylation de plusieurs protéines des photosystèmes dont la famille des LIGHT-HARVESTING COMPLEX (LHC). Les chloroplastes de l'épiderme et du parenchyme vasculaire sont distingués de ceux du mésophylle pour leurs sensibilités particulières aux stress (Beltrán et al. 2018). Par l'intermédiaire de ROS, de métabolites (SA, JA, acide abscissique (ABA) ainsi que des produits de l'oxydation de caroténoides) ou bien de protéines (TFs), le chloroplaste est capable de moduler le transcriptome nucléaire (Barajas-López et al. 2013, Chan et al. 2016). Par exemple, le facteur de transcription WHIRLY1 est suspecté de pouvoir transloquer du chloroplaste vers le noyau (Lepage et al. 2013). Impliqué dans la stabilité des nucléoïdes, sa translocation nucléaire déclenche les cascades moléculaires dépendantes de l'ABA (Isemer et al. 2012). Le tocophérol chloroplastique, lui, est impliqué dans la biogénèse des micro-ARN et contribue à accroître la thermotolérance chez *A. thaliana* (Fang et al. 2019). Aussi, l'accumulation de ROS au noyau peut engendrer des dommages au génome provoquant la mort cellulaire programmée (PCD) (Chan et al. 2010). Les mécanismes régissant la translocation de ces molécules restent encore inconnus. Cependant, l'hypothèse de mécanismes impliquant des aquaporines a été récemment proposée (Breeze et Mullineaux 2022). La diversité et l'importance de cette communication rétrograde soulèvent alors la question pratique de la translocation physique de ces molécules au travers de la cellule; de son cytoplasme et des membranes chloroplastiques et nucléaires. Un horizon de réponse pourrait se retrouver dans le dynamisme spatial du corps chloroplastique.

#### **1.2.2.2 *Dynamique structurelle et stromules***

Organelle sensible aux variations lumineuses, le chloroplaste présente des déplacements très singuliers. Rythmés par le cycle circadien, les chloroplastes peuvent effectuer des mouvements de type cyclose (le chloroplaste tourne autour de la vacuole) ou de photorelocalisation (accumulation sur un axe pericinal ou anticinal des cellules du

mésophylle) pour moduler l'exposition lumineuse des grana (Figure 1.6, panneau A) (Takagi 2003, Wada 2016, Gotoh et al. 2018, Wada et Kong 2019). En présence d'un pathogène, les chloroplastes vont se regrouper autour du noyau et à l'interface avec le pathogène (Ding et al. 2019). Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans ces déplacements restent encore peu explorés, la protéine CHLOROPLASTIC UNUSUAL POSITIONING 1 (CHUP1) pourrait être impliquée. En effet, elle interagit avec la membrane externe du chloroplaste et la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'actine (Oikawa et al. 2008, Kadota et al. 2009, Wada et Kong 2019).

Comme cité dans la partie 1.2.1 Coopération des organelles, la double membrane du chloroplaste est très dynamique. En effet, c'est avec l'avènement des techniques d'observation microscopique et l'intérêt pour la phytopathologie qu'il a été possible d'observer l'extension membranaire des chloroplastes sous forme d'un tubule où le stroma peut y circuler : un stromule (*stroma-containing tubules*) (Shalla 1964, Daniell 1999).



**Figure 1.6** Mouvements spatiaux du chloroplaste.

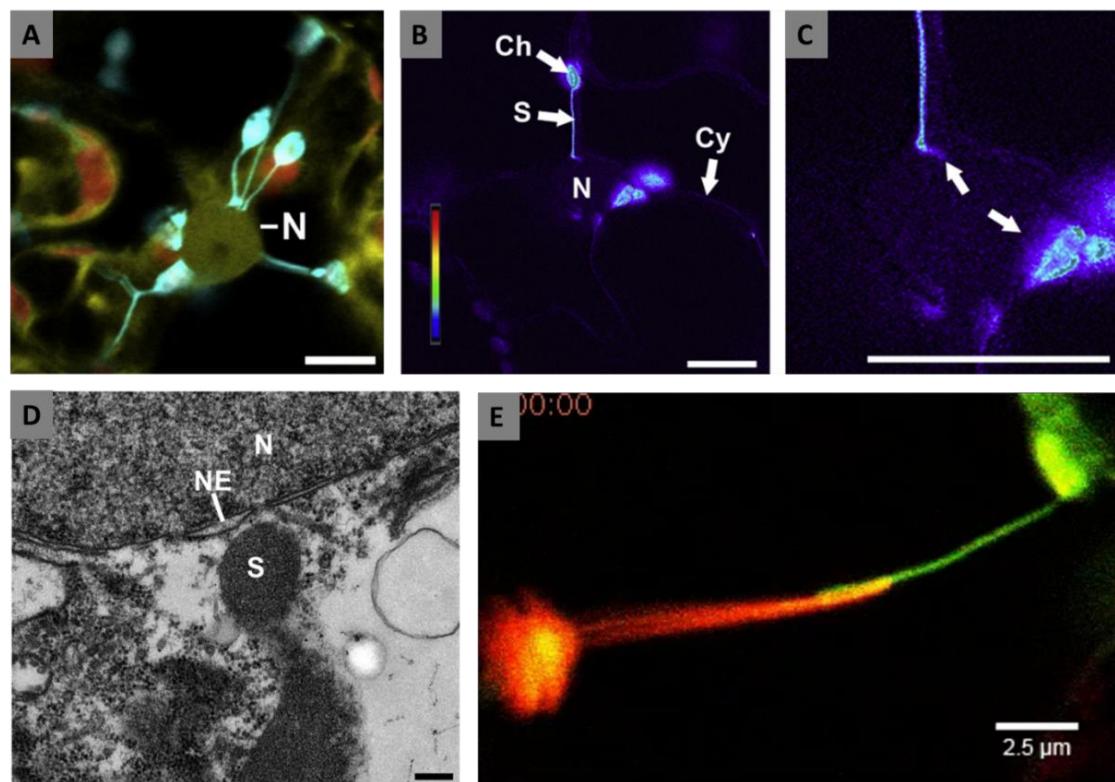
**A.** Dépendamment de l'intensité lumineuse, les chloroplastes du mésophylle peuvent adopter plusieurs positionnements. (a) À l'obscurité, les chloroplastes s'accumulent sur la face abaxiale de la cellule. (b) Des conditions lumineuses adaptées entraînent une disposition des chloroplastes sur les faces anticlinales de la cellule et, (c) sous une forte intensité lumineuse, les chloroplastes sont majoritairement retrouvés sur les faces périclines des cellules du mésophylle. Échelle : 20  $\mu\text{m}$ . Figure modifiée issue de (Wada 2016). **B.** Schéma des réseaux du cytosquelette empruntés par les deux types de populations de stromules. Les stromules interagissant avec les moteurs protéiques associés aux microtubules sont plus lents, plus stables et présentent des points d'ancre structuraux. Les stromules dépendant au réseau d'actine sont davantage éphémères. Figure issue de (Erickson et al. 2018).

Cette structure très dynamique peut s'étendre et se rétracter en quelques secondes. Les mesures de vitesse d'extension des stromules ont mis en évidence deux populations illustrées par le panneau B de la figure 1.6. Lent (0,039  $\mu\text{m/sec}$ ), mais stable, un premier ensemble de stromules est dépendant de la machinerie associée aux microtubules comme le complexe moteur Kinesin4A/FRA1 ou la KINESINE-LIKE CALMODULIN-BINDING PROTEIN (KCBP). À l'inverse, rapide (0,241  $\mu\text{m/sec}$ ), mais instable, le second type de stromule va se mouvoir grâce à l'interaction avec des moteurs protéiques du réseau d'actine comme la Myosin XI-I (Erickson et al. 2018). L'indication de plusieurs populations de stromules est aussi évoquée dans l'extension de certains stromules dépendamment de la présence de CHUP1 (Savage et al. 2021, BioRxiv). L'émission d'hypothèses quant à la structure et aux fonctions des stromules a plusieurs fois soulevé des débats dans la communauté scientifique (Schattat et al. 2012, Delfosse et al. 2018).

Certaines des hypothèses proposent le stromule comme un moyen pour le chloroplaste de se mouvoir, de coordonner ses déplacements avec d'autres (chloroplaste ou noyau), mais aussi d'augmenter sa surface de contact et de délivrer rapidement des molécules dans un système de signaux rétrogrades ou de défense (Kumar et al. 2018), [(Toufexi et al. 2019) disponible sur BioRxiv et partiellement republié sous (Savage et al. 2021)]. En outre, les résultats des récentes études s'accordent sur la contribution positive des stromules dans la réponse de défense aux pathogènes (Caplan et al. 2015, Erickson et Schattat 2018, Savage et al. 2021). En effet, le potentiel fonctionnel des stromules dans

l'acheminement des signaux rétrogrades et inter-organelles est fortement suspecté et les études testant cette hypothèse ne sont qu'à leurs débuts. Malgré tout, Caplan et al. (2015) présentent une corrélation entre l'induction de stromules, la libération de ROS du chloroplaste vers le noyau et évoquent le rôle favorable des stromules dans l'intensité de la PCD (Figure 1.7, panneaux A, B et C). Ils ont vérifié l'absence d'une fusion des membranes et illustrent une grande proximité entre l'extrémité d'un stromule et la membrane nucléaire (Figure 1.7, panneau D). En revanche, des macromolécules comme la protéine photoconvertible mEosFP ne semblent pouvoir transloquer d'un chloroplaste à un autre lors d'un contact entre deux stromules (Figure 1.7, panneau E) (Schattat et al. 2012). Aussi, les chloroplastes dans un rayon de moins de 8  $\mu\text{m}$  ont une tendance significative à former davantage de stromules (Erickson et al. 2018).

La littérature actuelle s'intéresse aux stress et aux mécanismes impliqués dans l'induction des stromules. Ces derniers peuvent être induits par des stress abiotiques comme la lumière (Brunkard et al. 2015, Exposito-Rodriguez et al. 2017). Dans un but de concision, l'emphase sera mise subséquemment sur l'induction de stromules par le biais de stress biotique. La machinerie moléculaire conduisant à l'extension physique des membranes chloroplastiques semble être localisée, au moins en partie, dans le stroma (Brunkard et al. 2015). Chez *A. thaliana* comme chez *N. benthamiana*, la protéine CHUP1 semble être un régulateur négatif, direct ou indirect, de l'induction de stromules (Caplan et al. 2015). La délétion complète de CHUP1 semble induire l'accumulation des chloroplastes autour du noyau (avec ou sans stress biotique). Surprenamment, les mutants de *N. benthamiana* *chup1* sont davantage susceptibles à *P. infestans*. Cela pourrait être en lien avec une potentielle déficience dans l'accumulation de callose autour des sites de pénétration des hyphes (Savage et al. 2021).



**Figure 1.7 Caractérisation de la nature des stromules dans les cellules de l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana*.**

**A.** Induction et convergence de stromules vers le noyau lors de l'induction de la PCD déclenchée par l'interaction p50-NRIP1 (effecteur du Tomato Mosaic Virus (*TMV*) – récepteur chloroplastique N RECEPTOR INTERACTING PROTEIN 1). Le noyau et le cytoplasme sont en jaune (p50-Citrine). La fluorescence naturelle de la chlorophylle est en rouge. La protéine chloroplastique NRIP1 est en bleu (Cerulean). N : noyau. Échelle : 10 μm. **B.** L'étude de la concentration de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par l'expression transitoire de RecA9cTP-HyPer illustre l'accumulation de  $H_2O_2$  dans le corps chloroplastique et le stromule. Ch : chloroplaste, S : stromule, N : noyau, Cy : cytoplasme. Échelle : 10 μm. **C.** Accumulation locale de  $H_2O_2$  dans l'espace nucléaire à l'interface avec le stromule. Échelle : 10 μm. **D.** Observation au microscope électronique de l'interface noyau-stromule. La membrane externe du chloroplaste ne s'associe pas avec la membrane nucléaire. N : noyau, NE : enveloppe nucléaire, S : stromule. Échelle : 0,2 μm. Les figures A à D sont issues de (Caplan et al. 2015). **E.** Deux chloroplastes sont en contact par le biais de leurs stromules. La protéine photoconvertible, tpFNR::mEosFP convertie (orange) par impulsion lumineuse ne semble pas être transloquée vers le stromule du second plaste. Figure issue de (Schattat et al. 2012).

Aussi, l'infection par *P. infestans* provoque le regroupement de chloroplastes autour des hyphes grâce au réseau de filaments d'actine et induit la formation de stromules (Savage et al. 2021). L'extension de ces derniers semble majoritairement dépendante de l'activation du récepteur membranaire BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1), à l'inverse de la mobilité chloroplastique qui reste opérationnelle (Savage et al. 2021). Les effecteurs de pathogènes sont régulièrement utilisés comme outils pour la caractérisation des cascades d'induction de stromules (Krenz et al. 2012, Erickson et al. 2014, Caplan et al. 2015, Erickson et al. 2018). L'effecteur nucléo-cytoplasmique XANTHOMONAS OUTER PROTEIN Q (XopQ) du pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*; souche 85-10) est reconnu par le récepteur RECOGNITION OF XOPQ 1 (TLR ROQ1) et engendre une forte induction de stromules chez *N. benthamiana* et *A. thaliana* par l'intermédiaire de la voie EDS1 et NRG1-ADR1 (Schultink et al. 2017, Erickson et al. 2018). Comme rapporté par la figure 1.8, les protéines impliquées dans la transduction de signal relié à l'ETI comme EDS1, NRG1 et ADR1 ont un rôle important dans l'induction de stromules, mais aussi dans la réponse de défense par l'intermédiaire du déclenchement de la PCD. Du fait de sa diversité fonctionnelle et son dynamisme (membrane et déplacement), le chloroplaste est donc une organelle de grand intérêt aux fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire comme pour la résistance immune de la plante.

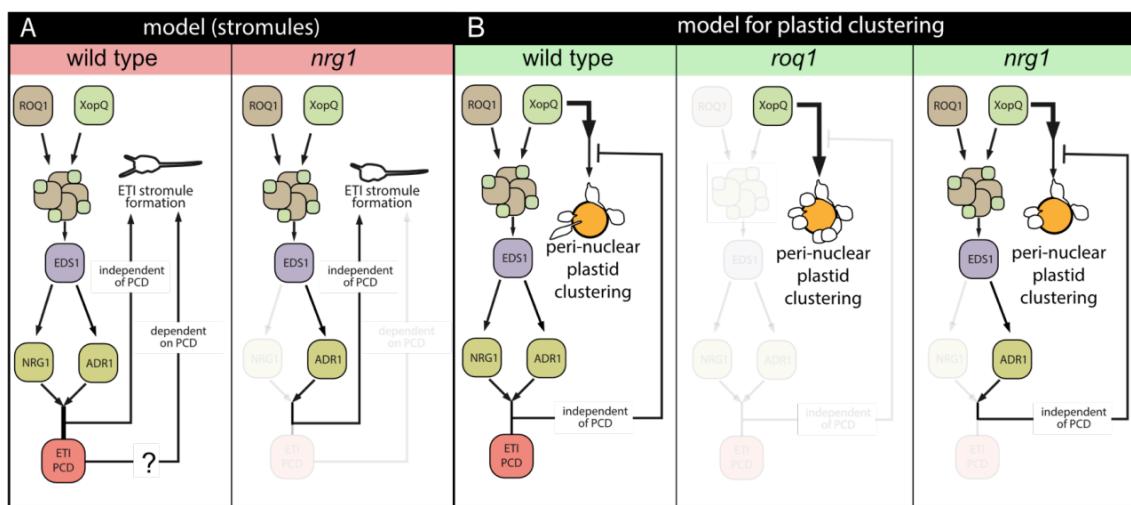


Figure 1.8 Modèle de la cascade d'induction de stromules spécifique à XopQ.

L'effecteur XopQ induit la formation de stromules, mais aussi l'accumulation des chloroplastes au noyau ainsi que la PCD. L'étude du comportement chloroplastique au travers de multiples mutants délétères (*eds1*, *nrg1* et *roq1*) a permis l'ébauche d'une cascade d'induction : ROQ1 et EDS1 sont essentiels au déclenchement de la cascade, NRG1 participe à l'induction de la PCD et ADR1 permet l'induction de stromules même en absence de NRG1. Aussi, la présence de XopQ chez les mutants dont la voie de transduction de signal spécifique à l'ETI est rompue (*eds1*, *roq1* et *adr1\_nrg1*) induit un regroupement périnucléaire des chloroplastes supérieur aux conditions sauvages. Modèle proposé par (Prautsch et al. 2021) *en cours de révision et disponible sur BioRxiv*.

### 1.2.2.3 *Une cible stratégique pour les pathogènes*

Organelle nécessaire à la synthèse de molécules signales ou de phytohormones nécessaires à la défense (ROS, SA, JA, ABA), le chloroplaste est rapporté comme une cible récurrente des pathogènes bactériens, viraux ou fongiques.

Près d'une vingtaine d'effecteurs bactériens ciblent le chloroplaste (Yang et al. 2021). Par exemple, de nombreux effecteurs sécrétés par la bactérie *P. syringae*, nommés HYPERSENSITIVE RESPONSE AND PATHOGENICITY OUTER PROTEINS (Hop) ciblent la structure ou l'homéostasie du chloroplaste (Li et al. 2014, Rodriguez-Puerto 2019). Plus précisément, HopI1 remodèle la structure des thylakoïdes et inhibe l'induction de SA par le biais de la HEAT SHOCK PROTEIN 70 chloroplastique (HSP70) (Jelenska et al. 2007). L'effecteur HopN1 inhibe l'accumulation de ROS en liant la protéine PsbQ qui réduit l'assimilation du CO<sub>2</sub> par le photosystème II (Rodríguez-Hervá et al. 2012). L'effecteur HopD1 limite la synthèse d'acide salicylique par l'inhibition de la translocation du facteur de transcription NTM1-LIKE9 (NTL9). Celui-ci ne permet donc plus l'expression de l'ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1) : enzyme en amont de la voie de synthèse de SA (Block et al. 2014). D'autres effecteurs, comme XopQ ou XopL, ont une incidence sur la morphologie et le dynamisme chloroplastique sans y transloquer (Erickson et al. 2018, Prautsch et al. 2021). En effet, XopL est une Ubiquitine ligase E3 qui se lie au réseau des microtubules. Celui-ci réprime fortement la formation de stromules et provoque le regroupement des chloroplastes au noyau (Erickson et al. 2018). D'autre part, la protéine K6 (d'un poids moléculaire de 6 000Da) permet la réPLICATION du

virus de la mosaïque du navet (TuMV) en provoquant des invaginations dans la membrane externe du chloroplaste par le biais du ER et du réseau de filaments d'actine (Wei et al. 2010). La toxine ToxA des champignons nécrotrophes *Parastagonospora nodorum*, *Bipolaris sorokiniana* et *Pyrenophora triciti-repentis* est rapportée pour interagir avec plusieurs protéines dont ToxA BINDING PROTEIN 1 (ToxABP1). Cette interaction induit l'accumulation chloroplastique de ROS par l'altération structurelle des photosystèmes et provoque la nécrose des tissus (Ciuffetti et al. 2010). Finalement, comme rapporté par la figure 1.13, les protéines CHLOROPLAST-TARGET PROTEIN CTP1, CTP2 et CTP3 du basidiomycète *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) présentent une localisation dans le stroma et des corps chloroplastiques (Petre et al. 2015, Petre et al. 2016). Malheureusement, les fonctions de ces derniers n'ont pas encore été élucidées.

### 1.3 *Melampsora larici-populina*, le phytopathogène qui joue sur deux tableaux

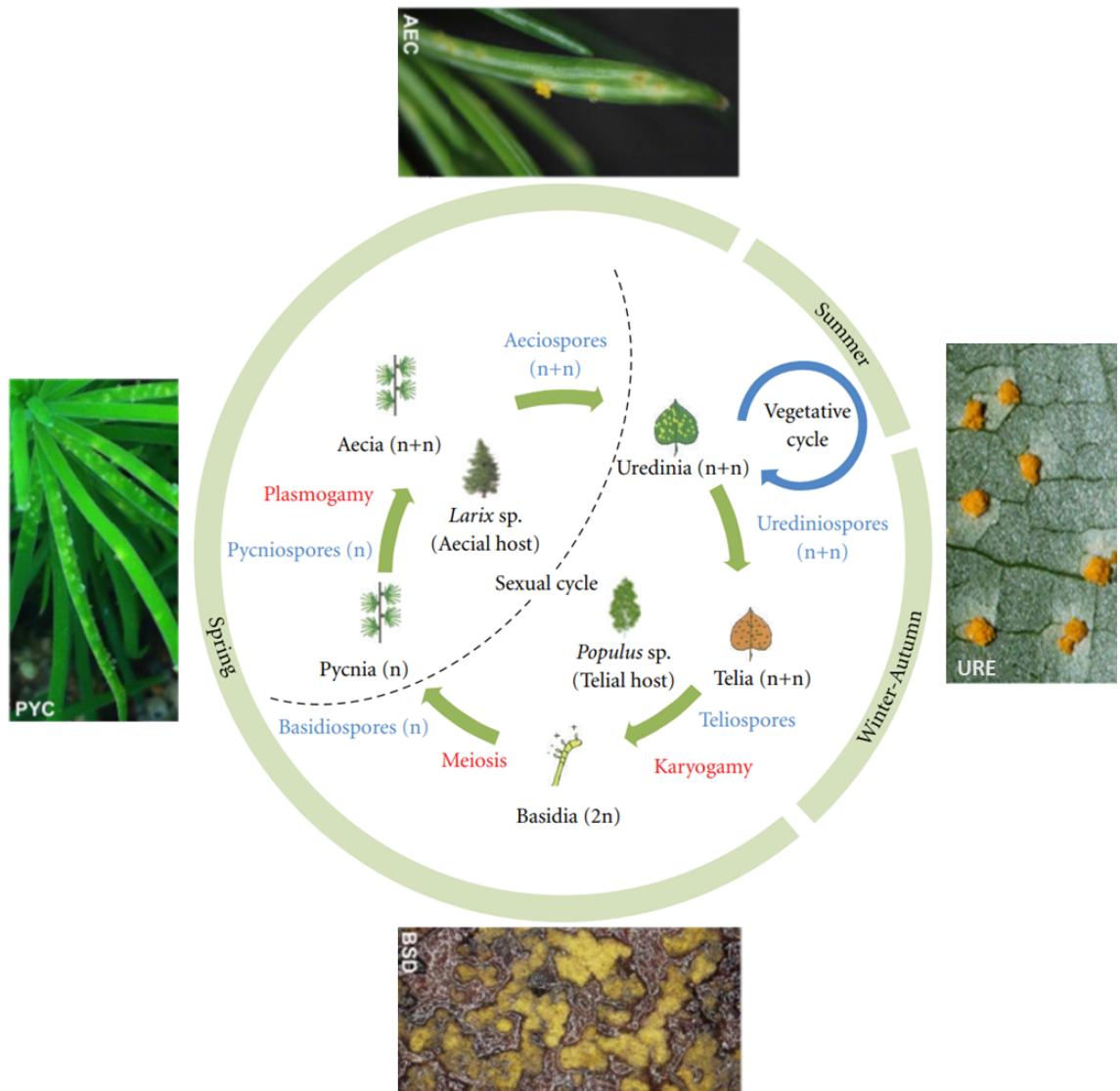
Le basidiomycète *Mlp* fait partie des 8 000 espèces que recense la plus grande famille de phytopathogènes : les Rouilles (Lorrain et al. 2019). Ces derniers partagent la caractéristique d'être dépendant d'un hôte pour se développer : ils sont des biotrophes obligatoires. Cette dépendance induit une forte spécialisation de ces pathogènes à leurs hôtes. Des cultures de grands champs comme le blé (pathogène : *Puccinia graminis* f.sp. *trictici*), le soja (pathogène : *Phakopsora pachyrhizi*) ou le lin (pathogène : *Melampsora lini*), mais aussi des arbres et arbustes comme le pommier (pathogène : *Gymnosporangium juniperi-virginianae*), les myrtes (pathogène : *Austropuccinia psidii*), le peuplier et les pins (pathogène : *Cronartium ribicola*) subissent les ravages de cette famille de champignons responsable de milliards de dollars (USD) de perte de rendement agricole chaque année (Goellner et al. 2010, Godoy et al. 2016, Aime et al. 2017, Talhinhos et al. 2017). La majorité des espèces caractérisées, comme *Mlp*, accomplissent un macrocycle de vie héteroïque passant par cinq étapes distinctes de sporulation et nécessitant deux hôtes. Cependant, certaines espèces, comme *M. lini*, ne nécessitent qu'un hôte (autoïques), d'autres accomplissent un demicycle (ne produisent pas d'urédiniospores et sont héteroïque ou autoïque), un hémicycle (produisent des urédiniospores, des teliospores et des basidiospores, autoïque uniquement) ou encore un

microcycle (ne produit que des teliospores et des basidiospores, autoïque uniquement) (Bettgenhaeuser et al. 2014).

### 1.3.1 Cycle de vie

Parmi la cinquantaine d'espèce que compte le genre *Melampsora*, 17 sont rapportés comme parasite du genre *Populus spp.* (Vialle et al. 2011). *M. larici-populina* est à l'origine de la maladie de la rouille foliaire du peuplier qui provoque de nombreux dommages dans les peupleraies. Originaire d'Eurasie, ce basidiomycète a démontré une grande capacité d'adaptation en se propageant sur les continents australien et américain, notamment au Québec, dans les 30 dernières années (Van Kraayenoord et al. 1974, Newcombe et Chastagner 1993, Innes et al. 2004).

Biotrophe obligatoire, *Mlp* présente un macrocycle hétéroïque. Ce dernier nécessite l'infection successive de deux hôtes phylogénétiquement distincts afin d'achever son cycle de reproduction : le mélèze (*Larix spp.*) pour son cycle sexuel et le peuplier (*Populus spp.*) pour sa reproduction végétative. Comme rapporté dans la figure 1.9, le cycle de vie de *Mlp* regroupe cinq types de spores. Débutant au printemps avec la dissémination de spores haploïdes, les basidiospores puis les pycniospores, le cycle de reproduction sexuel s'articule autour de l'infection d'aiguilles de mélèze. Par la suite, les aeciospores puis les urédiniopores se succéderont dans la répétition des cycles végétatifs sur les feuilles de peuplier pendant la saison estivale. Finalement, lors de la défoliation automnale, la production de teliospores permettra l'hivernation de *Mlp* et préparera à la caryogamie puis la méiose nécessaire à la dissémination des basidiospores printaniers. Le brassage génétique induit par la reproduction sexuée est une avenue probable pour expliquer la forte dynamique de *Mlp* à s'adapter aux pressions de sélection et à démontrer de rapides détournements de résistance (Lively 2010).



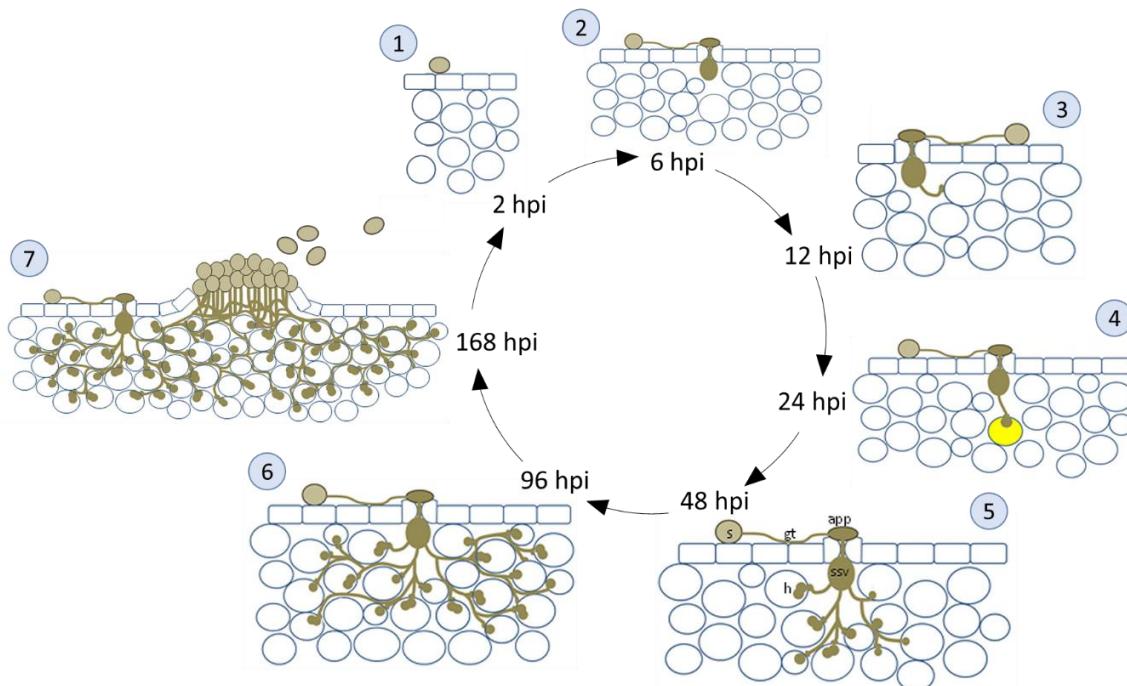
**Figure 1.9 Cycle de vie de *Melampsora larici-populina*.**

Cycle de vie rapportant les cycles sexuels et végétatifs de *Mlp*. PYC : Gouttelettes de nectar riche en pycnia et pycniospores sur des aiguilles jeunes de mélèze. AEC : Aecia et aeciospores sur des aiguilles matures de mélèze, URE : Urédinia et urédiniospores sur des feuilles de peuplier ‘Beaupré’ BSD : Basidia et basidiospores sur des feuilles mortes de peuplier ‘Beaupré’. Figure modifiée de (Hacquard et al. 2011) et (Lorrain et al. 2018).

### 1.3.2 Processus infectieux

Majoritairement disséminés par le vent, les précipitations ou les insectes, la massive production de spores est propice pour atteindre de nouveaux tissus foliaires (Figure 1.10).

L'hydratation des spores provoque la croissance du tube germinatif qui explore la surface des tissus de l'hôte (feuille du peuplier ou aiguille du mélèze). L'hyphe fongique pénètre l'épiderme et atteint le mésophylle grâce à l'action physique et chimique d'un appressorium sur le stomate. La formation d'une vésicule substomatale précède la formation d'hyphes infectieux qui vont coloniser l'ensemble du tissu et établir les zones d'interactions avec les cellules de l'hôte : l'haustorium (Garnica et al. 2014). La colonisation du mésophylle par les hyphes et l'installation des haustoria permet alors à *Mlp* de détourner les photosynthétats et autres nutriments à ses propres fins ce qui va engendrer la majorité des conséquences pour le peuplier.



**Figure 1.10 Processus d'infection de *Melampsora larici-populina* : exemple du cycle végétatif (uréridiospores).**

1. Fixation de la spore et croissance du tube germinatif.
  2. Pénétration stomatale et formation de la vésicule substomatale.
  3. Croissance des hyphes infectieux et exploration du mésophylle.
  4. Formation des haustoria.
  5. Densification du réseau d'hyphes et multiplication des haustoria.
  6. Colonisation du mésophylle et croissance biotrophique.
  7. Formation d'uréridinia et sporulation.
- S : Spore. gt : Tube germinatif, APP : Appressorium. SSV : Vésicule substomatale. H : Haustorium.
- Figure modifiée de (Bettgenhaeuser et al. 2014) et inspiré par (Hacquard et al. 2011).

L'haustorium est l'interface principale de contact entre le parasite et son hôte. Il est séparé du cytoplasme de son hôte par la matrice extrahaustorial (EHMx) et la membrane extrahaustorial dérivé de l'hôte (EHM) (Figure 1.12). Encore peu d'études ont exploré les mécanismes impliqués dans la réorientation des nutriments vers le champignon (Lorrain et al. 2019). Toutefois, des gènes homologues aux gènes codant pour des perméases d'acides aminés (AAT), des transporteurs d'oligopeptides (OPT) ainsi que des transporteurs d'hexose sont surexprimés dans les phases terminales du cycle d'infection de *Mlp* (Hacquard et al. 2010, Duplessis et al. 2011, Garnica et al. 2013). Ne codant pas pour les enzymes actives dans l'assimilation des sulfures et des nitrates inorganiques, les nutriments préalablement réduits par l'hôte sont possiblement redirigés vers *Mlp* par le biais de l'haustorium (Duplessis et al. 2011). L'haustorium représente aussi l'interface par lequel le parasite sécrète de nombreuses protéines effectrices dans le cytoplasme de l'hôte pour, notamment, moduler sa réponse immunitaire. Les mécanismes de translocation des effecteurs n'ont pas encore été caractérisé (Petre et Kamoun 2014).

La partie 1.3.5 subséquente abordera en détail les dernières avancées et hypothèses quant aux interactions moléculaires entre les Candidate Secreted Effector Proteins (CSEPs) sécrétées par *Mlp* et ses hôtes.

### 1.3.3 *Larix spp.*

Dans l'hémisphère nord, les conifères sont les plantes les plus abondantes en termes de biomasse (Sadovsky et al. 2016). Seul conifère aux feuilles caduques, les mélèzes sont des essences utilisées pour le reboisement de forêts et remplissent un rôle important dans le maintien de la biodiversité et de la séquestration de carbone (Read et al. 2009, Han et al. 2014).

De la famille des Pinacées, le mélèze (*Larix spp.*) regroupe 12 espèces. Endémique au Canada comme dans les forêts du nord de l'Europe et de l'Asie, le bois de mélèze est utilisé en menuiserie ou en construction pour sa solidité et ses propriétés imputrescibles. Son intérêt commercial est grandissant, notamment pour sa richesse en molécules

bioactives comme l'arabinogalactane, des flavonoïdes ou encore des diterpènes à titre de prébiotique ou des molécules anti-inflammatoires (Fitzpatrick et al. 2004, Bauer et al. 2009). Les sciures sont aussi utilisées comme combustibles ou comme complément alimentaire pour les élevages bovins laitiers (Tedesco et al. 2015). La culture de mélèze révèle, malgré tout, certaines limitations. Sensibles à la compétition avec d'autres essences, les mélèzes sont sensibles à la sécheresse, et produisent peu de graines (Deciduous 2008). Aussi, les mélèzes sont sujets à pas moins de 76 espèces fongiques pathogènes notamment des genres *Phyllosticta*, *Puccinia* ou encore *Melampsora* (Tuo et al. 1997). Dernièrement, l'oomycète *Phytophtora ramorum* a lourdement endommagé les forêts matures de Mélèze du Japon, *L. kaempferi*, du Royaume-Uni et des États-Unis (Brasier et Webber 2010). Pour sa part, *Mlp* provoque des symptômes minimes sur la croissance des individus (Duplessis et al. 2011).

Peu d'études s'intéressent à l'immunité du genre *Larix*. Cependant, l'assemblage *de novo* du génome *L. sibirica* (Sadovsky et al. 2016) et la publication de plusieurs transcriptomes de *L. kaempferi* × *L. olgensis* (Han et al. 2014), de *L. gmelinii* (Men et al. 2013) et *L. leptolepis* (Zhang et al. 2012) tendent à démocratiser son étude. Aussi, des études en lien avec les stress biotiques et abiotiques apparaissent (Men et al. 2013, Hu et al. 2015, Raffaello et Asiegbu 2017, Zeng et al. 2017, Sasani et al. 2021). Hu et al. ont notamment révélé que la réponse à l'oxyde nitrique (NO) chez *L. olgensis*, partageait des similarités avec les plantes modèles *A. thaliana* et *N. benthamiana*. Molécule réactive de l'azote importante pour la signalisation cellulaire, cette dernière induit l'expression de plus de 150 gènes spécifiques à une interaction plante-pathogène comme *FLS2*, *WRKY33*, *MAPKK* ou encore *PRI* en faveur de mécanismes de résistance.

Malgré le très récent attrait pour les raffinements des mécanismes immunitaires du mélèze, celui-ci est, d'ores et déjà, un modèle utilisé pour l'hybridation, la culture cellulaire ou comme support de culture (Nabeta 1994, Tretiakova 2013). En effet, le mélèze européen, *L. decidua*, est utilisé comme support de culture pour des croisements de *Melampsora larici-epitea typica* (Pei et al. 1999).

Souvent nommé comme le pathosystème ‘Rouille-Peuplier’, le mélèze, la troisième pièce de ce pathosystème, est l’organisme le moins étudié de ce trio. C’est avec Lorrain et al. 2018 que la littérature embrasse l’ensemble de la complexité du pathosystème *Mlp*-Peuplier/Mélèze (Lorrain et al. 2018).

### 1.3.4 *Populus spp.*

La croissance rapide du peuplier représente un grand intérêt pour la production de bois permettant une récolte des grumes après seulement 15 à 20 ans. Endémique aux forêts tempérées d’Europe, d’Amérique du Nord et du continent asiatique, 29 espèces de peupliers constituent le genre *Populus*. On y retrouve notamment les espèces *P. trichocarpa*, *P. tremula*, *P. deltoides*, *P. nigra* et *P. alba*. La récurrence des foyers d’infection de Rouille dans les popicultures est considérée comme le facteur limitant de production. En effet, les arbres parasités présentent un jaunissement précoce des feuilles (Figure 1.11, partie A), une mauvaise lignification des rameaux ainsi qu’une défoliation précoce à l’automne. La diminution des réserves carbonées et azotées à l’automne peut ralentir de 60 % la croissance générale des arbres pouvant mener jusqu’à la mort des juvéniles (Pei et Shang 1984, Pinon et Frey 2005). Les dommages dans les peupleraies peuvent être à l’origine de *M. medusae*, *M. alli-populina* mais c’est *M. larici-populina* qui reste le parasite principal du peuplier (Pinon et Frey 2005, Bresson 2011).

Afin de contrôler les épidémies, et les contournements de résistance, de nombreux hybrides ont, tour à tour, été utilisés dans ces plantations monocloniales, mais en vain (Steenackers 1988). Les hybrides *P. interamerica* ‘Beaupré’ (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*) et *P. euramerica/canadensis* (*P. deltoides* x *P. nigra*) ‘Robusta’ ont été des cultivars fréquents dans les popicultures pour leurs résistances à certains pathotypes avant les années 2000 (Pinon 1986, Ceulemans et al. 1987, Frey et Pinon 1997). Comme illustré dans la partie B de la figure 1.11, l’utilisation massive du ‘Beaupré’ en Europe comme en Amérique a induit l’apparition de la virulence 7 (*Vir 7*) en moins de 5 ans. Dernièrement, une étude des populations de *Mlp* a précisé que ce pathotype était devenu majoritaire dans les forêts européennes (Persoons et al. 2017). ‘Robusta’ et ‘Beaupré’ sont maintenant

considérés comme des modèles d'étude pour leurs profils résistant/susceptible aux différents pathotypes de *Mlp* (Cervera et al. 1996, Newcombe et al. 1996, Hacquard et al. 2012, Chen et al. 2019). En effet, la forte production de biomasse et la facilité de manipulation en champs (hybridation) comme en laboratoire (propagation végétative) du peuplier l'a conduit à être le premier génome d'arbre séquencé (*P. trichocarpa*) devenant une espèce modèle pour la biologie forestière (Tuskan et al. 2006, Petre et al. 2012, Wang et al. 2016, Wang et al. 2016). Aussi, l'hybride INRA 717-1-B4 (*P. alba* x *P. tremula*) est l'unique modèle transformable en laboratoire permettant l'étude de mutants.

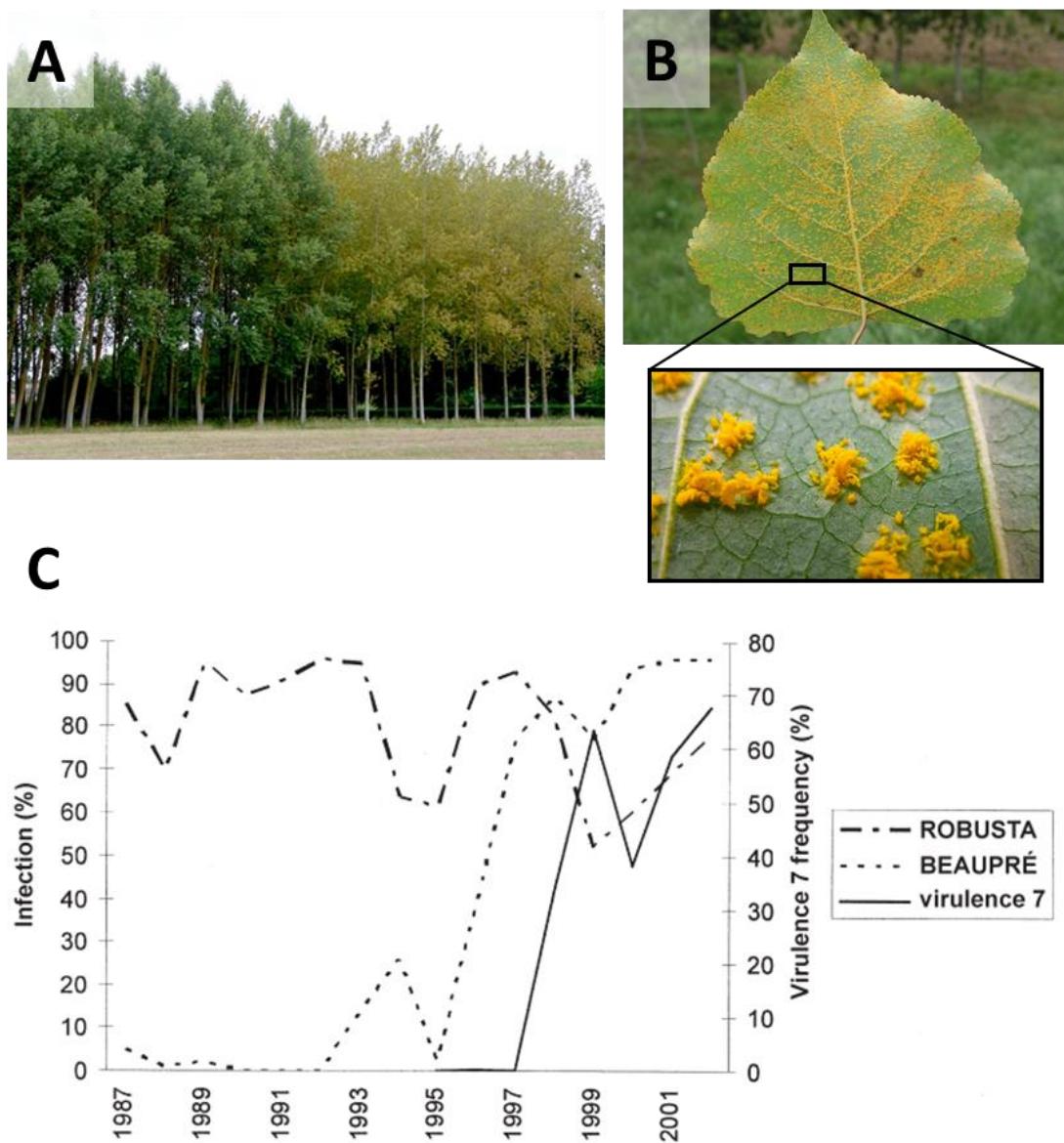


Figure 1.11 Conséquences des contournements de résistance de *Melampsora larici-populina* pathotype E4.

**A.** Différence phénotypique entre un cultivar résistant à gauche, et un cultivar sensible à droite (F.X. Saintonge, Département de la Santé des Forêts, Ephytia, INRAE). **B.** Feuille de peuplier parasité par *Mlp* (crédit : Andrej Kunca, National Forest Centre, Slovaquie). Des urédiniospores sont illustrés dans l'encadré grossi (crédit : B. Petre, INRAE, Nancy). **C.** Apparition de la résistance 7 du pathotype E4 de *Mlp* dû à la généralisation de la culture du cultivar 'Beaupré' en France. Figure de (Pinon et Frey 2005).

Organisme pouvant mettre en lumière les spécificités d'un organisme au mode de vie pérenne (Rinaldi et al. 2007), l'étude de plusieurs cultivars de peuplier a, d'ores-et-déjà, permis de constater des similarités dans les mécanismes de défense avec les plantes modèles annuelles *A. thaliana* et *N. benthamiana* (Miranda et al. 2007, Rinaldi et al. 2007, Azaiez et al. 2009, Duplessis et al. 2009, Levée et al. 2009, Petre et al. 2012, Chen et al. 2019).

Le génome du peuplier code pour 64 TLRs et 119 CLRs. Ces récepteurs sont issus de l'expression de gène R qui, en reconnaissant un effecteur pathogénique, peuvent induire les cascades de résistance. Wang et al. 2016 ont montré que la faible expression de NLRs n'est pas une caractéristique d'une interaction compatible. Aussi, le système de régulation post transcriptionnel par les miARN a été rapporté comme actif à l'encontre de pathogènes fongiques comme le chancre (Zhao et al. 2012).

L'hybride 'Robusta' est résistant aux pathotypes de *Mlp* E1, E2 et E3, mais susceptible à E4. Les auteurs Chen et al. 2019 ont mis en évidence que, malgré le maintien de l'induction de la PTI et de la régulation des gènes de défense dépendante aux miARN, les expressions des facteurs de transcription AP2/ERFs, MYBs et WRKYs étaient altérées dans le cas de l'interaction compatible avec E4. En effet, un accroissement de leurs expressions est observé 4 jours après l'initiation de l'infection. Malheureusement, au stade où l'ensemble du mésophylle foliaire est d'ores-et-déjà colonisé et la sporogénèse débute, l'expression tardive de ces facteurs de transcription ne semblent plus démontrer d'efficacité (Li et al. 2016, Chen et al. 2019).

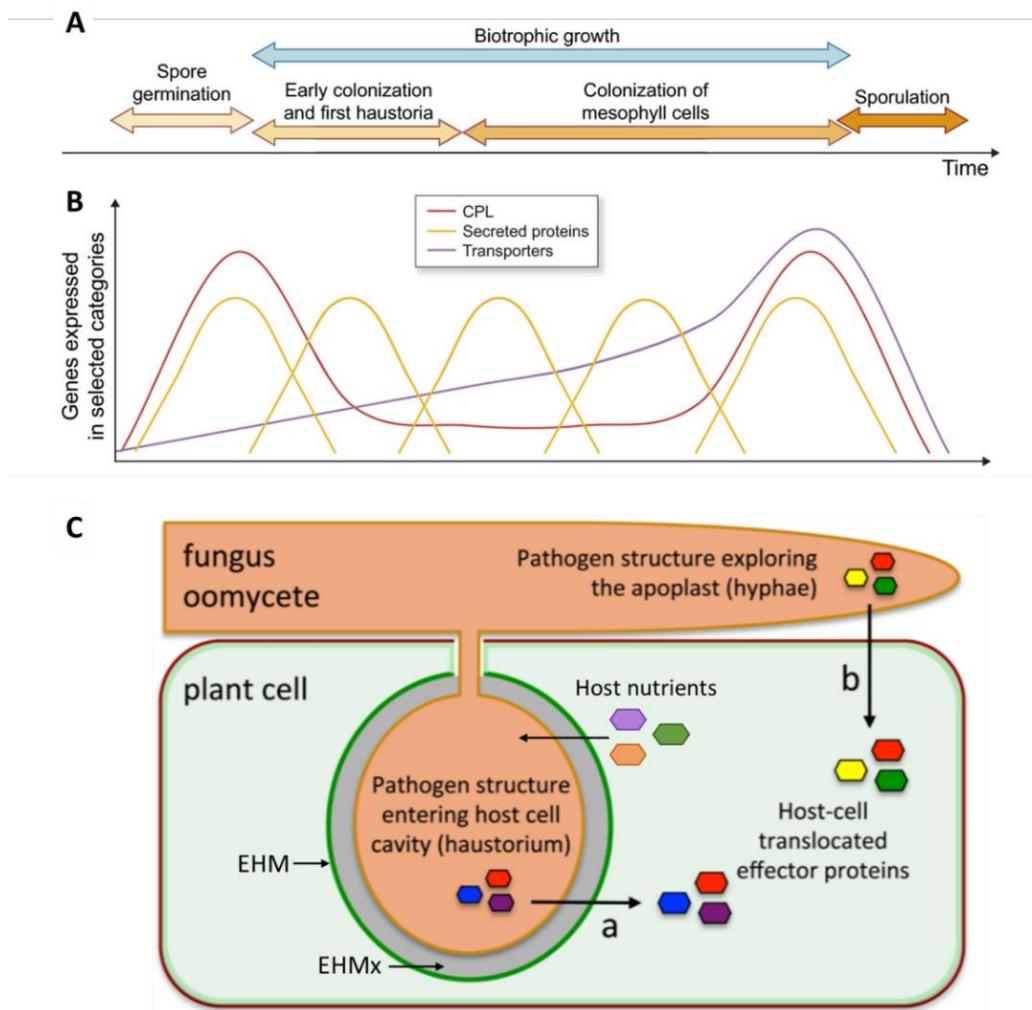
### 1.3.5 Processus de caractérisation : la science de l'effectoromique

La biotrophie obligatoire ainsi que l'hétéroécie de *Mlp*, concernant deux hôtes de taxons ayant divergé il y a environ 200 millions d'années (le peuplier et le mélèze), représente un modèle d'étude très intéressant sur le plan de la co-évolution au sein de ce pathosystème (Jiao et al. 2011). L'accumulation récente de données génomiques et transcriptomiques des trois organismes du pathosystème *Mlp*-Peuplier/Mélèze permet d'explorer des questionnements encore peu abordés par la littérature.

L'effectoromique vise la compréhension fonctionnelle des interactions moléculaires mises en jeu lors d'une interaction pathogène-hôte. Ce secteur d'étude s'applique à la caractérisation fonctionnelle de molécules sécrétées par le pathogène dans le but de moduler en sa faveur les fonctions physiologiques de son hôte (Figure 1.12, panneau A) (Gaulin 2017). Précédemment nommés 'facteurs d'avirulence', les effecteurs peuvent être des protéines, des métabolites spécialisés (Pusztahelyi et al. 2015) ou encore des ARN non codants (Wang et al. 2017, Derbyshire et al. 2019). Les effecteurs protéiques sont distingués en fonction de leurs localisations d'action. Les effecteurs apoplastiques ne sont pas retrouvés dans les cellules de l'hôte et vont, en majeure partie, être des inhibiteurs de protéases (De Wit et al. 2016, Rocafort et al. 2020). La seconde classe regroupe les effecteurs cytoplasmiques. Retrouvés à l'intérieur des cellules de l'hôte, les mécanismes de translocation empruntés par ces effecteurs nécessitent encore d'être résolus (Figure 1.12, panneau B) (Petre et Kamoun 2014). La présente analyse de littérature va se concentrer sur les dernières caractérisations d'effecteurs protéiques dans le pathosystème *Mlp*-Peuplier/Mélèze.

L'étude de ce pathosystème a emprunté une démarche communément suivie. Tout d'abord, l'étude génomique et transcriptomique de *Mlp* a conduit à l'identification de 1 184 gènes codant pour des petites protéines regroupant les caractéristiques d'effecteurs candidats : présence d'un peptide signal, absence de domaine transmembranaire, taille inférieure à 300 acides aminés, présence des ARNm dans les haustoria ou présence des protéines dans les cellules de l'hôte (Hacquard et al. 2010, Duplessis et al. 2011,

Hacquard et al. 2012). Par la suite, suivant des critères de sélection comme les profils d'expression, la présence de motifs ou d'homologie avec des effecteurs orthologues (présents chez d'autres organismes), des criblages mènent à l'identification de CSEPs aux profils prometteurs (Petre et al. 2015, Petre et al. 2016, Germain et al. 2018). Ces derniers sont alors étudiés plus en détail comme par l'étude de leurs localisations subcellulaires, la caractérisation de motifs, l'identification de potentiels interactants chez l'hôte ou encore la modulation de la susceptibilité face au parasitisme (Gaouar et al. 2016, Petre et al. 2016, Rahman et al. 2021). Une étude transcriptomique et métabolomique sur 14 CSEPs exprimés dans des lignées stables chez *A. thaliana* a démontré que l'homologie d'effecteurs de *Mlp* n'était pas conditionnelle afin d'induire des schémas de régulation homologue ou de moduler des voies fonctionnelles apparentées (Dos Santos et al. 2021). Aussi, l'effecteur Mlp124478 a été rapporté pour localiser dans le nucléole et altérer la transcription dans l'organisme modèle *A. thaliana* (Ahmed et al. 2018). Comme rapporté par la figure 1.13, les protéines CTP1, CTP2 et CTP3, quant à elles, utilisent les mécanismes intrinsèques de l'hôte pour transloquer jusqu'au chloroplaste grâce à un peptide de translocation en N-terminal (Petre et al. 2016).



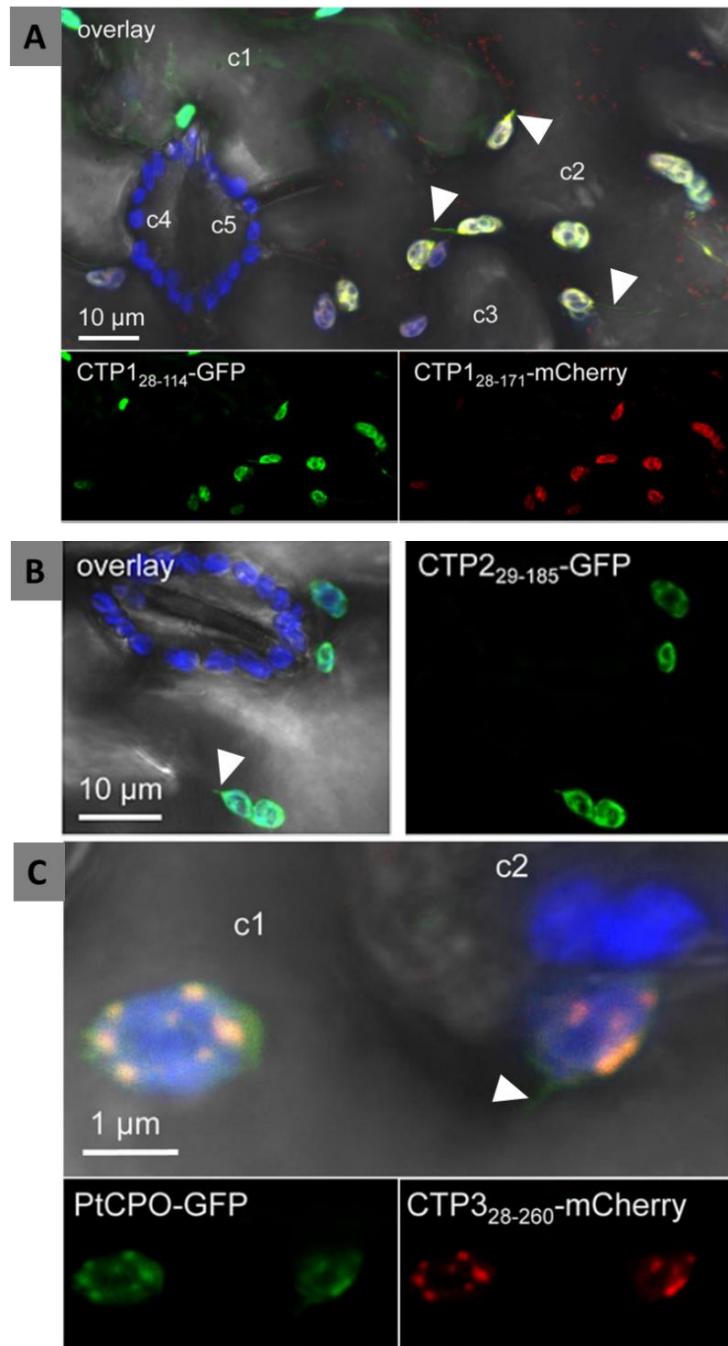
**Figure 1.12 Hypothèse de sécrétion des CSEPs et détournement des nutriments de l'hôte vers le parasite.**

A. Succession des différentes phases de développement de *Mlp* (Lorrain et al. 2018). B. CPL : CAZymes, protéases et lipases. (Lorrain et al. 2018). C. EHM : Membrane extrahaustoriale. EHMx : Matrice extrahaustoriale. Figure modifiée de (Petre et Kamoun 2014).

Il est à noter que l'étude du pathosystème est limitée par la nature biotrophe obligatoire de *Mlp*. Son impossibilité de mise en culture sur des milieux synthétiques limite la création de lignées mutantes. L'usage de plantes modèles pour la caractérisation des CSEPs est, pour le moment, encore essentiel.

Dernièrement Lorrain et al. 2018a ont comparé les transcriptomes de *Mlp* lors de l'infection d'un mélèze avec ceux recueillis lors de l'infection d'un peuplier

(Duplessis et al. 2011, Lorrain et al. 2018). Les auteurs ont identifié l'expression de gènes communs aux deux processus d'infection (indépendance à l'hôte). Ces derniers ont, aussi, mis en lumière que 19,9 % des gènes exprimés différentiellement (DEGs) étaient des gènes exprimés dépendamment de l'hôte et, parmi eux, un ensemble présentait les caractéristiques de groupes de CSEPs. La littérature indique ainsi que *Mlp* présente des transcriptomes infectieux dépendant et indépendant du type de l'hôte. La forte co-évolution entre le pathogène et ses hôtes laisse à penser que la frontière entre ces deux programmes pourrait être moins claire qu'escomptée. Ainsi, il est possible d'avancer l'hypothèse que certaines CSEPs issues des groupes de gènes exprimés indépendamment de l'hôte soient soumises à une pression de sélection nouvelle, induite par l'apparition d'une résistance de l'un des deux hôtes. En considérant les notions de course à l'armement et guerre des tranchées illustrées dans la partie 1.3.6, des divergences dans le profil d'expression et, *in fine*, la stabilisation de mutations chez un duplonc du gène de la CSEP ciblée par la nouvelle résistance pourrait être observée. À l'inverse, il est aussi possible d'envisager un phénomène de convergence de CSEPs. Ces deux avenues tendent, toutes deux, à illustrer des points mécanistiques d'importance pour le maintien de la relation trophique. L'identification et la caractérisation fonctionnelle de ces CSEPs représentent donc des questionnements de grand intérêt afin de concevoir la complexité et les raffinements mis en jeu dans un modèle trophique obligatoire.



**Figure 1.13 Les effecteurs CTP1, CTP2 et CTP3 localisent au chloroplaste**

**A.** Les deux troncations de CTP1 localisent au chloroplaste. **B.** CTP2 localise au chloroplaste. **C.** Colocalisation de COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE de *Populus trichocarpa* (PtCPO) (vert) et CTP3 (rouge) au chloroplaste et dans des structures ressemblant aux nucléoïdes. L'ensemble des observations sont faites en expression transitoire dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana*. Le signal bleu représente l'autofluorescence de la chlorophylle. Les têtes de flèches illustrent des stromules. Figure modifiée de (Petre et al. 2016).

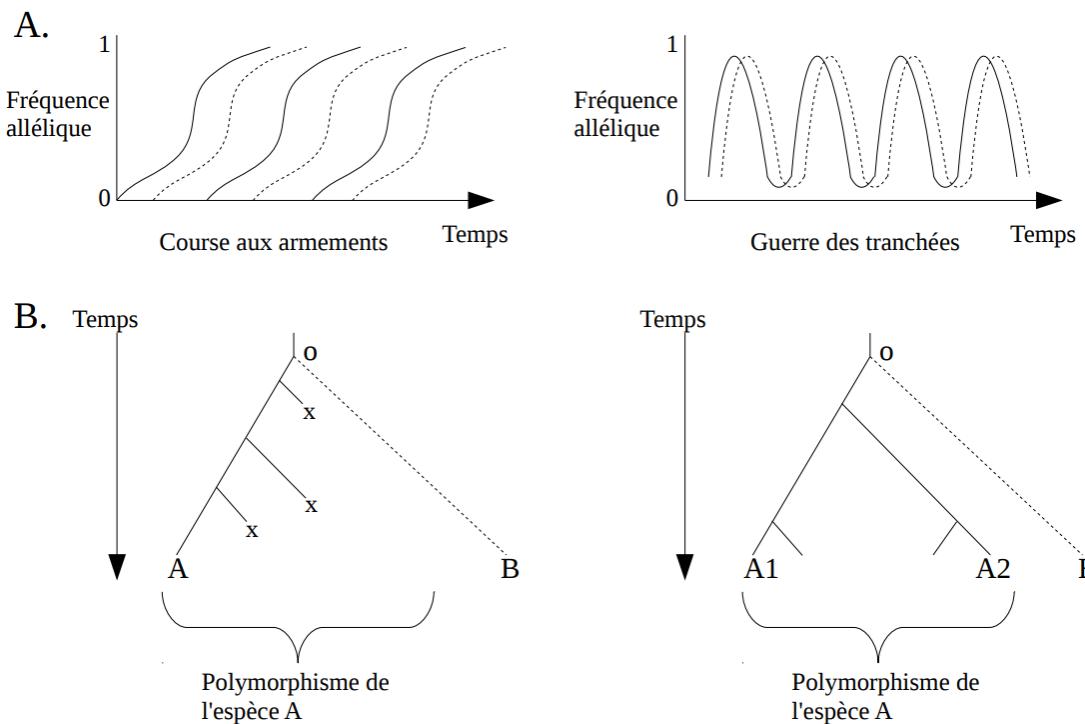
### 1.3.6 Coévolution et homologie fonctionnelle

L'ensemble des organismes réagissent à leur environnement en modulant l'expression de gènes dans le but de répondre à un stress ou maintenir leur homéostasie cellulaire. L'importance d'une telle régulation/adaptation est le facteur clé de la survie d'espèces fongiques, notamment lorsqu'elles sont dépendantes d'un hôte pour prospérer. Les interactions plante-pathogène soumettent chacun des organismes à de fortes pressions de sélection. En effet, la nature même des hôtes, en termes de conditions oxydo-réductrices, de métabolisme spécialisé ou de diversité immunitaire représente des stress perçus par les microorganismes associés à ces plantes (Dixon 2001). Ces pressions de sélection vont dépendre des contributions à la valeur sélective des allèles des gènes impliqués dans cette interaction. Regroupés sous le terme *fitness*, l'ensemble de ces traits géniques vont moduler la survie de l'individu, son succès reproducteur, et donc sa pérennité au sein de la population pathogène totale. La littérature présente deux principaux modèles de coévolution décrivant l'introduction de polymorphismes : la course à l'armement et la guerre des tranchées.

Comme illustré par la figure 1.14, le modèle de la course à l'armement traduit un équilibre dynamique entre un gène d'avirulence du pathogène et un gène de résistance de l'hôte. Dans une démarche de contournement de résistance, l'allèle du pathogène soumis à la pression de sélection va suivre un haut taux de polymorphisme non synonyme : accumulation de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Schwartz et al. 2015). Similaire à un criblage basé sur la survie des individus, l'assimilation d'un polymorphisme permettant de surpasser la résistance de l'hôte peut alors apparaître au sein de la population. La mutation allélique générant la meilleure *fitness* va *in fine* induire la disparition des autres individus portant des polymorphismes au succès de survie inférieur. Le détournement de résistance fixé au sein de la population de pathogène déporte alors la pression de sélection sur l'hôte qui va, à son tour, présenter un haut taux de polymorphismes sur une ou plusieurs allèles codant pour la ou les protéines impliquées dans le processus de résistance. Le second modèle, la guerre des tranchées, prend en compte la possibilité de l'apparition et la fixation, non pas d'un unique polymorphisme

allélique comme pour la course à l'armement, mais de deux ou plusieurs polymorphismes offrant des *fitness* équivalentes dans la population de pathogène (Persoons et al. 2017). Les détournements de résistance de ces individus vont accroître ces fréquences alléliques dans la population jusqu'à ce que l'hôte, à son tour, démontre un rétablissement de résistance et réduise la *fitness* de ces individus et la fréquence de ces allèles (Figure 1.14, panneau A).

La répétition de ces cycles de détournement-rétablissement de résistance favorise la diversité nucléotidique d'allèles menant à certaines ségrégations alléliques. À grande ampleur, ces phénomènes participent à la divergence d'espèce. À moindre échelle, et dans le cas d'un pathogène hétéroïque, cela peut entraîner une spécialisation de gènes homologues (Bueno-Sancho et al. 2017).



**Figure 1.14** Modèles de coévolution dans un scénario d'interaction de parasitisme et divergence des polymorphismes associés.

**A.** Évolution des fréquences alléliques pour les modèles de la course à l'armement et la guerre des tranchées. Les courbes pleines et discontinues représentent la fréquence d'apparition des mutations pour un allèle du pathogène (effecteur) et de son hôte (gène de résistance). **B.** Évolution

phylogénétique d'un locus d'une espèce (lignes pleines) soumis à un modèle de course à l'armement (gauche) et de guerre des tranchées (droite) par rapport à une espèce homologue (lignes discontinues). Le modèle de la course à l'armement implique la conservation d'un polymorphisme avec une meilleure survie dans la population et qui finit par surpasser les autres allèles de la population (individus identifiés par les allèles x). Le modèle de la guerre des tranchées mène à l'apparition de plusieurs polymorphismes forts (identifiés A1 et A2) qui se maintiennent dans une population donnée. Figure modifiée par Antoine Persoons de (Terauchi et Yoshida 2010).

Il est rapporté que chez 11 pathogènes fongiques hétéroïques, seul un nombre limité de gènes (en moyenne 14 %) portent des profils de spécification à l'hôte (Petre et al. 2020). La démocratisation des séquençages génomiques de divers organismes a révélé les pressions de sélection à l'œuvre (Guttman et al. 2014). C'est grâce à des outils comme l'analyse de gènes dérégulés, de polymorphismes et les ratios de substitutions synonymes et non-synonymes qu'il a été possible d'estimer les pressions de sélections appliquées sur les effecteurs de nombreux phytopathogènes et champignons mycorhiziens (Kryazhimskiy et Plotkin 2008, Guttman et al. 2014, Kamel et al. 2017). L'étude de *P. infestans* et *Phytophthora mirabilis* a révélé que, ces deux pathogènes très similaires, ont divergé par la seule mutation d'un acide aminé dans l'effecteur inhibiteur de protéase EPIC1 (Dong et al. 2014). Chez *Melampsora spp.*, les effecteurs rapportent des ratios de mutations supérieures aux protéines non sécrétées. Ce constat évoque une pression de sélection favorable à leurs divergences en fonction des cultivars de peuplier auxquels le pathogène est confronté (Joly et al. 2010). L'effecteur de la rouille du lin, *AvrP4* présente dans sa région C-terminale 14 codons soumis à une forte pression de sélection positive. L'hypothèse avancée par Van Der Merwe (2009) est un possible site d'interaction pour une reconnaissance par des protéines de l'hôte (Van der Merwe et al. 2009). L'effecteur AvrSr50 de la rouille noire des graminées, *Puccinia graminis f. sp. tritici*, échappe à sa reconnaissance par la NLR Sr50 grâce à une unique substitution Q121K (Ortiz et al. 2022). Finalement, le motif RxLR, partagé par plusieurs familles d'effecteurs paralogues chez les oomycètes sont aussi soumis à une pression de sélection positive (Win et al. 2012, Rinke et al. 2013). La présence de larges familles multigéniques et de régions riches en éléments transposables sont des traits qui ont été associés à la corrélation entre les tailles des génomes de phytopathogènes associés aux plantes comme l'oomycète *P. infestans*.

Ces caractéristiques pourraient contribuer à conserver une meilleure plasticité génomique afin de permettre une diversification des effecteurs enclins à une adaptabilité du pathogène (Jiang et al. 2009, Rouxel et al. 2011, Faino et al. 2016).

#### 1.4 Objectifs de recherche et hypothèse

À l'instar des divers organismes, relations et mécanismes décrits précédemment, la littérature estime que seulement entre 3 et 8 % de la diversité fongique a été identifiée. Parmi les 2,2 à 3,8 millions d'espèces prédictées, seulement un nombre infime d'individus sont ciblés par des études fonctionnelles approfondies (Hawksworth et Lücking 2017). Dans un contexte économique qui permet la dispersion et la multiplication de pathogènes opportunistes, cela représente une réelle avenue de perturbation des écosystèmes fragiles et des productions humaines s'y rapportant. Par ailleurs, les changements climatiques sont à l'œuvre dans de nombreuses régions du monde et les fréquentes perturbations des écosystèmes installent des conditions favorables au développement de phytopathogènes de la grande famille des Rouilles (Avelino et al. 2006). Malgré tout, parmi les multiples clades, classes et espèces, la littérature a régulièrement identifié des schémas mécanistiques homologues entre des individus de rangs taxonomiques communs comme éloignés. Ces schémas représentent des systèmes faisant appel à des fonctions cellulaires et physiologiques basales (Duplessis et al. 2011).

Dernièrement, la notion de gènes spécifiquement dérégulés en fonction d'un hôte (*Host-driven DEGs*) se démocratise de plus en plus pour leurs potentiels rôles dans la manipulation de l'hôte à des fins d'appropriation de nutriments ou de maintien d'homéostasies (Petre et al. 2020).

D'autre part, l'avènement de technologies d'observations de pointe sur des cellules vivantes a permis d'observer des phénomènes dynamiques impliqués dans les interactions inter-espèces. Ces dernières ont mené à la réévaluation du rôle du chloroplaste dans le déclenchement et le déroulement de la réponse immunitaire chez différentes espèces végétales. Ces nouvelles avenues justifient l'éclaircissement des schémas mécanistiques

moléculaires à l'aide de pathosystèmes dits 'modèles' afin d'identifier les déterminants clefs des interactions hôte-pathogène pour l'émergence de cultivars d'intérêts agronomique aux résistances durables. Sculptés par la pression de sélection, les organismes fongiques impliqués dans une relation de parasitisme hétéroïque, obligatoire et d'importance économique, comme *Mlp*, représentent donc des pathosystèmes modèles de grand intérêt scientifique.

La disponibilité des génomes des trois espèces du pathosystème ainsi que des transcriptomes à de multiples stades de développements de *Mlp* a conduit à l'essor de son étude passant de l'annotation génomique en 2011 à l'analyse populationnelle, la cartographie génique puis à l'actuelle caractérisation fonctionnelle de familles multigéniques d'intérêt (Duplessis et al. 2011, Pernaci 2015, Persoons 2015, Petre et al. 2015, Petre et al. 2016). C'est dans la transition de l'étude post-génomique vers l'effectoramique que la présente thèse s'inscrit.

S'intéressant à des profils d'expression spécifique de groupes de CSEPs, cette thèse dessert deux buts à long terme :

1. Contribuer à la caractérisation de mécanismes conservés par *Mlp* lors de l'infection de ses hôtes.
2. Approfondir l'étude de la cascade d'induction de stromules par la voie EDS1.

Pour cela, les objectifs suivants ont été posés :

**Objectif 1 :** Identifier les paires homologues de CSEPs aux profils d'expression spécifiques à l'hôte

- Annotation des spécificités d'hôte et sélection des paires de CSEPs homologues
- Analyse *in silico* des paires sélectionnées

**Objectif 2 :** Identifier les potentiels interactants des hôtes et étudier les localisations subcellulaires des CSEPs

- Criblage des CSEPs contre les protéomes sains de l'hôte spécifique et essais d'homologie d'interactions
- Étude de l'accumulation subcellulaire et colocalisation avec des marqueurs d'organelles

**Objectif 3 :** Étudier l'impact fonctionnel des CSEPs quant à l'induction de stromules

- Mettre en relief l'induction de stromules chez la plante modèle *N. benthamiana* sauvage et mutante *eds1* et *nrg1*

Afin d'approfondir la caractérisation des déterminants moléculaires du pathosystème *Mlp*-peuplier/mélèze, les données transcriptomiques en lien avec les différentes phases d'infection de *Mlp* ont été fournis par le codirecteur de cette thèse, Dr Sébastien Duplessis à l'INRAE Nancy Grand-Est. Les résultats du processus d'annotation, de sélection et d'étude *in silico* des paires homologues de CSEPs présentant des profils spécifiques aux hôtes (CSEP- HSH) répondant à l'**objectif 1** sont présentés dans la **partie 1** du **Chapitre III**. L'identification d'interactants candidats pour les CSEPs et les études des localisations cellulaires de l'**objectif 2** sont respectivement rapportés dans les **parties 2** et **3** du **Chapitre III**. Les criblages d'interaction ont été menés par levure double hybride. Les extractions d'ARN de peuplier et de mélèze nécessaire aux criblages ont été réalisées lors d'une visite dans les laboratoires du Dr Sébastien Duplessis à l'INRAE en France. Les quantifications d'induction de stromules nécessaire à la réalisation de l'**objectif 3**, sont présentées dans la **partie 4** du **Chapitre III**. Ces dernières ont été permises grâce à une étroite collaboration et un stage de recherche au sein du laboratoire du Dr Martin Schattat à la Martin Luther University à Halle en Allemagne.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Processus de sélection des CSEPs au profil HSH

##### 2.1.1 Analyse comparative des transcriptomes de *Mlp*

Les données transcriptomiques des CSEPs de *Mlp* 98AG31 (pathotype 3-4-7) sont issues des travaux de Duplessis et al. 2011 et Lorrain et al. 2018. Sommairement, les transcriptomes des urédiniospores en latence et en germination ont été comparés aux transcriptomes des haustoria de *Mlp* formés dans les feuilles de peuplier ‘Beaupré’ (*P. trichocarpa x P. deltoides*), 1 à 7 jours après l’initiation de l’infection (dpi). Les quatre réplicas indépendants d’ARN récoltés ont été analysés par oligoarray (Roche NimbleGen System Ltd, Madison WI, USA). Dans un second temps, les transcriptomes de basidiospores recueillis sur des feuilles mortes après la saison hivernale ont été comparés aux pycnies (7 dpi) et aux aecidies (14 dpi) retrouvés sur les aiguilles de mélèze infectés (*Larix decidua*). Trois réplicas d’ARN indépendants pour chaque ont été séquencés par Illumina HiSeq2500 puis analysés par le package DESeq2 R. Les transcriptomes des pycnies et des aecidies ont été regroupés afin de représenter un transcriptome infectieux spécifique au mélèze. Recueillis par deux techniques de séquençage différentes, la comparaison des transcriptomes infectieux pour le peuplier et le mélèze a été possible grâce à la normalisation par LIMMA R (Ritchie et al. 2015).

Le processus de sélection a débuté par une vérification des profils infectieux des 1 184 CSEPs identifiés par Hacquard et al. 2012. Les transcriptomes recueillis des urédiniospores et des basidiospores, annotés respectivement *USP* et *BSD* dans le tableau de la figure 3.1, ont été considérés comme non-infectieux. Les transcriptomes des haustoria recueillis sur les feuilles peupliers et des pycniaaecia issus des aiguilles de mélèze, respectivement identifiés *Poplar* et *Larch* dans le tableau de la figure 3.1, ont été

considérés comme les transcriptomes infectieux de *Mlp*. Les ratios *[Poplar/USP]* et *[Larch/BSD]* devaient être, tous deux, supérieur à 1 pour être sélectionnés à titre de CSEPs spécifique au processus infectieux. Ensuite, ces mêmes ratios ont été considérés pour attirer une prédominance d'expression; une spécificité à un hôte. Ainsi, un ratio *[Poplar/USP]* supérieur au ratio *[Larch/BSD]*, a entraîné une annotation du CSEP spécifique à l'infection d'un peuplier. Afin de limiter l'importance des bruits de fonds dans le calcul des ratios et leurs comparaisons, cette dernière règle a été appliquée à l'exception du cas où le ratio *[Poplar/Larch]* ou *[Larch/poplar]* était supérieur à 10. Dans ce cas spécifique, l'attribution de spécificité d'hôte a été corrigée (voir exemple Chapitre III-1).

### 2.1.2 Étude des familles de CSEPs

La notion d'homologie a, dans un premier temps, été appliquée en considérant les CSEPs par famille. Les familles regroupant des CSEPs avec une spécificité d'hôte commune ou ayant moins de 3 membres ont été rejetées. Les séquences des CSEPs des familles mixtes ont été collectées sur la version 2.0 du génome de *Mlp* disponible sur <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm> (Persoons et al. 2021). Les peptides signaux ont été retirés grâce à la version 4.1 de SignalP (version 6.0 disponible <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>) puis alignées par Clustal O (version 1.2.4, maintenant indisponible, European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton, UK; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) et *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE, version 3.8, EMBL-EBI, Hinxton, UK, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), tous deux, utilisant les paramètres par défaut. Finalement, les CSEPs aux spécificités d'hôtes opposées positionnés sur les nœuds terminaux des arbres phylogénétiques générés pour chaque famille mixte ont été identifiés comme des paires de CSEPs homologues aux profils d'expression spécifiques à l'hôte (CSEPs HSH).

Les taux de similarité ont été calculés par EMBOSS matcher explorer avec les paramètres par défaut (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/matcher>, matrice EBLOSUM62, pénalité de Gap = 14, pénalité de longueur de Gap = 4). Le logiciel NLStradamus a été utilisé pour la prédiction de motif NLS (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>, version R.9, seuil 0,6, Nguyen et al. 2009). DRNApred a été utilisé pour identifier les potentiels domaines de liaison à l'ADN (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/DRNApred/>, Yan and Kurgan, 2017).

## 2.2 Identification d'interactants candidats des CSEPs HSH

Le criblage de protéines candidates à une interaction avec les CSEPs HSH s'est basé sur le protéome des hôtes peuplier et mélèze sains et matures par la technologie de double hybride chez la levure.

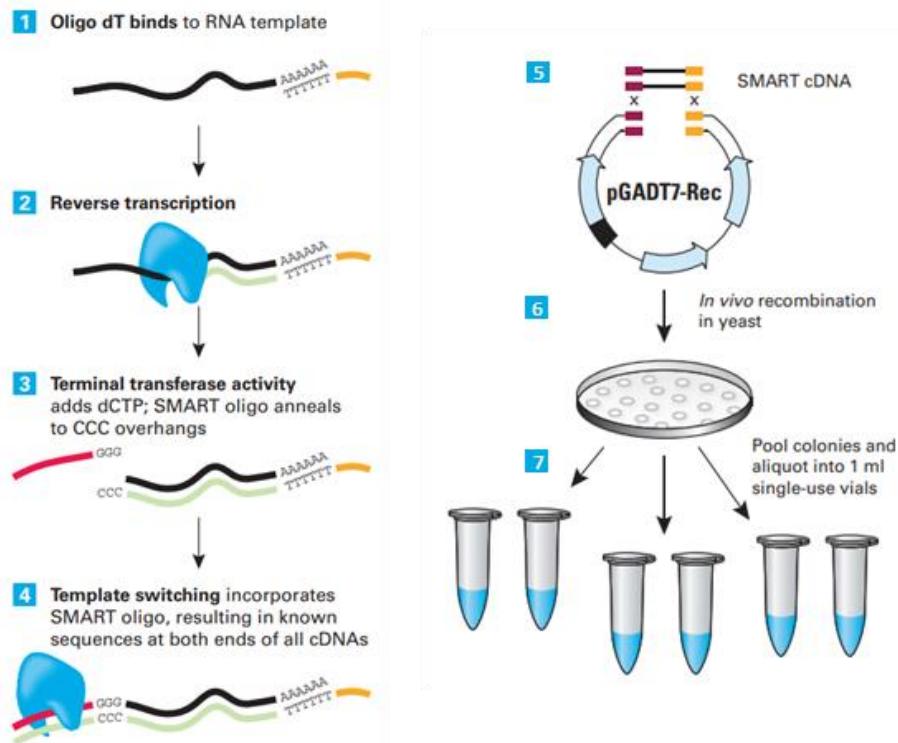
### 2.2.1 Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN des épines de mélèze et des feuilles de peuplier ont été réalisées au chlorure de lithium selon un protocole adapté de Chang et al. 1993. Succinctement, environ 100 mg de tissu sont réduits en poudre à l'aide d'azote liquide, d'un mortier et d'un pilon. Ensuite, 750 µl de tampon d'extraction (2 % CTAB, 2 % PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 2M NaCl, 0,5g/L spermidine et 2 % de β-mercaptopropanol fraîchement ajouté) est ajouté, vortexé puis incubé 10 min à 65 °C. Ensuite, 500 µl de la solution chloroforme-IAA (24 :1) est ajouté puis centrifugée 7 min à 13 000 rpm à 4 °C. La phase aqueuse est récupérée afin de répéter à nouveau l'extraction chloroforme-IAA (24 :1). Un volume équivalent à la seconde phase aqueuse récupérée est ajouté de LiCl (10 M) pour une incubation à -20 °C pour 3 h. Après une centrifugation (13 000 rpm, 4 °C, 20 min), le culot transparent est nettoyé avec 400 µl d'éthanol 80 % froid, centrifugé (13 000 rpm, 4 °C, 5 min), séché puis resuspendu dans 40 µl d'eau exempt en RNase. Les profils des extractions d'ARN ont été dosés par l'analyseur Experion (Automated Electrophoresis System, Biorad). Afin de faciliter le transport France-Québec, les échantillons ont été mélangés avec 4 µl de NaOAc 3 M pH 5,2 et

3 volumes d'éthanol 100 %. À la réception, l'ARN précipité a été lavé 3 fois avec 500 µl d'éthanol 70 %, séché puis resuspendu dans le l'eau sans RNase (<https://genohub.com/dna-rna-shipping-for-ngs/>).

## 2.2.2 Génération des banques de transcrits des hôtes : deux librairies

Les librairies de levures hybrides ont été réalisées à l'aide du kit *Make your own « Mate & Plate », Library System for Yeast Two-Hybrid Screening* (Cat. 630490, Clontech Takara Bio inc.). Comme le décrivent les étapes 1 à 4 de la figure 2.1, la synthèse des premiers brins d'ADNc a lieu grâce à la rétrotranscriptase SMART MMLV et les amorce CDSIII (amorce poly-T jaune et amorce poly-G rouge) spécialement conçues pour être homologues aux extrémités 5' et 3' du plasmide pGADT7-Rec. Ensuite, les 100 ng d'ARN totaux nécessaires pour cette réaction vont être dégradés à l'aide d'une RNase avant de procéder à l'amplification des ADNc par PCR longue distance (LD-PCR). Deux réactions PCR de 100 µl sont réalisées puis regroupées. La réaction LD-PCR est permise grâce à la combinaison de l'ADN polymérase *Titanium Taq* qui présente une processivité pouvant aller jusqu'à 18 kb et une fidélité de 25 erreurs pour 100 kb et d'une polymérase avec capacité d'édition (propriété de la compagnie). Finalement, les fragments inférieurs à 200 bp sont retirés par la filtration des ADNc amplifiés sur la colonne CHROMA SPIN. Reconcentrés à l'aide d'une précipitation sodium acétate – éthanol puis lavés avec 150 µl d'éthanol 75 % à 4 °C, 4 µg d'ADNc double brin ont été cotransformés avec 3 µg de plasmide linéarisé pGADT7-Rec dans la souche haploïde Y187 chimiocompétente (étape 5 et 6 de la figure 2.1). La recombinaison homologue réalisée par Y187 induit la fusion des ADNc avec le domaine activateur du facteur de transcription GAL4 (12kDa) en N-terminal. L'ensemble des transformations de levure ont suivi le protocole à l'acétate de lithium de *Yeastmaker Yeast Transformation System 2, Clontech inc. 2010*.



**Figure 2.1** Génération des librairies par la technologie de synthèse SMART cDNA et recombinaison *in vivo* chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les étapes 1 à 4 décrivent la rétrotranscription des ADNc par la technologie SMART qui génère des extrémités 3' et 5' homologues au plasmide pGADT7-Rec linéarisé par l'enzyme *SmaI*. L'étape 5 illustre la recombinaison *in vivo* qui a lieu lors de la cotransformation de la souche Y187 avec le plasmide pGADT7-Rec et les ADNc. Les étapes 6 et 7 constituent la sélection et le regroupement des clones constituant la librairie et ses aliquots, ce qui permet d'effectuer de nombreux criblages à partir d'une même librairie. Figures modifiées issues de *Maté & Plate™ Yeast Two-Hybrid cDNA Libraries. (January 2009) Clonetechniques XXIV(1):6-7.*

### 2.2.3 Clonage des CSEPs HSH

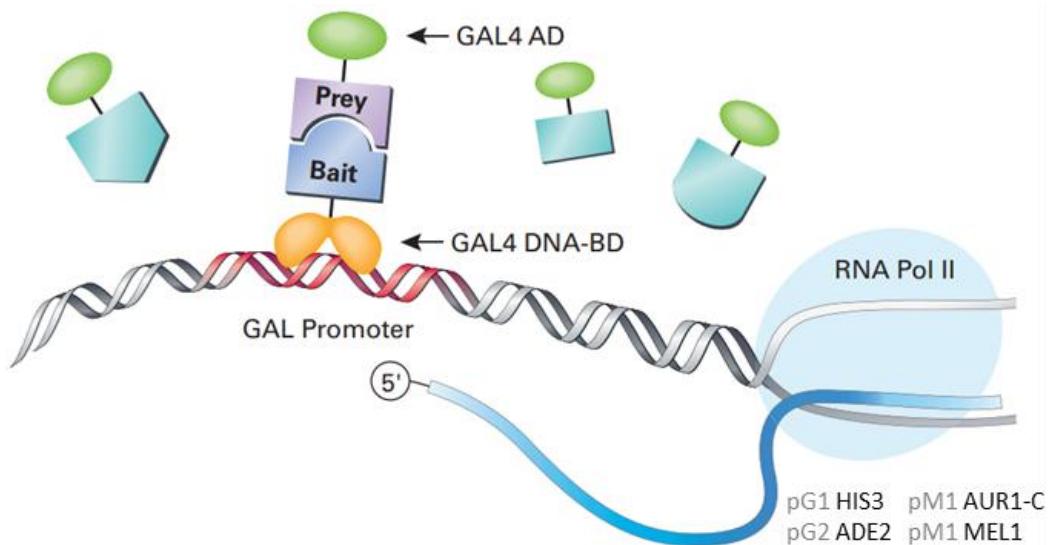
Les séquences des CSEPs HSH ont été synthétisées par *Gene Universal inc.* (Newark, DE, É-U). Les CSEPs ont été clonés, sans le peptide signal, par digestion-ligation (*EcoRI -SalI*) dans le plasmide pGBKT7. Les amores utilisées sont présentées dans l'Annexe A. Ainsi, chaque CSEP a été fusionné en N-terminal avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (GAL4-DNA-BD, 21 kDa) puis transformé dans la souche haploïde Y2HGold (MATa). Un contrôle GAL4-DNA-BD libre a été produit pour identifier les interactions non spécifiques issues des librairies.

## 2.2.4 Criblage par double hybride

Le facteur de transcription GAL4 est un régulateur chez la levure qui se lie à la région Galactose Upstream Activating Sequence (UAS<sub>G</sub>) même lorsqu'elle n'est présente que sous forme de séquences tronquées de 17 bp (17-mer). La technologie du double hybride repose sur le principe que la fonction de GAL4 est conservée lorsque les deux domaines, tronqués, sont assez proches : lorsque les protéines auxquelles les domaines sont fusionnés interagissent (Chien et al. 1991). Ainsi, comme illustré dans la figure 2.2, lors d'une interaction entre un CSEP (Bait) et un clone issu des librairies construites (Prey), les domaines AD et DNA-BD du facteur de transcription GAL4 induisent l'expression de gènes rapporteurs. Ces levures peuvent, ainsi, croître sur un milieu déficient en histidine, en adénine ainsi qu'en présence de 200 ng/ml d'Aureobasidin A et se teintent d'une couleur bleue en présence de 40 µg/ml X- $\alpha$ -Galactose grâce aux gènes rapporteurs HIS3, ADE2, AUR1-C et MEL-1 intégrés aux génomes des souches. Les cultures et sélections des levures se sont effectués sur le milieu minimum SD en variant les carences en acides aminés nécessaires aux sélections: simple pour les levures haploïdes (-Leucine ou -Tryptophane), double pour les diploïdes (-Leucine et -Tryptophane) ou quadruple pour les doubles mutants (haploïdes ou diploïdes) aux interactions positives (-Leucine, -Tryptophane, -Histidine, -Adénine).

Le criblage des interactants des CSEPs a été réalisé par reproduction sexuée entre les deux souches haploïdes Y187 (GAL4-AD :: librairie) et Y2HGold (GAL4-DNA-BD :: CESP) selon le protocole « Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System, Clontech inc, 2013 ».

Un taux de reproduction sexuée de minimum 2 % et le seuil de criblage d'un minimum de  $10^6$  diploïdes, calculés selon les recommandations de Clontech inc, ont été respectés avant de procéder à l'identification des interactants candidats.



**Figure 2.2** L’interaction Bait-Prey (CSE-protéine de l’hôte) induit l’expression de quatre gènes rapporteurs sous trois éléments promoteurs hétérologues reconnus par GAL4.

L’interaction Bait-Prey induit le rapprochement stérique des domaines d’activation (AD) et de liaison à l’ADN (DNA-BD) de GAL4, ce qui induit l’expression de gènes rapporteurs. Les éléments promoteurs G1, G2 et M1 de la région UAS<sub>G</sub> sont trois 17 mers hétérologues reconnus par GAL4-DNA-BD. Figures modifiées issues de *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System*. (Clontech 2013).

## 2.2.5 Identification des interactants candidats

Les interactants candidats ont été amplifiés par colonie-PCR, sur les colonies diploïdes poussant sur les milieux SD quadruples déficients, à l’aide des amores de criblages spécifiques au plasmide pGADT7 présentées dans l’Annexe A. Les colonies présentant une bande d’amplification unique ont été séquencées par séquençage Sanger (Nanuq, Centre d’expertise et de services Génome Québec, Montréal, Canada). Les traductions des séquences ont été menées par Expert Protein Analysis System (ExPASy, <https://web.expasy.org/translate/>, Swiss Institute of Bioinformatics). Les séquences obtenues après les résidus PLWPG, spécifique au plasmide pGADT7, ont été recueillies jusqu’au premier codon STOP. « Basic Local Alignment Search Tool » de NCBI (tBlastn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, version 2.8.0-α) a été utilisé pour annoter les interactants candidats. La séquence avec la meilleure correspondance d’homologie a été

retenue (e-value minimum et haute identité, banque de donnée NCBI complète). Plusieurs critères ont été utilisés afin d'éliminer les candidats faux positifs (S.V Rajagopala and P. Uetz, 2011). Un candidat a été considéré faux positif si : 1- il est présent parmi les criblages contrôles GAL4-AD :: Librairie Peuplier – GAL4-DNA-BD et GAL4-AD :: Librairie Mélèze – GAL4-DNA-BD, 2- il est retrouvé parmi la liste de protéines collantes issue de travaux antérieurs au laboratoire, 3- ce candidat est présent pour 3 CSEP de familles différentes. 4- ce candidat présente une localisation subcellulaire différente de celle du CSEP (Rajagopala et Uetz 2011).

## 2.2.6 Identification des interactomes spécifiques et communs

L'extraction des plasmides d'intérêts a été conduite par miniprep sur les colonies diploïdes selon un protocole consensus basé sur le protocole Haber (<http://www.bio.brandeis.edu/haberlab/jehsite/pdfs/GlasBead.pdf>) et de Singh and Weil, 2001. Les plasmides sont transformés dans la souche électrocompétente *E. coli* TOP10 et les plasmides pGADT7 sont sélectionnés sur Luria-Bertani (LB) avec ampicilline (50 µg/ml).

Les interactants candidats issus du premier criblage (ex : banque peuplier VS CSEP spécifique au peuplier) ont été une seconde fois criblés contre le CSEP homologue de la famille (ex : candidats issus de la banque peuplier VS CSEP spécifique au mélèze). La souche haploïde Y2H Gold a été cotransformée suivant le protocole à l'acétate de lithium de *Yeastmaker Yeast Transformation System 2, Clontech inc. 2010*. Les homologies potentielles des interactants candidats entre les CSEPs homologues ont été testées sur SD-Leu-Trp-His-Ade AbaA.

## 2.3 *N. benthamiana* et conditions de croissance

La lignée sauvage de *N. benthamiana* a été utilisée pour les observations de localisations et comme contrôle d'expression lors des inductions de stromules (Sparkes et al. 2006). L'induction de stromules dans la cascade EDS1-NRG1 a nécessité l'utilisation des lignées

homozygotes délétères *eds1-1* (Ordon et al. 2017), *nrg1-4* et *nrg1-5* (Ordon et al. 2021) exprimant le marqueur chloroplastique FNR ::eGFP qui porte le peptide transit de l'enzyme FERREDOXIN NADP(H) OXIDOREDUCTASE (FNR) impliqué dans la photosynthèse (Schattat et al. 2011). La lignée sauvage de *N. benthamiana* FNR::eGFP#7-25 a été utilisée comme contrôle d'induction (Schattat et al. 2011b). L'ensemble de ces plantes a été exposé à des conditions en jours long (16 h jour, 8 h nuit) en chambre de croissance (BioChambers) à 22 °C avec une humidité relative de 60 %.

## 2.4 Expression transitoire

### 2.4.1 Clonage en phase avec la eGFP

Les CSEPs HSH ont été fusionnées en N-terminal de la eGFP par la méthode de clonage Gateway (Karimi and Depicker, 2002). Les amorces utilisées sont présentées dans l'Annexe A. Brièvement, les séquences sans peptide signal des CSEPs ont été amplifiées par PCR puis chacune intégrée au vecteur d'entrée pDONR221 par la première réaction de recombinaison réalisée par la BP clonase (1:1 produit PCR :pDONR221, 16 h TP). Finalement, une seconde réaction par la LR clonase a fusionné les CSEPs avec la GFP en l'intégrant dans le plasmide de destination pK7FWG2 (1:1 pDONR221-CSEP :pK7FWG2, 16h TP). L'ensemble des clonages a été exécuté dans les souches *E. coli* DH10B ou DH5 $\alpha$  dans un milieu Yeast Extract Peptone (YEP) enrichi avec 50 mg/ml de spectinomycine puis vérifiés par séquençage Sanger (Nanuq, Centre d'expertise et de services Génome Québec, Montréal, Canada).

### 2.4.2 Agroinfiltration

Les localisations sub-cellulaires ainsi que les inductions de stromules ont été effectuées en expression transitoire par agroinfiltration avec la souche *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-pMP90 (Koncz and Schell, 1986). Brièvement, après une incubation O/N à 28 °C dans le milieu YEP et avec les antibiotiques de sélections appropriés (spectinomycine 50 mg/ml, ou kanamycine 50mg/ml et rifampicine 100 mg/ml,

gentamicine 25 mg/ml), les cultures de 5 ml des souches *A. tumefaciens* ont été centrifugées à 5 000 rpm pendant 5 minutes à température pièce. Les culots récupérés sont resuspendus dans une solution de MgCl<sub>2</sub> 10 mM et 150 µM d'acétosyringone puis ajusté à 0,5 OD<sub>600</sub>. Les souches bactériennes exprimant les CSEPs et les marqueurs cellulaires ont été mélangés respectant un ratio 1 :1 (Ivanov et Harrison 2014). Après 1 h d'incubation à TP, l'agro-suspension est manuellement infiltrée dans l'épiderme abaxiale des jeunes feuilles complètement dépliées de *N. benthamiana* de type sauvage âgées de 6 semaines. Les comptages des inductions de stromules ont suivi les mêmes protocoles d'agroinfiltration avec un ajustement à 0,2 OD<sub>600</sub>.

## 2.5 Microscopie confocale

Dépendamment des maximums d'expression, les observations au microscope confocal se sont échelonnées de 24 hpi, à 72 hpi. Pour améliorer la qualité de l'observation, le poinçon de feuille, montées sur lamelles en verre, a été saturé en eau non distillée par application d'un vide avant chaque observation. Les observations de localisation, de colocalisation et les inductions de stromules sur les mutants *nrg1* ont été collectées à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) sur les objectifs à immersion dans l'huile HC PL APO CS2 40X ou 63X. Les fluorescences vertes (eGFP), rouges (RFP ou mCherry) et rouges lointain (chlorophylle) ont été respectivement recueillies selon les fenêtres d'excitation/émission suivantes : 488/500-525 nm (eGFP), 552/600-625 nm (RFP ou mCherry) et 650-700 nm (chlorophylle). Les lasers 488 nm et 552 nm ont été réglés à 4 % de leurs puissances. Les images ont été traitées par le logiciel LAS AF Lite software (Leica Microsystems).

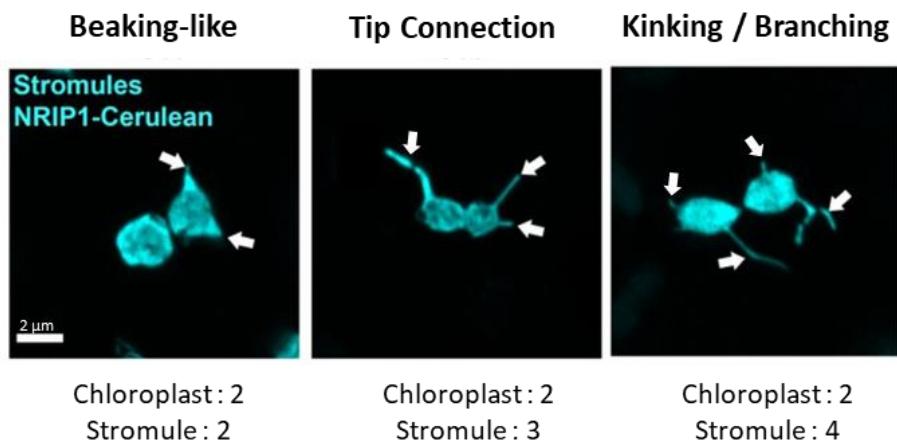
## 2.6 Microscopie à épi-fluorescence

Les observations des inductions de stromules sur les plants sauvages et *esd1* ont été effectuées sur un microscope AxioObserver Z1 de Zeiss (Jena, Allemagne) équipé d'une caméra MRm monochrome, de la source lumineuse X-Cite fluorescence et de l'objectif 40X 0,75 NA EC PLAN NEOFLUAR. Les fluorescences eGFP et mOrange ont été

respectivement recueillies par les cubes 38 et 43 HE filter (Carl Zeiss AG. Jena, Allemagne). Le logiciel ZenBlue a été utilisé pour l'acquisition des images.

## 2.7 Étude de l'induction de stromules

Les comptages des inductions de stromules ont été basés sur une observation à 72 hpi. Chaque réplica biologique comporte trois observations indépendante (réplicas techniques). Les constructions XopQ::mOrange et mOrange (Erickson et al. 2018) ont été utilisés à titre de contrôles d'induction positifs et négatifs. Tout d'abord, chaque observation en volume (Z-stack) prise sur une épaisseur entre 15 à 25  $\mu\text{m}$  de l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* ont été exportées en une image unique. Les quantifications des stromules ont été traitées d'une façon semi-automatique par l'extension MTBCellCounter (Franke et al. 2015) portée par le logiciel ImageJ. La quantification de stromules suit la méthode de comptage de Caplan et al. 2015. Comme illustré par la figure 2.3, le nombre de stromules et de déformation de la membrane chloroplastique en bec (*beaking-like*) sont compris dans les comptages. Les stromules se divisant en branche ne comptent que pour 1.



**Figure 2.3 Identification des différentes formes de stromule et exemples de comptage**

Observation de chloroplastes et leurs stromules signalés par les flèches dans le transgénique stable *N. benthamiana* NRIP1-Cerulean. Figures modifiées issues de Caplan et al. 2018.

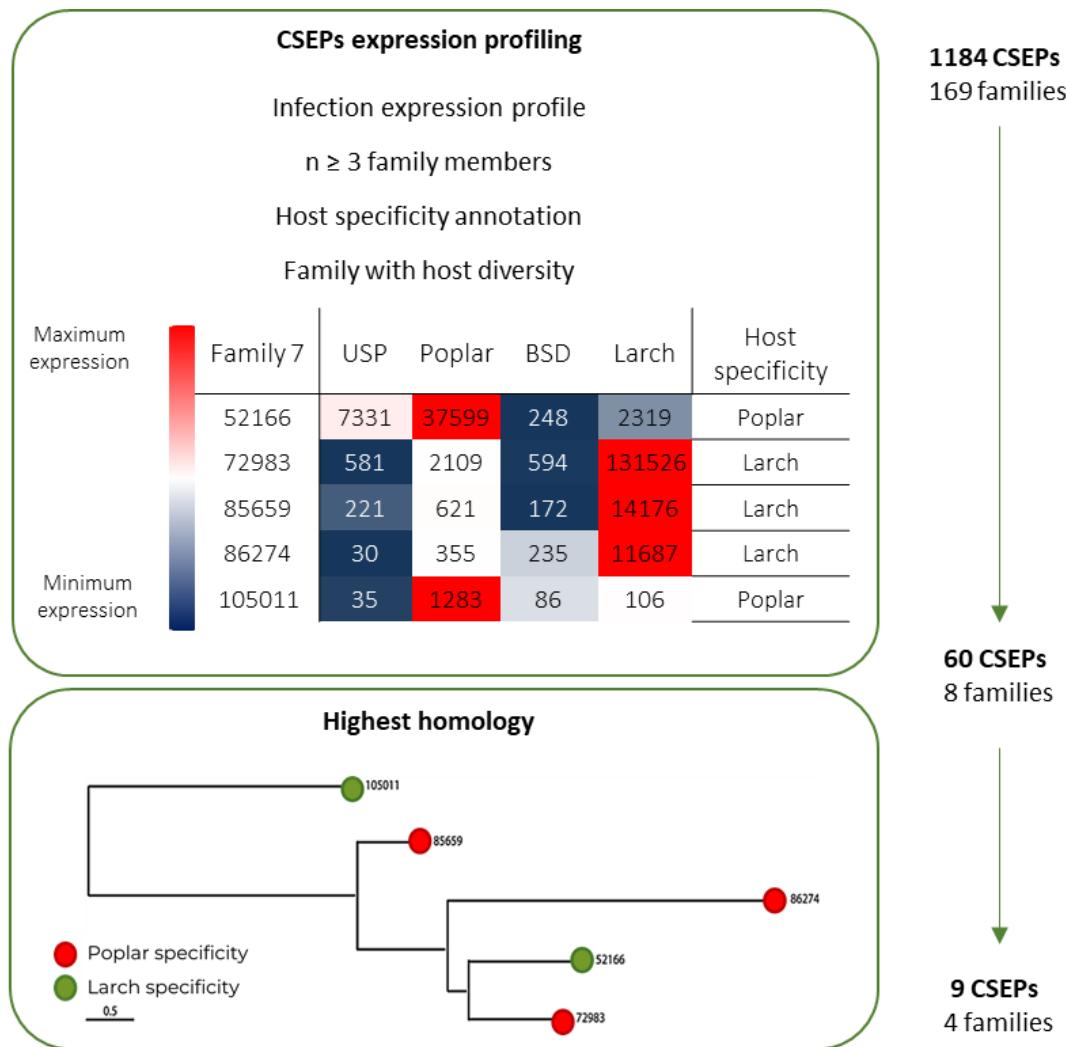
## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 L'étude des transcriptomes de *Mlp* révèle des CSEPs homologues aux profils d'expressions opposés

Le processus de sélection, illustré par la figure 3.1 a débuté par une analyse comparative des transcriptomes de *Mlp*. Tout d'abord, les CSEPs n'ayant pas un profil d'expression spécifique à l'infection ( $[Poplar/USP] > 1$  et  $[Larch/BSD] > 1$ ) et ne faisant pas partie d'une famille d'au moins trois membres ont été rejetés (candidats restants : 680 CSEPs de 97 familles). Ensuite, les CSEPs présentant du bruit de fonds dans les transcrits USP et Poplar ont aussi été rejetés (candidats restants: 504 CSEPs de 81 familles). Par la suite, la comparaison des ratios  $[Poplar/USP]$  et  $[Larch/BSD]$  a conduit à l'annotation de spécificité d'hôte (ratio le plus grand). Afin de limiter l'importance des bruits de fonds, cette comparaison des ratios a été appliquée seulement si le ratio  $[Poplar/Larch]$  ou  $[Larch/poplar]$  était inférieur à 10. Ainsi, dans le cas de *Mlp52166*, rapporté dans le tableau de la figure 3.1. le ratio spécifique au peuplier est inférieur au ratio spécifique au mélèze ( $[37\ 599/7\ 331] < [2\ 319/248]$ ). Cependant, l'expression de *Mlp52166* dans les haustoria de peuplier est 16,2 fois plus important que dans les pycnies/aecidies (37 599/2 319). C'est pourquoi *Mlp52166* a été annoté comme exprimé spécifiquement lors de l'infection d'un peuplier. Ainsi, le processus d'annotation a révélé huit familles qui regroupaient des CSEPs aux spécificités d'hôte mixte. Afin d'obtenir les candidats avec les plus hautes homologies, une analyse phylogénétique des protéines matures (sans peptide signal) de chacune de ces familles a été menée. Finalement, quatre familles ont présenté des paires de CSEPs avec des spécificités d'hôte opposées sur les nœuds terminaux des arbres phylogénétiques. L'exemple de l'alignement de la famille 7 est présenté dans la figure 3.1.

L'ensemble des paires de CSEPs sélectionnées partagent un pourcentage de similarité supérieur à 55 % avec l'homologue de sa paire; l'un prépondérant lors de l'infection d'un peuplier et l'autre pour un mélèze. La famille 7 mise en exemple dans la figure 3.1 représente une exception avec la sélection d'un trio. Cette analyse comparative à, ainsi, mené à l'identification de trois paires de la famille 1, 33 et 51 ainsi qu'un trio de la famille 7 présentant des CSEPs homologues aux profils d'expressions spécifiques à l'hôte (HSH).



**Figure 3.1** Processus de sélection des CSEPs au profil HSH.

Les encadrés verts regroupent les critères de sélection appliqués. Les données de la famille 7 sont utilisées à titre d'exemple pour les critères de la diversité de spécificité des familles ('Famille mixte') ainsi que la sélection sur les nœuds terminaux pour une meilleure homologie entre les paires de CSEPs sélectionnées. L'arbre phylogénétique issu de l'alignement des séquences a été effectué à l'aide de MUSCLE (version 3.8).

**Tableau 3.1**

Neuf CSEPs issues de quatre familles présentent le profil HSH

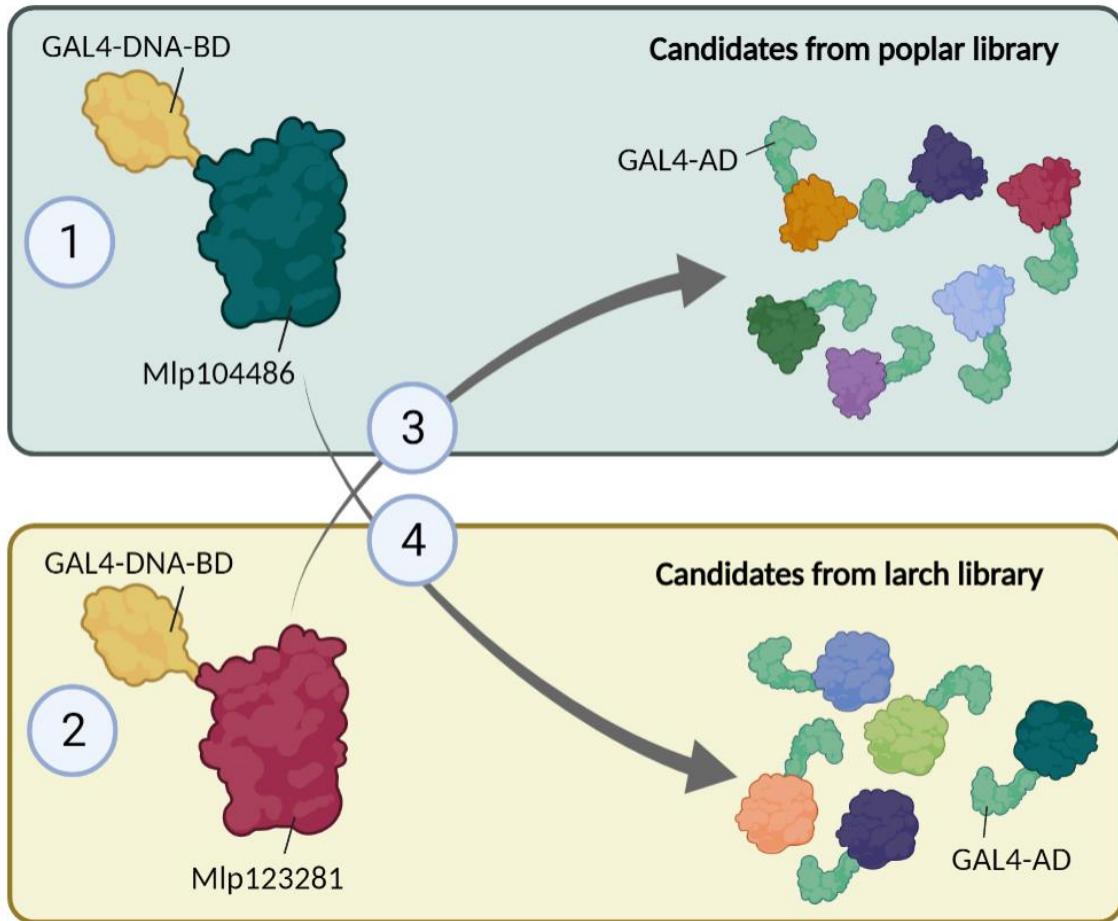
Family <sup>a</sup>	Protein ID <sup>b</sup>	CPG /Class <sup>a</sup>	Similarity (%) <sup>c</sup>	Host specificity <sup>d</sup>	Length <sup>e</sup>	Cystein (%) <sup>f</sup>
<b>1</b> (111)	<b>Mlp104486</b>	Class 1	86,5	Poplar	105 (24)	9,5
	<b>Mlp123281</b>	Class 1		Larch	105 (25)	9,5
<b>33</b> (6)	<b>Mlp51690</b>	CPG462	85,4	Poplar	146 (26)	6,8
	<b>Mlp53845</b>	CPG462		Larch	147 (26)	6,8
<b>51</b> (4)	<b>Mlp107359</b>	CPG1075	86,2	Poplar	117 (20)	0
	<b>Mlp108708</b>	CPG1075		Larch	144 (20)	0
	<b>Mlp52166<sup>a</sup></b>	CPG332-333	<sup>ab</sup> 76,9	Poplar	196 (24)	4,6
<b>7</b> (12)	<b>Mlp72983<sup>b</sup></b>	CPG332-333	<sup>bc</sup> 55,9	Larch	195 (26)	4,1
	<b>Mlp86274<sup>c</sup></b>	CPG332-333	<sup>ac</sup> 58,7	Larch	223 (22)	4

Présentations des caractéristiques des neuf CSEPs sélectionnées ayant le profil HSH. **a.** Numéro de la famille précédemment décrits par (Duplessis et al. 2011) et (Hacquard et al. 2012). Le nombre total de CSEPs membres de la famille est précisé entre parenthèses. CPG : *Cluster of paralogous genes*. **b.** Dénomination issue de la version 2.0 du génome annoté de *Melampsora larici-populina* 98AG31 hébergé par Joint Genome Institute. **c.** Taux de similarité des séquences calculés par EMBOSS matcher explorer (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/matcher>). **d.** Spécificité d'hôte déterminée dans la présente étude. **e.** Longueur en acides aminés de la protéine mature (retranchement de la portion du peptide signal déterminée à l'aide de SignalP, version 4.1). La longueur du peptide signal est précisée entre parenthèses. **f.** Taux de cystéine exprimé par rapport à la longueur de la protéine mature.

Le tableau 3.1 présente les neuf CSEPs HSH identifiées et leurs taux de similarité partagés. Les taux de similarité varient entre 55,9 et 76,9 % pour le trio de la famille 7 et jusqu'à 86,5 % pour la paire de la famille 1. Calculé sur l'ensemble de la longueur des protéines matures, soit plus de 100 acides aminés, l'ensemble de ces taux de similarité correspondent aux critères nécessaires pour introduire la notion d'homologie entre les CSEPs issues d'un même organisme (Rost, 1999). Ces similarités de séquence se traduisent aussi par des longueurs de peptides signal et des taux en cystéine proches.

### 3.2 Interactomes solubles des CSEPs HSH des familles 1 et 7

La construction des libraires a débuté avec la combinaison de six réplicas d'ARN de feuilles de peuplier et d'aiguilles de mélèze sains. Les qualités des extractions ont été vérifiées par Experion (Automated Electrophoresis System, Biorad) et présentaient des *RNA Quality Indicator* (RQI) supérieurs à 8,5/10. Respectivement, les librairies de mélèze et de peuplier ont présenté un nombre moyen de clones indépendants de  $6,71 \times 10^6$  et  $1,36 \times 10^6$  UFC/ml et les aliquots de librairies finales ont été ajustés à  $1,66 \times 10^7$  et  $2,23 \times 10^7$  UFC/ml. Les colonies des levures Y2H Gold exprimant les constructions GAL4-DNA-BD::CSEP présentaient des tailles semblables au contrôle vide GAL4-DNA-BD, indiquant que les CSEPs n'induisaient pas de toxicité chez la levure haploïde. Les CSEPs GAL4-DNA-BD::Mlp104486, GAL4-DNA-BD::Mlp51690, GAL4-DNA-BD::Mlp107359 et GAL4-DNA-BD ::Mlp52166 ont chacun été criblés contre la librairie du protéome de peuplier. Les CSEPs GAL4-DNA-BD::Mlp123281, GAL4-DNA-BD ::Mlp53845, GAL4-DNA-BD ::Mlp108708, GAL4-DNA-BD ::Mlp72983 et GAL4-DNA-BD ::Mlp86274 ont chacun été criblés contre la librairie de mélèze. Les encadrés des points 1 et 2 de la figure 3.2 présentent l'exemple des criblages respectifs de GAL4-DNA-BD::Mlp104486 et GAL4-DNA-BD::Mlp123281 contre les librairies de peuplier et de mélèze. L'ensemble des criblages menés par reproduction sexuée ont présenté des pourcentages d'efficacité de reproduction supérieurs à 2 % et un nombre de diploïdes criblés supérieur à  $10^6$ . Malgré les quatre répétitions des criblages de Mlp51690, Mlp107359 et Mlp108708 aucun clone diploïde n'a été obtenu. Les critères listés par la partie 2.2.5 ont permis d'écartier des candidats aux profils de faux positif. Comme rapportés dans l'Annexe B, les constructions GAL4-DNA-BD::Mlp104486 et GAL4-DNA-BD::Mlp52166 ont, respectivement, liés 29 et 56 protéines candidates issues du protéome du peuplier. Les constructions GAL4-DNA-BD::Mlp123281, GAL4-DNA-BD::Mlp53845, GAL4-DNA-BD::Mlp72983 et GAL4-DNA-BD::Mlp86274 ont respectivement interagir avec 12, 14, 3 et 23 protéines candidates issues du protéome sain du mélèze.

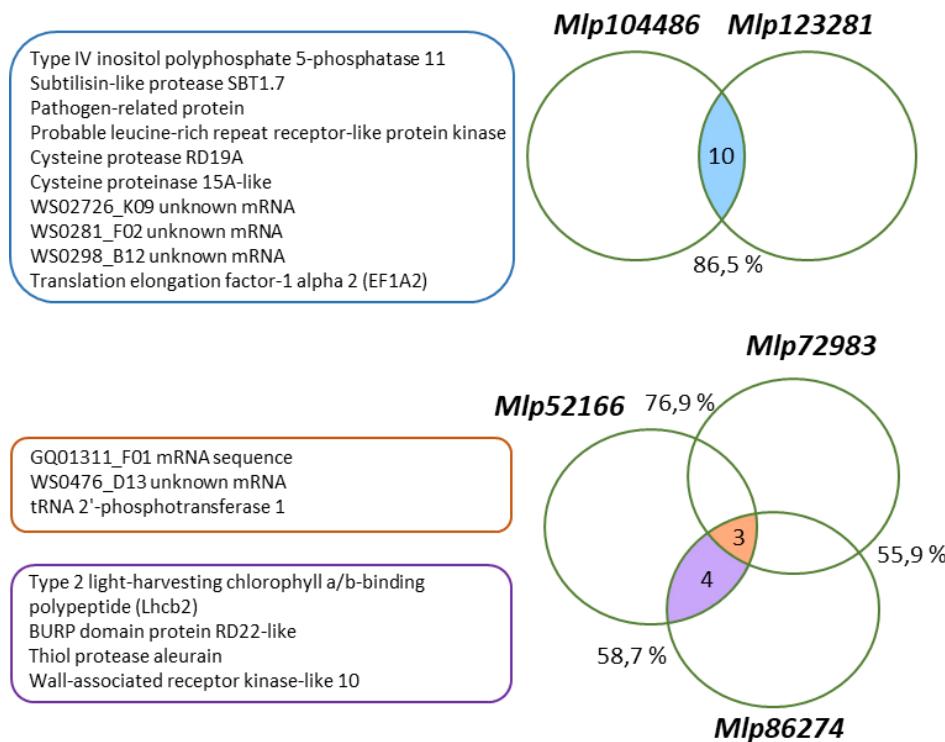


**Figure 3.2** Étapes des criblages des interactants candidats : exemple de la famille 1.

1. Criblage par reproduction sexuée (Y2H Gold x Y187) de la CSEP GAL4-DNA-BD::Mlp104486 contre la librairie de peuplier ‘Beaupré’.
2. Criblage par reproduction sexuée (Y2H Gold x Y187) de la CSEP GAL4-DNA-BD::Mlp123281 contre la librairie de mélèze.
3. Étude d’interaction par cotransformation de Y2H Gold entre GAL4-DNA-BD::Mlp123281 et les protéines candidates venant de la librairie de peuplier et ayant interagi avec GAL4-DNA-BD ::Mlp104486.
4. Étude d’interaction par cotransformation de Y2H Gold entre GAL4-DNA-BD::Mlp104486 et les protéines candidates venant de la librairie de Mélèze et ayant interagi avec GAL4-DNA-BD::Mlp123281.

Comme illustré par les étapes 3 et 4 de la figure 3.2, l’ensemble des interactants candidats criblés ont été extraits puis cotransformés avec sa CSEP homologue. Ainsi, les cibles ayant interagi avec GAL4-DNA-BD::Mlp104486, CSEP de la famille 1 spécifique au peuplier, ont été testées en présence de GAL4-DNA-BD::Mlp123281, homologue de la famille 1 spécifique au mélèze. Les protéines candidates ayant interagi avec les

deux membres d'une famille sont présentées dans la figure 3.3. Ainsi, dix protéines candidates dont quatre enzymes, deux protéines reliées à l'immunité, le facteur de transcription EF1A2 et trois séquences non caractérisées ont démontré une interaction avec la paire homologue de la famille 1. Les homologues de la famille 7, quant à eux, partagent des interactions communes avec deux séquences non caractérisées et la ARNt phosphotransférase 1. Aussi, les CSEPs GAL4-DNA-BD::Mlp52166 et GAL4-DNA-BD::Mlp86274 (famille 7) partagent quatre autres interactions : TYPE 2 LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL A/B-BINDING POLYPEPTIDE (Lhcb2), BURP DOMAIN PROTEIN RD22-LIKE, THIOL PROTEASE ALEURAIN et WALL-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE-LIKE 10.



**Figure 3.3 Les CSEPs des familles 1 et 7 interagissent avec des protéines communes.**

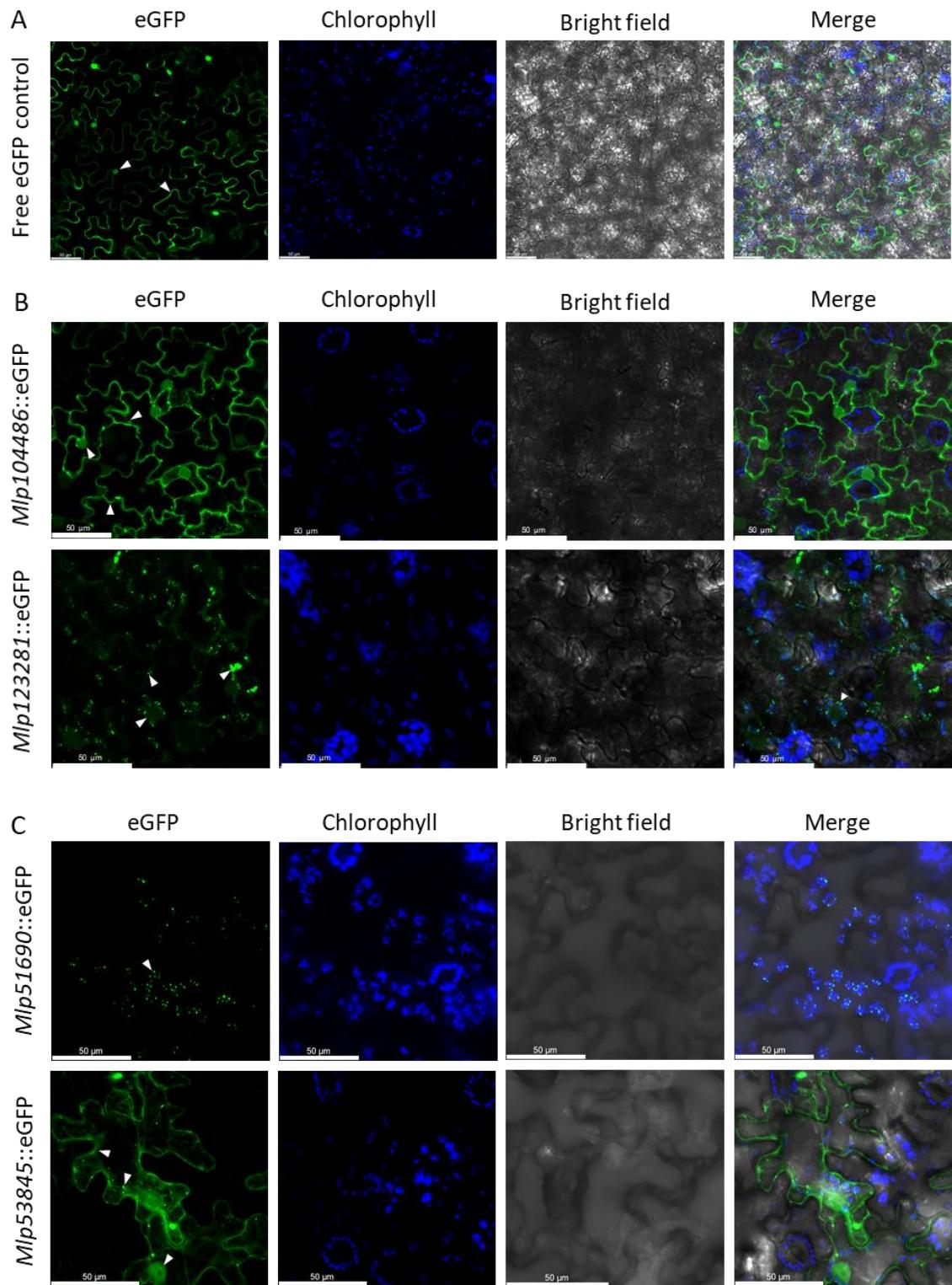
Les protéines listées dans l'encadré bleu correspondent aux protéines partielles qui interagissent avec Mlp104486 et Mlp123281. Le taux d'homologie entre les deux CSEPs est précisé en dessous du diagramme de Venn. Les noms des protéines listées dans l'encadré orange correspondent aux protéines partielles qui interagissent avec Mlp72983, Mlp52166 et

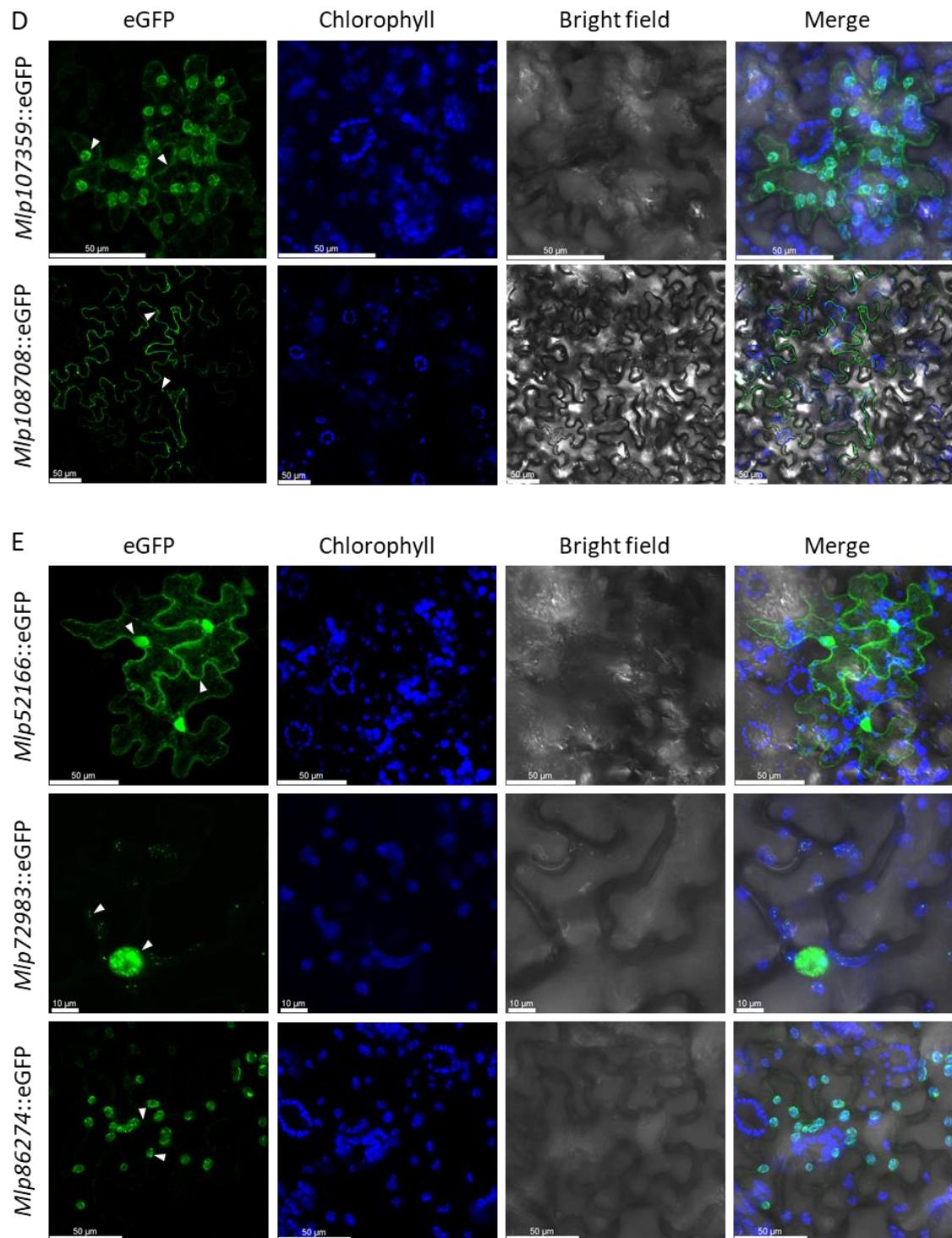
Mlp86274. Les noms des protéines listées dans l'encadré violet correspondent aux protéines partielles qui interagissent avec Mlp52166 et Mlp86274. Les taux d'homologie de séquence entre les trois CSEPs sont précisés entre chaque cercle du diagramme de Venn.

### 3.3 Les CSEPs HSH localisent dans divers compartiments cellulaires

Afin d'avoir un portait approfondi des localisations des CSEPs HSH, les observations microscopiques des figures 3.4 et 3.5 seront analysées en parallèle. Tout d'abord, le panneau A de la figure 3.4 présente la localisation native de la eGFP libre dans l'épiderme abaxial de feuilles de *N. benthamiana*. Une tête de flèche indique un noyau (nucléole négatif) et une autre le signal homogène caractéristique du cytoplasme. L'induction d'une légère plasmolyse, due à l'observation microscopique prolongée, a confirmé chacune des localisations rapportées au cytoplasme (résultats non montrés). Le panneau B de la figure 3.4 présente les localisations subcellulaires des CSEPs HSH de la famille 1. Pour la première ligne, l'expression transitoire de Mlp104486::eGFP ( $n = 14$ ) illustre une localisation nucléaire (nucléole négatif), cytosolique mais aussi dans des corps cytoplasmiques. Comme présenté dans la partie A de l'annexe D, ces corps cytosoliques ne colocalisent pas avec les protéines PAB2::RFP et COX4::mCherry qui marquent respectivement les granules de stress et les mitochondries. Par contre, le panneau A de la figure 3.5 rapporte la co-agroinfiltration de Mlp104486::eGFP avec la protéine RFP::SGS3, caractéristique des vésicules à ARN interférents courts (siRNA bodies). Le graphique d'intensité de fluorescence entre la eGFP et RFP rapporte une similarité des pics de fluorescence, illustrant une colocalisation/proximité entre ces derniers. La seconde ligne du panneau B de la figure 3.4 montre la localisation de Mlp123281::eGFP ( $n = 12$ ) dans des corps cytosoliques, et les chloroplastes. Une localisation plus faible, mais constante est aussi à noter dans le noyau (nucléole négatif) comme indiqué par les têtes de flèches blanches. Le panneau B de la figure 3.5 présente une colocalisation entre Mlp123281::eGFP et SWIB6::RFP, marqueurs des nucléoides chloroplastiques. Le graphique d'intensité des fluorescence rapporte l'intensité des fluorescences de la eGFP, de la RFP et de la chlorophylle. Les deux larges pics bleus de l'autofluorescence chlorophyllienne renseignent sur l'espace intrachloroplastique. Ainsi, les quatres pics

majeurs de eGFP et RFP qui se retrouvent en dessous sont chloroplastique. De plus, les maximums des pics de *Mlp123281::eGFP* sont identiques à *SWIB6::RFP*. *Mlp123281::eGFP* se retrouve donc dans le stroma chloroplastique ainsi que dans les nucléoïdes. La première ligne du panneau C de la figure 3.4 illustre la localisation unique au chloroplaste de *Mlp51690::eGFP*, CSEPs HSH de la famille 33 (n = 9). Le panneau C de la figure 3.5 précise que *Mlp51690::eGFP* colocalise avec le marqueur de nucléoïdes chloroplastiques *SWIB6 ::RFP*, mais aussi dans le stroma chloroplastique (possibilité d'observer des stromules). La seconde ligne du panneau C de la figure 3.4 montre que *Mlp53845::eGFP*, cible le noyau (nucléole négatif), le cytoplasme et des corps cytosoliques (n = 8). Le panneau D de la figure 3.4 rapporte les localisations des CSEPs HSH de la famille 51. À la première ligne, *Mlp107359::eGFP* cible les chloroplastes (n = 9). Aussi, il est possible de distinguer un signal hétérogène dans le cytoplasme indiqué par une tête de flèche. Comme présenté dans le panneau B de l'annexe D, il est difficile de conclure à une colocalisation franche avec le marqueur mCherry-HDEL caractéristique du réticulum endoplasmique. La seconde ligne du panneau D de la figure 3.4 illustre la localisation de *Mlp108708::eGFP* avec la présence de vésicules cytoplasmiques et une distribution hétérogène du signal dans le cytoplasme (n = 22). Le panneau D de la figure 3.5 précise que *Mlp108708::eGFP* colocalise significativement avec les marqueurs mCherry::HDEL (réticulum endoplasmique), mCherry::SYP41 (réseau trans-Golgi et endosomes précoce), mCherry::RAB5 (endosomes tardifs et les corps multivésiculaires), mCherry::RAB7 (endosomes tardifs transitoires et tonoplaste) et PIP2a::mCherry (membrane plasmique). L'ensemble de ces colocalisations montre des graphiques d'intensité de fluorescence avec des pics de mCherry (canal rouge) superposés aux pics de eGFP (canal vert). De plus, la mobilité observée de ces vésicules correspond aux dynamismes de ces vésicules rapportés dans la littérature (Madina et al. 2019).





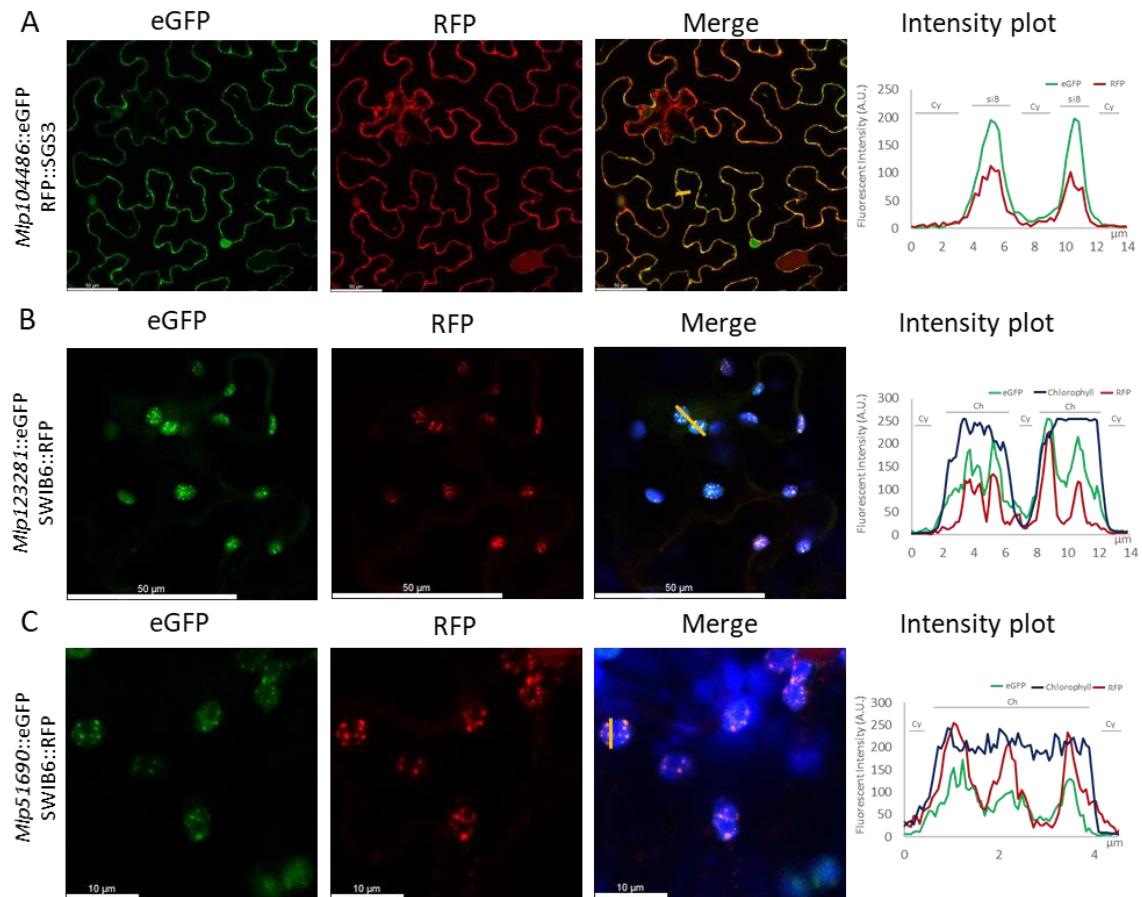
**Figure 3.4 Les CSEPs HSH ciblent diverses localisations subcellulaires.**

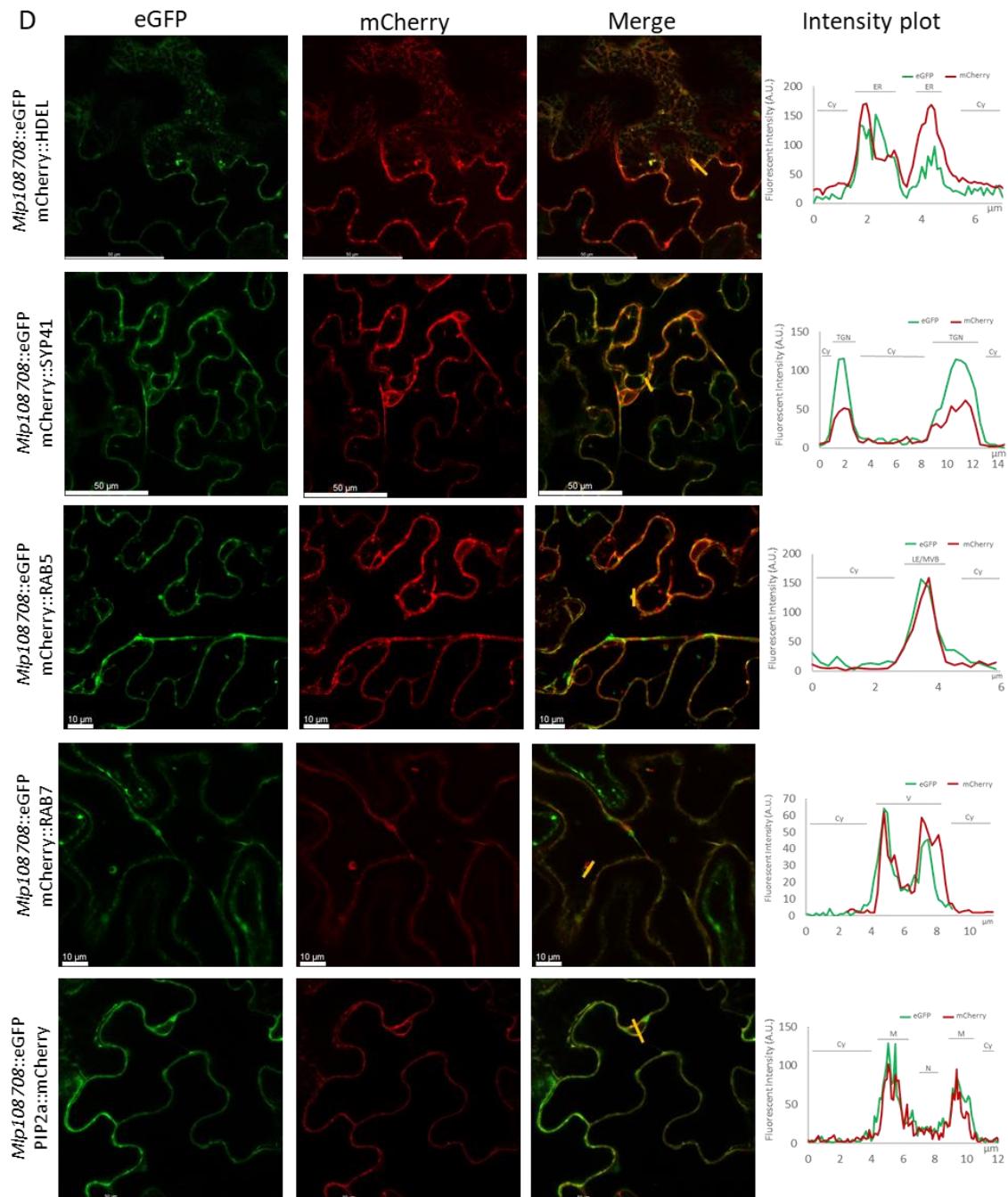
Les panneaux A. à E. sont des observations de fluorescences lors de l'expression transitoire de chacune des constructions suivantes dans l'épiderme abaxial de *N. benthamiana* prise entre 24 hpi et 72 hpi dépendamment du maximum d'expression. Le canal vert représente la fluorescence de la eGFP fusionnée aux protéines d'intérêts en C-terminal.

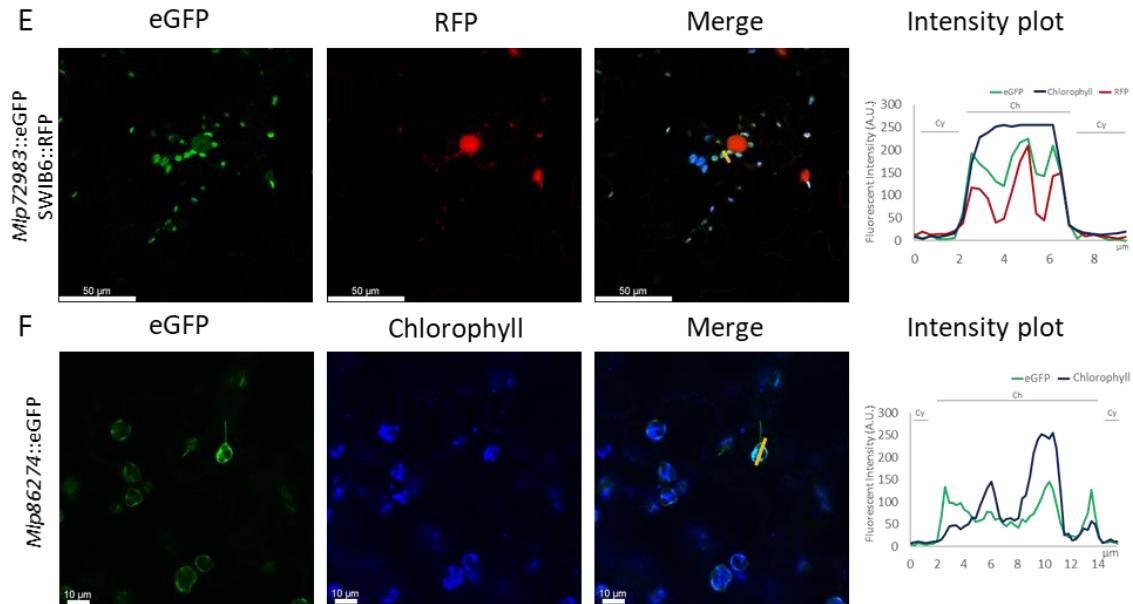
Le canal bleu représente l'autofluorescence de la chlorophylle contenue dans les chloroplastes. Chacune des localisations est indiquée par une tête de flèche. **A.** Plan focal de la protéine fluorescente eGFP libre localisant au noyau et dans le cytoplasme. **B.** CSEPs de la famille 1 : Plan focal de *Mlp104486::eGFP* qui localise dans le noyau, le cytoplasme et des corps cytosoliques. Plan focal de *Mlp123281::eGFP* qui localise dans les chloroplastes, le cytosol et le noyau. **C.** CSEPs de la famille 33 : Plan focal de *Mlp51690::eGFP* qui localise dans les chloroplastes. Accumulation de plans focaux (Z-stack) de *Mlp53845::eGFP* qui localise dans le noyau, le cytosol et des corps cytosoliques. **D.** CSEPs de la famille 51 : Accumulation de plans focaux (Z-stack) de *Mlp107359::eGFP* qui localise dans les chloroplastes et une/des organelle(s) cytosolique(s). Plan focal de *Mlp108708::eGFP* qui localise dans les chloroplastes et une/des organelle(s) cytosolique(s). **E.** CSEPs de la famille 7 : Accumulation de plans focaux (Z-stack) de *Mlp52166::eGFP* qui localise dans le noyau et le cytoplasme. Plan focal de *Mlp72983::eGFP* qui localise dans les chloroplastes et le noyau. Plan focal de *Mlp86274::eGFP* qui localise dans les chloroplastes. Un chloroplaste et un stromule sont indiqués par les têtes de flèches.

Le panneau E de la figure 3.4 rassemble les localisations subcellulaires de l'expression transitoire des CSEPs HSH de la famille 7. *Mlp52166::eGFP* rapporte une localisation nucléaire avec un nucléole négatif et un signal homogène dans le cytoplasme qui permet de distinguer aisément l'emplacement des chloroplastes ( $n = 5$ ). Ces observations sont similaires à celles du contrôle de la eGFP libre au panneau A de la même figure. La seconde ligne du panneau E de la figure 3.4 illustre la localisation de *Mlp72983::eGFP* au chloroplaste et dans le noyau avec un nucléole négatif ( $n = 16$ ). Le panneau E de la figure 3.5 ainsi que la courbe d'intensité des signaux précisent que *Mlp72983::eGFP* colocalise avec le marqueur de nucléoides chloroplastiques SWIB6::RFP. Au cours des observations de *Mlp72983::eGFP*, les localisations nucléaires s'accompagnaient plusieurs fois ( $n = 5$ ) de corps nucléaires comme l'illustre la figure 3.4. La dernière ligne du panneau E de la figure 3.4 montre la localisation subcellulaire de *Mlp86274::eGFP* au chloroplaste ( $n = 11$ ). Un stromule est indiqué par l'une des deux têtes de flèches. Le panneau F de la figure 3.5 et le graphique des intensités de fluorescence illustrent une modification structurelle du chloroplaste. En effet, en addition d'observer une récurrence de stromules supérieure à la normale, la distribution de la chlorophylle dans le corps chloroplastique est anormalement hétérogène. Les courbes de l'intensité de fluorescence

montrent que *Mlp86274::eGFP* colocalise partiellement avec la chlorophylle et se concentre sur le contour du corps chloroplastique ainsi que dans le stromule.







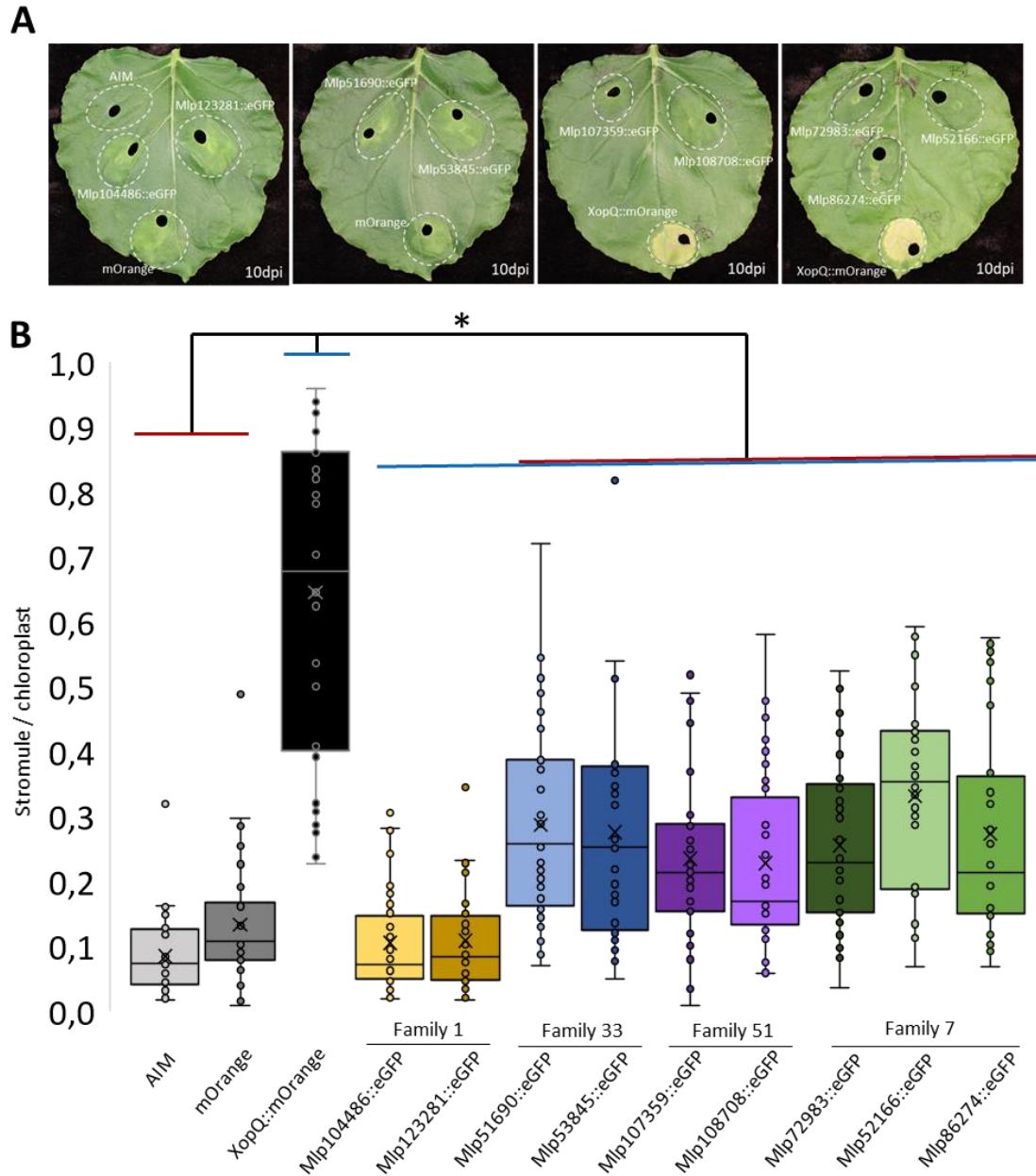
**Figure 3.5 Les CSEPs HSH colocalisent avec différents marqueurs subcellulaires.** Les panneaux A. à F. sont des observations de fluorescences lors de l'expression transitoire de chacune des constructions suivantes dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* prise entre 24 hpi et 72 hpi dépendamment du maximum d'expression. Le canal vert représente la fluorescence de la eGFP fusionnée aux CSEPs HSH en C-terminal. Le canal rouge est la fluorescence de la protéine utilisée à titre de marqueur cellulaire. L'autofluorescence de la chlorophylle, canal bleu, est rajoutée lorsque nécessaire dans la superposition des canaux. Chacun des diagrammes d'intensité de fluorescence correspond à la barre orange ajoutée dans la superposition des canaux. A. Plan focal de *Mlp104486::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur RFP::SGS3 caractéristique des *siRNA bodies*. B. Plan focal de *Mlp123281::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur SWIB6::RFP, caractéristique des nucléoïdes chloroplastiques. C. Plan focal de *Mlp51690::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur SWIB6::RFP, caractéristique des nucléoïdes chloroplastiques. D. 1<sup>re</sup> ligne, Plan focal de *Mlp108708::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur mCherry::HDEL, caractéristique du réticulum endoplasmique. 2<sup>e</sup> ligne, Plan focal de *Mlp108708::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur mCherry::SYP41, caractéristique du réseau trans-golgi. 3<sup>e</sup> ligne, Plan focal de *Mlp108708::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur mCherry::RAB5, caractéristique de l'endosome tardif et des corps multivésiculaires. 4<sup>e</sup> ligne, Plan focal de *Mlp108708::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur mCherry::RAB7, caractéristique de l'endosome tardif transitoire et du tonoplaste. 5<sup>e</sup> ligne, Plan focal de *Mlp108708::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur mCherry::PIP2a, caractéristique de la membrane plasmique. E. Plan focal de *Mlp72983::eGFP* co-agroinfiltré avec le marqueur SWIB6::RFP, caractéristique des nucléoïdes chloroplastiques. F. Plan focal de *Mlp86274::eGFP* et illustration de l'hétérogénéité de l'autofluorescence

chlorophyllienne. Cy : Cytoplasme, siB : siRNA bodies, Ch : Chloroplaste, ER : Réticulum endoplasmique, TGN : réseau du trans-golgi, LE/MVB : endosome tardif et corps multivésiculaire, V. Vacuole, M : Membrane. Marqueurs subcellulaires issus de (Nelson et al. 2007, Melonek et al. 2012, Ivanov et Harrison 2014).

### 3.4 Les CSEPs HSH modifient la fréquence d'induction de stromule dépendamment et indépendamment de *eds1* et *nrg1*

Le rôle chloroplastique étant de plus en plus repensé dans l'interaction plante-microorganisme, l'induction d'un stress chloroplastique, par la quantification de stromules, a été étudié pour les CSEPs de type HSH.

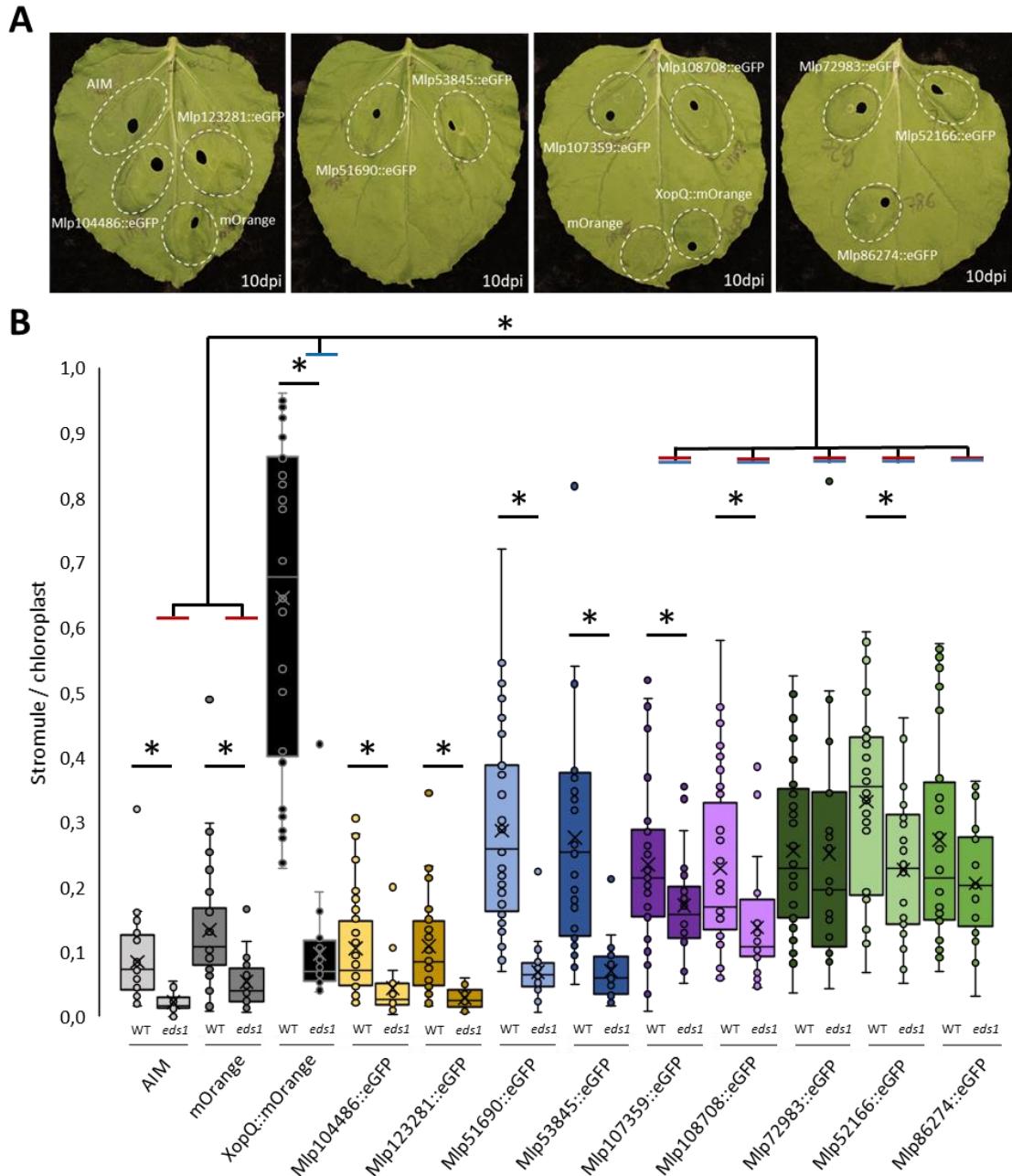
Comme illustré dans le panneau A. de la figure 3.6, aucune des CSEPs HSH n'induit de réaction d'hypersensibilité à l'instar du contrôle positif XopQ::mOrange. La partie B de la figure 3.6 rapporte le ratio de stromules par chloroplaste 72 heures après l'agroinfiltration de chacune des CSEPs HSH. Le contrôle négatif *Agroinfiltration Inoculation Medium* (AIM) rapporte l'induction de stromules dû au stress physique de l'infiltration. Le contrôle négatif mOrange combine l'induction de stromules dû à l'infiltration, la présence d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 ainsi que l'expression de la protéine fluorescente mOrange. L'effecteur XopQ::mOrange est une protéine du pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*; souche 85-10). Utilisé, ici, comme un contrôle positif, XopQ::mOrange est caractérisé pour être reconnu par le récepteur TIR-NLR ROQ1 et engendrer une forte induction de stromules chez *N. benthamiana* et *A. thaliana* (Schultink et al. 2017, Erickson et Schattat 2018). Les neuf CSEPs HSH rapportent une différence significative ( $p < 0,05$ ) d'induction avec le contrôle positif XopQ. D'autre part, Mlp51690, Mlp53845, Mlp107359, Mlp108708, Mlp72983, Mlp52166, Mlp86274, respectivement des familles 33, 51 et 7, induisent significativement plus de stromules que les contrôles négatifs : AIM et mOrange. À l'inverse, Mlp104486 et Mlp123281, de la famille 1, ne présentent pas d'induction de stromules significative.



**Figure 3.6** Les CSEPs HSH des familles 33, 51 et 7 induisent des stromules chez NbFNR::eGFP\_WT.

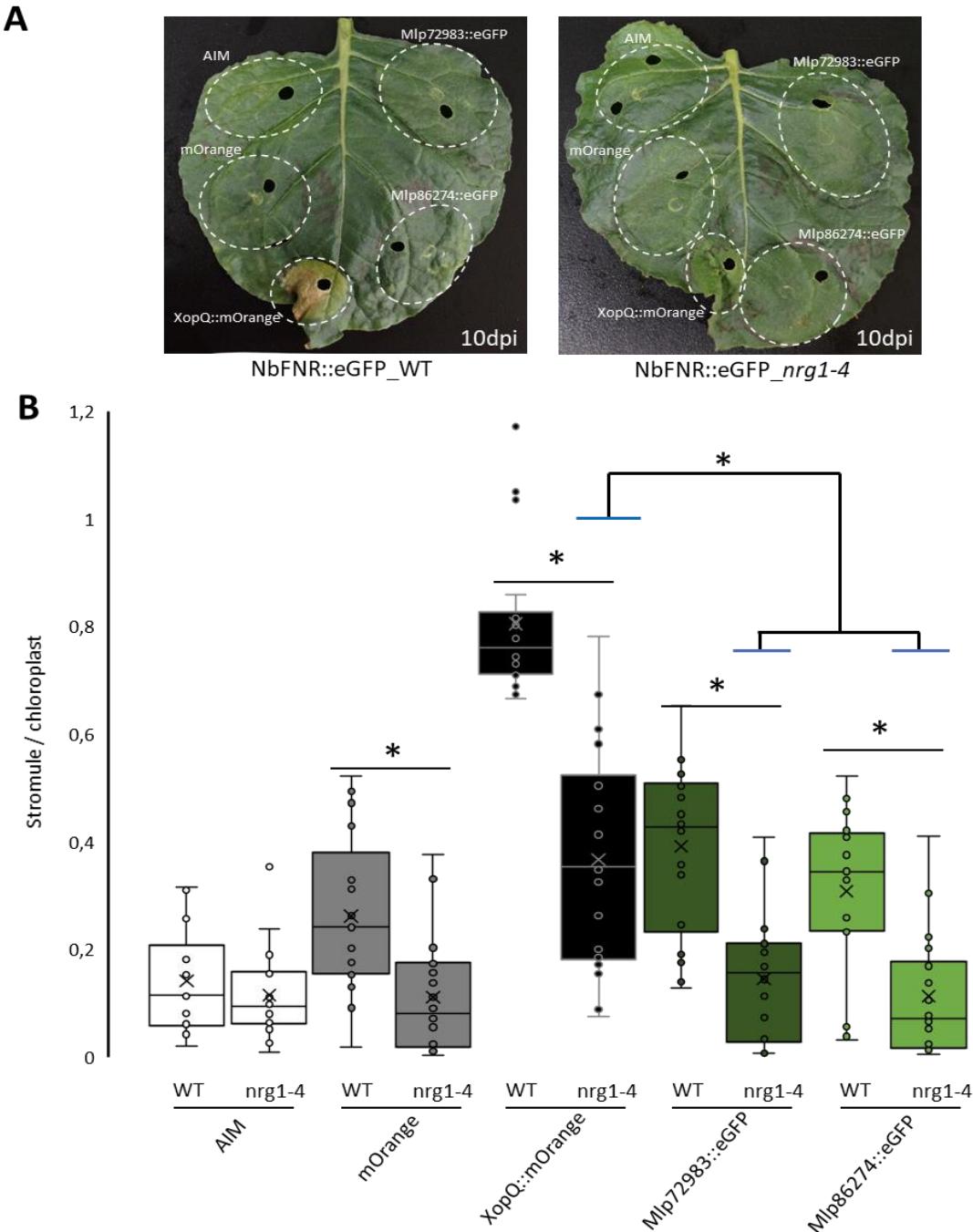
A. État d'avancement de la réponse hypersensible 10 dpi des plants NbFNR::eGFP\_WT. B. Ratio de stromules par chloroplaste 72 hpi ( $n = 36$ , 3 répliques techniques sur 12 plantes NbFNR::eGFP\_WT). Les étoiles signalent la différence significative ( $p \leq 0,05$ ) d'après le test statistique Mann-Whitney.

EDS1 étant une protéine charnière dans l'induction de stromules par XopQ::mOrange, une quantification sur le cultivar NbFNR::eGFP\_eds1 a été menée en parallèle. Le panneau A. de la figure 3.7 illustre qu'aucune des constructions, XopQ::mOrange y compris, n'induit de réaction d'hypersensibilité chez NbFNR::eGFP\_eds1. L'induction sur NbFNR::eGFP\_WT et NbFNR::eGFP\_eds1 sont rassemblés dans la partie B de la figure 3.7. Mis à part Mlp72983 et Mlp86274, l'ensemble des CSEPs HSH et des contrôles ont montré une diminution significative de l'induction de stromules chez le mutant *eds1*. Précisement, XopQ::mOrange, Mlp104486, Mlp123281, Mlp51690 et Mlp53845 n'induisent pas de stromule d'une façon significative par rapport aux contrôles négatifs. Malgré tout, l'ensemble des CSEPs HSH des familles 51 et 7 induisent significativement plus de stromules que les contrôles négatifs. Mlp72983 et Mlp86274 sont les deux seuls CSEPs qui n'ont pas montré de changement significatif dans leur intensité d'induction de stromules chez NbFNR::eGFP\_eds1. La cascade impliquée dans l'induction de stromules compte la protéine NRG1 en aval de EDS1.



**Figure 3.7** L’induction de stromules des CSEPs HSH des familles 33, 51 et 7 est significativement supprimée, réduite ou inchangée par la délétion *eds1*.  
**A.** État d’avancement de la réponse hypersensible 10 dpi des plants NbFNR::eGFP\_eds1. **B.** Ratio de stromules par chloroplaste 72 hpi (n = 24, 3 répliques sur 8 plantes NbFNR::eGFP\_eds1). Les étoiles signalent la différence significative ( $p \leq 0,05$ ) d’après le test statistique Mann-Whitney.

Afin de qualifier l'importance de NRG1 dans l'induction de stromules, ces derniers ont été testés sur deux lignées indépendantes NbFNR::eGFP\_*nrg1*. La partie A de la figure 3.8 illustre que l'ensemble des constructions n'induisent pas de réaction d'hypersensibilité après 10 jours d'agroinfiltration lors de la délétion de NRG1 dans la lignée NbFNR::eGFP\_*nrg1-4*. La partie B de la figure 3.8 compare l'induction de stromules dans les cultivars NbFNR::eGFP\_WT et NbFNR::eGFP\_*nrg1-4* pour les CSEPs HSH Mlp72983 et Mlp86274. Hormis AIM, le contrôle mOrange ainsi que XopQ, Mlp72983 et Mlp86274 témoignent d'une réduction significative ( $p < 0,05$ ) d'induction de stromules dû à la délétion *nrg1*. Ici, l'impact de Mlp72983 et Mlp86274 est significativement différent à XopQ::mOrange, mais pas des contrôles négatifs AIM et mOrange. Des constats identiques ont été obtenus avec la lignée NbFNR::eGFP\_*nrg1-5* (Annexe B).



**Figure 3.8** **Mlp72983 et Mlp86274 induisent des stromules de façon dépendante à NRG1.**

**A.** État d'avancement de la réponse hypersensible 10 dpi des plants NbFNR::eGFP\_nrg1-4. **B.** Ratio de stromules par chloroplaste 72 hpi ( $n = 18$ , 3 réplicas sur 6 plantes NbFNR::eGFP\_nrg1-4). Les étoiles signalent la différence significative ( $p \leq 0,05$ ) d'après le test statistique Mann-Whitney.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1 Processus de sélection et d'étude des CSEPs HSH

Du fait de la complexité du cycle de vie de *Mlp*, de la nature pérenne et des écarts taxonomiques entre ses hôtes, mais aussi la disponibilité des trois génomes, le pathosystème *Mlp*-Mélèze/Peuplier est un modèle précurseur dans l'étude d'interaction hôte-pathogène biotrophe. Les transcriptomes de *Mlp* lors de l'infection de peuplier ont d'ores et déjà permis l'identification de 1184 CSEPs et l'étude plus ou moins approfondie d'une quarantaine d'entre eux. C'est avec Lorrain et al. (2018) que l'étude du pathosystème en son entièreté a débuté (Lorrain et al. 2018). Les transcriptomes recueillis regroupaient l'ensemble des stades infectieux des haustoria sur les 7 jours comprenant le processus de pénétration, de colonisation et l'initiation de la sporulation. Les transcriptomes utilisés pour la sélection des CSEPs constituaient donc une unique image de l'ensemble de ces étapes et des multiples transcriptomes qui la composent (Lorrain et al. 2018). La temporalité de l'expression des CSEPs HSH ne peut donc être utilisée dans le processus de caractérisation de ces dernières. Aujourd'hui, le perfectionnement technologique de plus en plus rapide permet d'obtenir des points de vue de plus en plus précis quant aux dynamiques de transcriptions adoptés dans des interactions de parasitisme, notamment en distinguant les phases d'infection (0-3 dpi) et de production/sporulation (4-7dpi) (Chen et al. 2019).

Un point important de cette recherche était l'annotation de la spécificité d'expression d'une CSEP à un hôte. Deux avenues pouvaient donc être envisagées; l'une sélectionnant la plus haute expression (comparaison entre *Poplar* et *Larch* de la figure 3.1.) et l'autre sélectionnant la plus forte variation (comparaison des ratios *[Poplar/USP]* contre *[Larch/BSD]* de la figure 3.1). En général, l'application de l'une ou l'autre des méthodes

tendait à des annotations d'hôtes identiques. Seul l'annotation de *Mlp52166* a nécessité l'établissement d'une stratégie conciliant les deux processus d'annotation. En effet, pour prévenir les possibles limitations de l'outil de normalisation LIMMA R, l'ampleur de l'expression prenait le pas sur l'annotation différentielle dans le cas où l'amplitude d'expression d'une CSEP était 10 fois supérieures chez un hôte par rapport à son expression chez le second hôte. La notion de spécificité d'hôte a déjà été mise en lumière chez divers pathogènes. Par exemple, une étude phylogénique des répertoires d'effecteurs Xop délivrés par diverses espèces de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*) a identifié que les effecteurs XopQ et AvrBsT sont exprimés en fonction de l'hôte ciblé : la tomate (*Solanum lycopersicum*) ou le piment d'ornement (*Capsicum annuum*). Cette étude constate aussi que l'accumulation de SNPs est à l'origine des différences entre les espèces de *Xanthomonas* (Schwartz et al. 2015). La spécificité d'hôte se distingue aussi par les métabolites secondaires produites par certains pathogènes. En effet, la virulence de l'ascomycète nérotrophe *Stagonospora nodorum* va notamment varier dépendamment des cibles avec lesquelles ses toxines SnToxA, SnTox1 ou SnTox3 interagiront chez les cultivars de blé infectés (Li et al. 2020).

Dans le souci de limiter les biais d'alignements, les outils d'alignement MUSCLE et ClustalO ont été exploités en parallèle. Les résultats d'alignements des deux méthodes ont été identiques pour les familles 1, 33 et 51. Cependant, le choix particulier d'une analyse en trio pour la famille 7 a été pris. En effet, comme illustrés par le dernier encadré de la figure 3.1, les alignements multiples effectués par MUSCLE présentaient une plus forte proximité entre *Mlp52166* et *Mlp72983*. Cependant, ClustalO présentait *Mlp52166* et *Mlp86274*. Ces divergences de résultats peuvent être dues aux méthodologies de calculs empruntées par ces derniers. En effet, la méthode progressive de ClustalO identifie, tout d'abord, les sections de séquence les plus identiques avant de procéder à l'alignement des séquences les moins similaires (Thompson et al. 1994). À l'inverse, MUSCLE va emprunter une stratégie en boucle itérative en générant aléatoirement des alignements et sélectionner les conditions d'alignements au score le plus faible (Edgar 2004). Les scores, et donc les arbres phylogénétiques, ainsi générés sont alors issus de valeurs intrinsèques à la programmation de ces outils. Ces deux méthodes étant largement adoptées par la

communauté scientifique au moment du processus de sélection, le choix de sélection d'un « troupe » a été fait : Mlp52166 en tant que CSEP spécifique à une infection au peuplier et Mlp72983 et Mlp86274 en tant que CSEPs spécifiques au mélèze. Aucune des CSEPs sélectionnées ne présentent d'homologies avec des effecteurs/CSEPs/Avr caractérisés dans la littérature (Joly et al. 2010, Petre et al. 2015).

La technique de criblage par le système double hybride chez la levure est répandue pour identifier les interactants d'une protéine d'intérêt notamment pour identifier les interactants d'effecteurs de Rouille (Xu et al. 2019). Par le biais d'extraction d'ARN, cette dernière permet de tester, chez la levure, des millions de combinaisons d'interactions protéine-protéine possibles issues des transcrits des organismes choisis. Largement éprouvée techniquement, cette méthode induit, malgré tout, certaines limitations. Tout d'abord, les différences de morphologie et de l'homéostasie entre une levure *Saccharomyces cerevisiae* et une plante vasculaire peuvent induire des biais expérimentaux (modifications post-traductionnelles, présence du protéome de la levure, différence dans le système de translocation nucléaire). En effet, il est estimé que jusqu'à 75 % de vraies interactions peuvent être manquées sous forme de faux négatifs (Rajagopala et al. 2007). Malgré tout, aucune méthode d'étude des interactions protéine-protéine ne comporte de biais indiscutables. Afin de confirmer une interaction, il est donc nécessaire de cumuler plusieurs techniques d'interaction comme la coimmunoprécipitation, la microscopie par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ou encore la complémentation de fluorescence bi-moléculaire. Aussi, les techniques actuelles limitent malgré tout certains champs d'études. En effet, encore peu de technologies permettent d'étudier l'interaction de plus de trois protéines à la fois (Martin 2012, Struk et al. 2019). L'étude des relations/interactions plus complexes entre les protéomes d'un pathosystème est donc, pour le moment, encore difficile à aborder dans son intégralité. Plus spécifiquement au pathosystème *Mlp*-Peuplier/Mélèze, la limite technique à transformer et cultiver *Mlp* en milieu synthétique restreint aussi les libertés des études faisables. Malgré tout, le présent criblage par double hybride chez la levure a dressé une liste de potentiels interactants pour six des neuf CSEPs. L'une des limitations de cette méthode est l'identification de protéines solubles uniquement, et qui

peuvent transloquer au noyau de la levure grâce aux peptides de transit portés par les domaines AD et BD-GAL4 fusionnés à ces dernières. En ce sens, les localisations subcellulaires des trois CSEPs dépourvus d'interactants potentiels (Mlp51690, Mlp107359, Mlp108708) pourraient expliquer l'absence d'interactants identifiés. Il a aussi été possible d'identifier des interactants communs aux paires de CSEPs homologues. Le premier criblage d'effecteur mené par Petre et al. en 2015 a permis d'identifier un ou plusieurs interactants candidats pour près d'1/5<sup>e</sup> des CSEPs étudiées.

Les localisations subcellulaires prédites par trois outils, Localizer R prediction, WoLPSORT et Nucleolus ont été comparées aux réelles observations (Tableau 4.1). Pour Mlp53845 et Mlp52166, les prédictions respectives au chloroplaste et dans les mitochondries ne se vérifient pas. Cependant, pour une majorité des prédictions la localisation entière ou partielle des CSEPs se vérifie. L'observation de la localisation subcellulaire du contrôle eGFP libre correspond à la localisation nucléocytosolique induite par diffusion rapportée par la littérature (Hanson et Köhler 2001). Semblable à celle-ci, la localisation de Mlp52166 ne permet donc pas de conclure fermement d'une localisation. Afin de limiter des biais subjectifs, les observations rassemblées dans les figures 3.4 et 3.5 résultent des signaux moyens compilés sur l'ensemble des réplicas. En effet, la répétition des expressions transitoires pour certaines CSEPs ont mis en lumière des variations dans l'intensité du signal ou même dans certaines localisations partielles. Par exemple, Mlp123281 présentait à chaque fois une localisation au noyau, dans le cytosol, dans des corps cytosoliques et les chloroplastes. Seulement, certains réplicas présentaient un signal s'accumulant davantage dans le cytoplasme (n = 5) et d'autres, davantage dans le chloroplaste avec des signaux distincts dans les nucléoïdes chloroplastiques (n = 7). Aussi, Mlp72983, précédemment publié sous une localisation uniquement chloroplastique chez *A. thaliana* présentait, ici, une alternance entre une localisation unique au chloroplaste (n = 8), une localisation unique au noyau (n = 5) ou une double localisation (n = 3) (Germain et al. 2018). Ces observations ont été effectuées dans des conditions de croissance et des âges de plantes semblables. Pour le cas de Mlp72983, l'étude de cette variation dépendamment du cycle circadien n'a pas montré de corrélation significative (Brisson et al. 2019). Les notions de réplicas et de reproductibilité

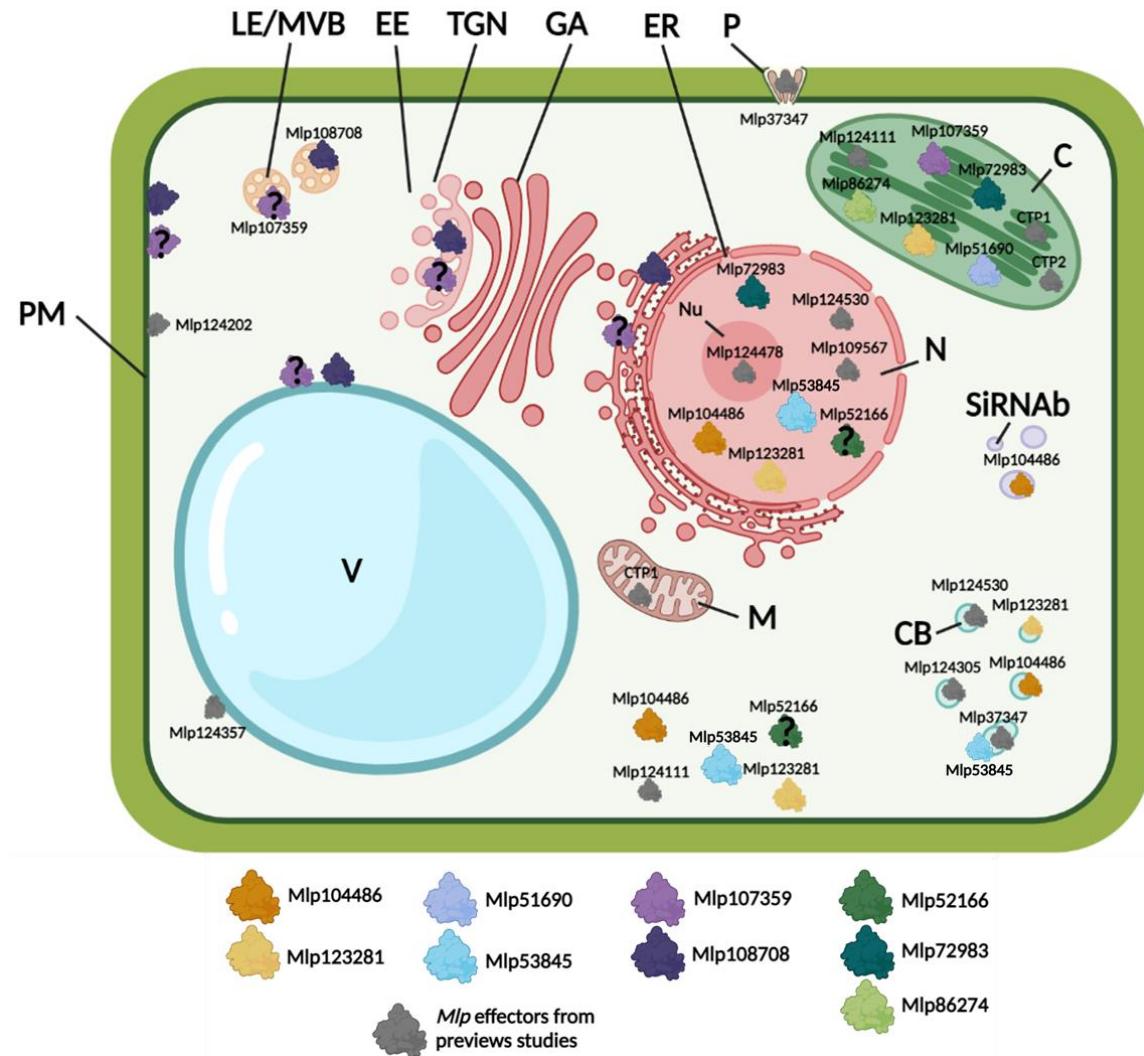
des observations microscopiques sont très peu d'usage dans les études visant la caractérisation de la localisation d'une protéine. Certaines études s'attardent, malgré tout, sur les différences d'expression de protéines en fonction des stages de croissance et du positionnement des feuilles de *N. benthamiana* (Béchard-Dubé 2015, Goulet et al. 2019). Pourtant, le cas de Mlp72983, développé subséquemment, souligne l'importance d'une répétition des observations afin de conclure d'une localisation lors d'une expression transitoire dans la plante modèle *N. benthamiana*.

**Tableau 4.1**  
Comparaison des localisations prédictes et observées

Family	Protein ID	Localizer R prediction <sup>a</sup>	WoLFPSORT <sup>b</sup>	Nucleolus <sup>c</sup>	Experimentally determined localization <sup>d</sup>
1	<b>Mlp104486</b>	N/A	C (6/14)	N/A	Nucleus, cytosol, siRNA bodies, cytosolic bodies
	<b>Mlp123281</b>	N/A	N (10/14)	Yes (70-75 %)	Nucleus, cytosol, cytosolic bodies, chloroplast (stroma and nucleoids)
33	<b>Mlp51690</b>	Ch 0,997	Ch (11/14)	N/A	Chloroplast (stroma and nucleoids)
	<b>Mlp53845</b>	Ch 0,936	Ch (9/14)	N/A	Nucleus, cytosol, cytosolic bodies
51	<b>Mlp107359</b>	N/A	Ch (4/14)	N/A	Chloroplast, cytosolic membranes
	<b>Mlp108708</b>	N/A	N (3,5/14)	N/A	ER, TGN, LE, MVBs, PM
7	<b>Mlp52166</b>	N/A	M (6/14)	N/A	Nucleus, cytosol
	<b>Mlp72983</b>	N/A	N (9/14)	Yes (70-75 %)	Nucleus (nuclear bodies), Chloroplast (stroma and nucleoids)
	<b>Mlp86274</b>	N/A	Ch (10/14)	N/A	Chloroplast

**a.** Localizer R prediction version 1.0.4 (<https://localizer.csiro.au/>). **b.** WoLFPSORT, mode « plante » (<https://wolfsort.hgc.jp/>). C : cytoplasme, N : noyau, Ch : chloroplaste. **c.** NOD nucleolar localization sequence detector (<https://bio.tools/nod>). **d.** Observations par expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana*. ER : Réticulum endoplasmique, TGN : réseau trans-golgi, LE : endosome tardif, MVBs : corps multivesiculaires, PM : membrane plasmique.

Ce travail représente le troisième processus de criblage appliqué sur des CSEPs de *Mlp*. Parmi les 44 CSEPs actuellement caractérisées, certaines localisations subcellulaires divergent du contrôle négatif de la GFP libre (Lorrain et al. 2019). Dans un effort de tenir à jour les avancées dans ce domaine, il est possible de produire la figure 4.1 qui regroupe les 10 CSEPs des criblages précédents aux localisations spécifiques (non nucléocytoplasmique) et les neuf CSEPs caractérisées dans cette présente étude.



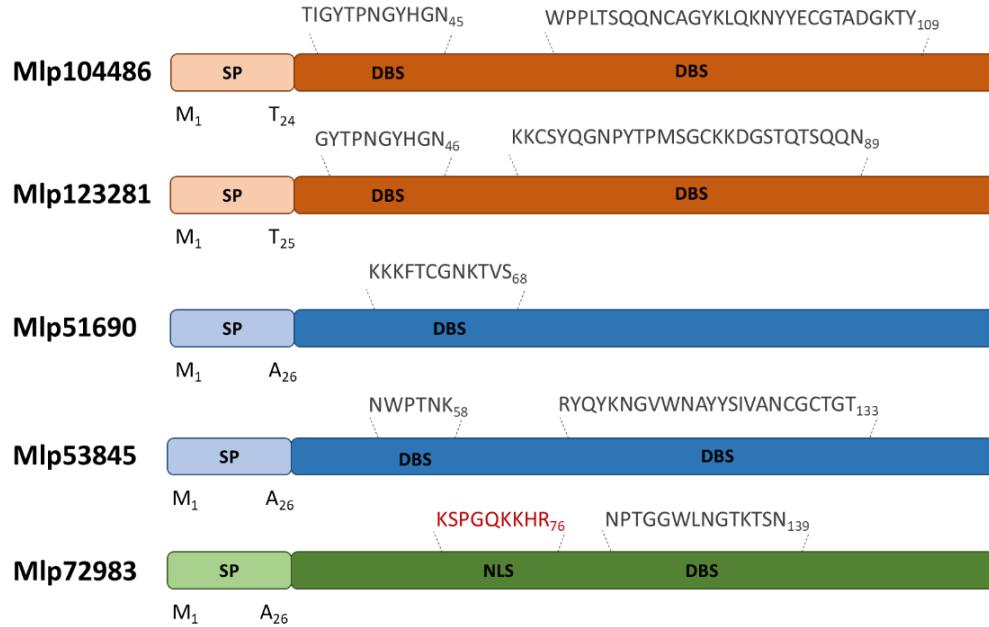
**Figure 4.1 Localisations subcellulaires des CSEPs de *Melampsora larici-populina* caractérisées à ce jour chez *A. thaliana* ou *N. benthamiana*.**

Les CSEPs caractérisées dans la présente recherche sont en couleur, l'ensemble des CSEPs rapportées par la littérature sont en gris. Mlp52166 présente une localisation subcellulaire similaire au contrôle, l'incertitude de cette localisation est marquée d'un point d'interrogation.

Dû aux difficultés techniques, l'hypothèse de la colocalisation de Mlp107359 dans le réseau endomembranaire est aussi marquée d'un point d'interrogation. Les CSEPs rapportées dans la littérature présentant une localisation similaire à la eGFP libre ne sont pas représentées. Mlp124111 présente une localisation cellulaire partielle dans des agrégats cytosoliques. PM : Membrane plasmique, LE/MVB : Endosomes tardifs et corps multivésiculaires, EE : Endosomes précoce, TGN : Réseau transgolgi, GA : Appareil de golgi, ER : Réticulum endoplasmique, P : Plasmodesme, C : Chloroplaste, N : Noyau, Nu : Nucléole, M : Mitochondrie, CB : Corps cytosoliques, siRNAb : corps de petits ARN interférents. Figure produite avec BioRender inspirée de (Lorrain et al. 2019).

Toutes proportions gardées, le nombre de CSEPs aux localisations nucléocytosoliques du présent criblage est nettement inférieur aux deux premiers (1/9 contre 25/35). Les critères choisis pourraient en être l'origine. Le premier criblage s'est surtout intéressé aux CSEPs uniquement exprimées lors des phases infectieuses chez le peuplier et ne partageant pas d'homologie avec des CSEPs d'autres pathogènes de l'ordre des Pucciniales (Petre et al. 2015). Le second criblage a principalement caractérisé des CSEPs fortement exprimées dans les haustoria formés dans le mésophylle des feuilles de peuplier (Germain et al. 2018). Les critères choisis dans ce troisième processus de criblage, quant aux potentielles pressions de sélections appliquées sur les individus du pathosystème, ont peut-être joué dans la sélection de CSEPs aux localisations subcellulaires spécifiques.

Dans les prochaines sous-parties de la discussion, des avenues fonctionnelles seront proposées au regard des résultats de chacune des CSEPs, mais aussi de la paire homologue. Pour compléter ces discussions, la figure 4.2 illustre les prédictions de sites de liaison à l'ADN (DBS) et de signaux de localisation au noyau (NLS) de certains d'entre eux.



**Figure 4.2 Cinq CSEPs comportent des séquences prédictes pour une liaison à l'ADN (DBS) et Mlp72983 pourrait porter un signal de localisation au noyau (NLS).**

Les couleurs orange, bleu et verte rapportent respectivement aux familles 1, 33 et 7 des CSEPs. Prédiction du NLS : NLStradamus, threshold 0,6. Prédiction des DBS : DRNApred (Yan et Kurgan 2017).

## 4.2 Potentiel d'action des homologues Mlp104486 et Mlp123281

Mlp104486 et Mlp123281 partagent 86,5 % de similarité de séquence, des localisations dans le noyau, le cytoplasme, et des corps cytosoliques ainsi que 10 interactants candidats communs, dont deux protéases à la cystéine : RD19A et 15A-like. L'une des avenues fonctionnelles à explorer pour les CSEPs HSH de la famille 1 peut donc être en lien avec ces protéases. De nombreuses protéases à la cystéine ont démontré leurs rôles dans la défense immunitaire et la PCD comme la famille des PAPAIN-LIKE CYSTEINE PROTEASE (PLCPs) (Dong et al. 2014). La RESPONSE TO DEHYDRATATION 19 (RD19) est une PLCP qui localise chez *A. thaliana* dans des corps cystoliques, mais à l'interaction avec l'effecteur PSEUDOMONAS OUTER PROTEIN P2 (PopP2) est transloquée au noyau (Bernoux et al. 2008). Les localisations au noyau et dans des corps cytosoliques sont aussi des caractéristiques de Mlp104486 et Mlp123281. Dernièrement

RD19A a été identifiée comme impliquée dans la voie d'induction de la PCD par son interaction avec une thioredoxine contre la Rouille jaune du blé *Puccinia striiformis f. sp. tritici* (Shi et al. 2021). La thioredoxine de type F est aussi une protéine ayant interagi avec les deux CSEPs. En revanche, le processus de discrimination post-double hybride l'a conduite à être considérée comme un faux positif. La présence de potentiels sites de liaison à l'ADN (Figure 4.2) ainsi qu'une localisation nucléaire (et aux nucléoides chloroplastiques pour Mlp123281) (Figures 3.4 et 3.5) des CSEPs offre aussi une avenue possible d'une interaction directe avec les génomes des hôtes dans le but de moduler leur expression. Cette interaction pourrait être aussi indirecte via une liaison avec le TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1 ALPHA 2 (EF1A2) qui compose le complexe d'initiation et d'elongation de la traduction (Hwang et al. 2015). En outre, Mlp104486 présente aussi des interactants potentiels tels que trois sous-unités de ARN polymérase, une sous-unité ribosomale, mais aussi, le facteur de transcription GATA TF5. Ce TF serait essentiel pour la photosynthèse et la croissance de *P. trichocarpa*. Il serait aussi possiblement impliqué dans les réponses aux stress abiotiques et prédit sous un promoteur dépendant à l'acide jasmonique (An et al. 2020). N'induisant pas significativement de stromule (Figure 3.6), les impacts des CSEPs HSH de la famille 1 n'induisent pas de stress chloroplastique suffisant ou inhibent l'induction de ces derniers.

Afin d'éviter les biais, il est aussi possible de considérer chacun des CSEPs comme des entités à part entière aux potentielles fonctions distinctes qui, *in fine*, peuvent desservir un but commun (Dos Santos et al. 2021). Ainsi, la colocalisation dans les siRNA bodies de Mlp104486::eGFP pourrait être une avenue fonctionnelle prometteuse. Cependant, Li et al. (2016) ont démontré que, malgré le maintien de la régulation de l'expression des gènes de défense médiées par les micro ARN, le cultivar de peuplier Robusta était susceptible à *Mlp* E4 (Li et al. 2016). Ainsi l'avenue d'une potentielle interférence de Mlp104486 dans les siRNA bodies est moins probable. Aussi, Mlp104486 lie deux protéines reliées à la pathogénicité (PR) dont PR4. Dans les phases précoce du processus infectieux (12 hpi et 4 dpi), Chen et al (2019) rapportent que la famille des PR sont des gènes dérégulés lors de l'infection du peuplier Robusta par *Mlp* du pathotype virulent E4 (Chen et al. 2019). La famille des PR4 est aussi citée par la littérature pour

leurs rôles antifongiques notamment contre la pyriculariose du riz *Magnaporthe grisea* ou l'oïdium de la vigne *Erysiphe necator* (Wang et al. 2011, Wang et al. 2011, Dai et al. 2016, Dabrevolski et Frenkel 2021).

Le criblage en double hybride de Mlp123281 a identifié un membre de la famille des LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN (LHCb) du mélèze. Ces protéines sont impliquées dans le transfert de l'excitation des pigments vers le PSII. Cette famille est rapportée par Chen et al. (2019) pour être surexprimée à 12 hpi et 4 dpi (Chen et al. 2019). Aussi, un autre interactant candidat à Mlp123281 est un homologue à la famille des PR5, les thaumatin. Dérégulées lors d'une interaction susceptible *Mlp* E4 – Peuplier Robusta, ces dernières présentent des activités antifongiques (Petre et al. 2011, Chen et al. 2019). Finalement, Mlp123281 se distingue de son homologue notamment par sa localisation aux nucléoïdes chloroplastiques (Figure 3.5). Malheureusement, comme l'ensemble des CSEPs criblées contre la librairie de mélèze, une proportion importante des interactants candidats sont des protéines non identifiées dépourvues de prédition fonctionnelle. Ceci demande donc une exploration davantage approfondie afin d'appréhender le potentiel de ces dernières.

#### **4.3 Mlp51690 et Mlp53845, des profils différents, mais un même chemin d'induction**

La haute similarité des séquences de Mlp51690 et Mlp53845 (85,4 %) illustre peu les différences observées quant à leurs localisations et les interactants candidat obtenus. En effet, la localisation au noyau, au cytoplasme ainsi que dans des corps cytosoliques de Mlp53845 se distingue de la prédition, mais aussi de la localisation cellulaire de son homologue Mlp51690 (Tableau 4.1). Une étude plus approfondie menée par l'étudiant à la maîtrise Alexandre Brisson (direction Dr Hugo Germain) a dernièrement illustré que la présence complète ou partielle du peptide signal ne modifie pas la localisation observée dans la figure 3.4 pour la forme mature de Mlp53845 (résultats non publiés). Criblé contre la librairie mélèze, seulement trois interactants candidats présentent des annotations (Annexe B). Malgré tout, ces trois candidats ne permettent pas de réduire les champs

d'investigations. En effet, les ligases d'ubiquitine E3 font partie d'une large famille de protéines impliquées dans diverses voies s'appliquant à la conformation et la stabilité du protéome cellulaire. Cela dit, certaines comme la PLANT U-BOX13 (PUB13) sont impliquées dans la régulation du receptorosome en réprimant l'abondance de récepteurs extracellulaires à la chitine comme LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE 5 (LYK5) (Chen et al. 2022). Aussi, une métallothioneine, famille de protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie ionique, a été identifiée. Cependant, la littérature ne mentionne leurs rôles que lors de stress abiotiques (Khalid et al. 2020). Et finalement, la protéine KIN1-like souffre aussi d'un manque de littérature (Baron et al. 2014). En outre, aucun des interactants candidats issus du criblage de Mlp53845 n'interagit avec Mlp51690. L'absence d'interactant protéique, la prédition d'un site de liaison avec l'ADN ainsi que la localisation aux nucléoïdes chloroplastiques (Figure 3.5) de Mlp51690 orientent vers l'hypothèse d'une interaction avec le génome chloroplastique. Même si CTP3 présente une localisation ressemblant à celle des nucléoïdes chloroplastiques (Figure 1.13, panneau C), aucun effecteur n'a, jusqu'à présent, été publié avec une localisation aux nucléoïdes (colocalisation avec un marqueur cellulaire). À vrai dire, encore peu d'étude se sont attelées à caractériser les tenants et aboutissants de cette structure particulière (Krupinska et al. 2019, Teubner et al. 2020, Taylor et al. 2022). Malgré les profils disparates de Mlp51690 et Mlp53845, ces derniers présentent une homologie d'induction des stromules dépendante à EDS1 (Figure 3.6 et 3.7). Ce profil d'induction de stromule est similaire à celui de XopQ (Prautsch et al. 2021). En revanche, la localisation exclusive de Mlp5190 et l'hypothèse d'un potentiel interaction à l'ADN chloroplastique représente une avenue de caractérisation inédite : pour l'induction des stromules, mais aussi pour le mécanisme infectieux emprunté par *Mlp*.

#### 4.4 Mlp107359 et Mlp108708 : qu'en est-il des membranes?

Similaire à 86,2 %, les criblages par double hybride chez la levure des CSEPs Mlp107359 et Mlp108708 n'ont pas permis d'identifier des interactants candidats. Cette technique permettant d'identifier uniquement les protéines solubles pouvant transloquer au noyau de la levure à l'aide des peptides de transit portés par les domaines AD et BD de GAL4,

les localisations subcellulaires de ces CSEPs peuvent offrir une explication à de tels résultats. En effet, *Mlp108708* est rapporté dans la figure 3.5 comme colocalisant avec cinq marqueurs subcellulaires retrouvés tout au long du réseau endomembranaire. Ce dernier pourrait donc interagir avec une protéine membranaire. Une telle étude de colocalisation avec *Mlp107359* n'a pu être menée sur le réseau endomembranaire. En effet, l'intensité du signal de *Mlp107359::eGFP* en présence des marqueurs cellulaires n'était pas suffisante afin d'apporter des preuves significatives de colocalisations (exemple d'une colocalisation avec la protéine HDEL caractéristique du réticulum endoplasmique dans le panneau B de l'Annexe D). En revanche, la localisation chloroplastique de *Mlp107359* est franche (Figure 3.4).

La mobilité de certaines vésicules a parfois complexifié l'observation de colocalisation entre *Mlp108708* et les marqueurs subcellulaires. En effet, afin de prévenir le phénomène de contamination de signal, aussi appelé phénomène de *bleeding*, entre les canaux vert (eGFP) et rouge (mCherry ou RFP), les figures de colocalisation ont été acquises de façon séquentielle (Maddipatla et Tankam 2020). Tour à tour, les lasers à 488 nm et à 552 nm s'ouvrent pour exciter respectivement les fluorophores eGFP et mCherry/RFP. Ce décalage technique de quelques millisecondes entre l'acquisition des fluorescences vertes et rouges est illustré par l'Annexe E entre *Mlp108708::eGFP* et mCherry::RAB7, marqueur de la vacuole (décalage corrigé à la troisième ligne du panneau D de la figure 3.5). Une correction de 2,5 µm a dû être apportée au canal eGFP pour constater une colocalisation des fluorescences. Ce décalage entre deux acquisitions est le même principe pour calculer la vitesse de déplacement *in vivo* d'une vésicule (Madina et al. 2018).

D'après Chen et al. 2019, le second groupe de gènes subissant le plus de dérégulation chez le peuplier Robusta lors d'une infection par *Mlp* E4 se rapporte aux protéines localisant à la membrane plasmique (Chen et al. 2019). Nouvellement, la littérature illustre l'importance de rôle d'effecteurs non protéique dans le processus d'infection. L'hypothèse partagée par certaines de ces métabolites spécialisés et ces miARN est, qu'ils sont délivrés dans le cytoplasme de l'hôte par le biais de vésicules extracellulaires (Collemare et al.

2019). En ce sens, il a été rapporté que les plantes présentent un mécanisme similaire d'exocytose de vésicules extracellulaires afin d'exporter des petits ARN (sARN) vers le pathogène (Cai et al. 2018, Van Niel et al. 2018). Ces effecteurs sARN induisent, ainsi, le silencage de plusieurs cibles, et donc plusieurs mécanismes, à l'aide d'une seule petite séquence d'ARN (Collemare et al. 2019). De nombreuses organelles du réseau des endomembranes sont aussi associées aux mécanismes d'autophagie et à l'induction de la PCD (Leary et al. 2019). Les vastes potentiels fonctionnels du réseau endomembranaire dans l'immunité végétale sont admis par la communauté, en revanche, les technologies pour les explorer sont encore à leurs débuts (Parsons et Lilley 2018, Voiniciuc et al. 2018, Placidi et Campa 2021). Produit de l'extension de la membrane chloroplastique, les localisations de *Mlp107359* et *Mlp108708* pourraient avoir un lien sur le profil particulier d'induction de stromules. En effet, la réduction de l'induction de stromules chez *NbFNR::eGFP\_eds1*, illustre une dépendance partielle à *EDS1* pour l'induction de stromule (Figure 3.7).

#### 4.5 ***Mlp52166, Mlp72983, Mlp86274, un « troupe » particulier***

Le groupe de trois CSEPs homologues de la famille 7 se relève d'une lecture plus complexe. Afin de faciliter le cheminement de pensée, les CSEPs seront discutées distinctement puis à l'échelle de la famille.

Tout d'abord, *Mlp52166*, CSEP spécifique à l'infection d'un peuplier, se distingue de ces homologues par sa localisation cellulaire non concluante (identique au contrôle de la eGFP libre) ; au noyau et au cytosol (Figure 3.4). Cependant, il ne compte pas moins de 40 interactants candidats dont six ne sont pas caractérisés et six autres sont rapportés par Chen et al. 2019 comme étant dérégulés lors d'une interaction Robusta-*Mlp* E4 (Chen et al. 2019). Parmi ces six candidats dérégulés, deux d'entre eux interagissent aussi avec les deux autres CSEPs de la famille 7 : la protéine BURP DOMAIN RD22-LIKE et le récepteur WALL-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE LIKE-10. Encore peu caractérisée, la première est impliquée dans les réponses aux stress abiotiques notamment au travers d'une induction par l'acide abscissique (Shao et al. 2011). La seconde est

rapportée chez *A. thaliana* comme une Guanylyl cyclase qui catalyse la guanosine cyclique 3', 5' monophosphate (cGMP) à partir de guanosine triphosphate (GTP). Le cGMP est un second messager intracellulaire qui transmet la reconnaissance d'un stimulus extracellulaire et participe à la PCD médiée par NO en réponse à une interaction avec l'effecteur AvrRpm1 de *P. syringae* pv. *maculicola* (Clarke et al. 2000). Fait intéressant, un autre de ces interactants potentiels, NODULIN-RELATED PROTEIN 1, est rapporté comme nécessaire dans la résistance contre *Pst* DC3000 par la détection de AvrRpm1 (Pan et al. 2016). À l'instar de Mlp52166, ces homologues spécifiques au mélèze, Mlp72983 et Mlp86274 localisent tous deux au chloroplaste. Mlp86274 semble altérer la distribution de la chlorophylle dans le corps chloroplastique (Figure 3.5) et Mlp72983 colocalise avec la protéine SWIB6 caractéristique des nucléoïdes chloroplastiques (Figure 3.5). Comme abordé dans la partie 4.1 de cette discussion, Mlp72983 a été localisée au chloroplaste dans des lignées transgéniques stables de *A. thaliana* (Germain et al. 2018). Pourtant, les figures 3.4 et 3.5 et l'Annexe F illustrent une localisation aux nucléoïdes chloroplastiques, mais aussi au noyau. Sa localisation nucléaire est notamment appuyée par la prédition pour Mlp72983 d'un signal de localisation nucléaire (NLS) (Figure 4.2). Précédemment, des CSEPs comme Mlp109567 et Mlp124530 ont été localisées au noyau sans pour autant porter de motif NLS identifié par l'outil NLStradamus (Nguyen Ba et al. 2009, Petre et al. 2015). Les localisations particulières de Mlp72983 ont généré la mise en œuvre d'un second projet doctoral mené par l'étudiante Snehi Gazal. Ce projet a d'ores et déjà conduit à la production de peupliers transgéniques stables (717 1B4) exprimant la construction Mlp72983::eGFP (pK7FWG2). Les observations foliaires de deux lignées indépendantes ont révélé que Mlp72983 accumulait uniquement dans les chloroplastes des cellules de garde de l'épiderme. Curieusement, dans les cellules du mésophylle, type cellulaire où Mlp72983 est fortement retrouvé, c'est uniquement dans le noyau que ce dernier est présent (Hacquard et al. 2010, Joly et al. 2010). Cette variabilité de localisation subcellulaire dépendamment du type cellulaire n'a, jusqu'à présent, jamais été rapporté pour une CSEP dans le domaine de la biologie végétale. Chez les mammifères quelques protéines présentent cette caractéristique. Pour exemple, la SERINE/THREONINE TANK-BINDING KINASE (TBK) a été observée dans les mitochondries de lignées HeLa

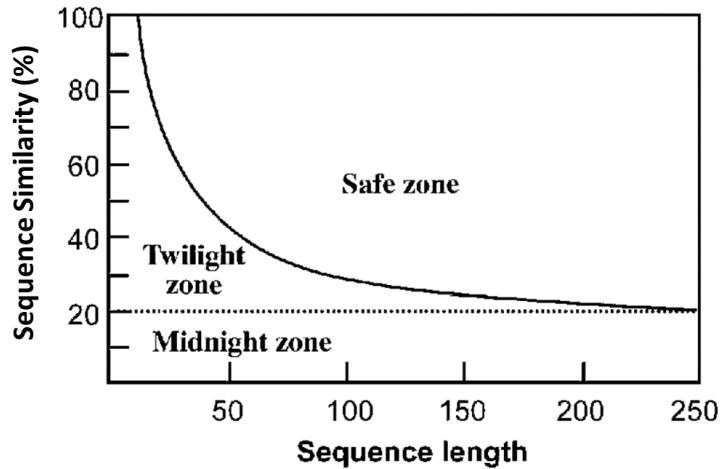
(Henrietta Lacks, cellules cancéreuses du col de l'utérus), mais se retrouve dans le cytoplasme des lignées RAW264.7 (macrophages de souris) dans un contexte de stress viral (Suzuki et al. 2013). Les chloroplastes de l'épiderme et du mésophylle diffèrent par leurs morphologies, mais aussi par leurs réponses au stress. En effet, une surexposition à la lumière ou une infiltration de sucre va induire chez les chloroplastes de l'épiderme une forte induction de stromules comparativement à ceux du mésophylle (Barton et al. 2018). En ce sens, les localisations chloroplastiques et nucléaires de Mlp72983 représentent une avenue d'étude aux forts potentiels. Comme illustré dans la figure 4.2, Mlp72983 est prédicté pour porter un domaine de liaison à l'ADN. Cependant, le criblage par système du double hybride de la levure contre le protéome de mélèze sain a révélé quelques interactants candidats comme la protéine DEAD-BOX ATP-DEPENDANT RNA HELICASE 22 (RH22). Cette protéine chloroplastique est rapportée pour réguler la croissance, mais aussi, la biogénèse des ribosomes chloroplastiques (Chi et al. 2012). Mlp72983 est aussi la CSEP HSH la plus caractérisée par la littérature. En ce sens, Germain et al. (2018) ont rapporté que Mlp72983 augmentait la susceptibilité de *A. thaliana* au oomycète *Hyaloperonospora arabidopsis* (Germain et al. 2018). De plus, Dos Santos et al. (2021) ont observé que Mlp72983 réprime l'expression des gènes reliés à la défense WRKY33, PR1, RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS (RBOHD) et PDF1a/b/c et limite l'accumulation de composés phénoliques (Dos Santos et al. 2021). Fait intéressant, l'expression de WRKY33 est dérégulée lors d'une interaction Robusta-MlpE4 (Chen et al. 2019). Aussi, ce FT fait partie d'une famille fortement impliquée dans le système de signal rétrograde chloroplastique et mitochondrial (Van Aken et al. 2013, Wurzinger et al. 2018). Finalement, Mlp72983, tout comme son homologue spécifique au mélèze, Mlp86274, démontre une capacité à induire des stromules indépendamment à EDS1, mais dépendante à NRG1. Aucun effecteur n'a été rapporté avec de telles caractéristiques. Finalement le dernier membre de ce trio est Mlp86274. Spécifique au mélèze, 13 des 23 interactants potentiels issus du transcriptome du mélèze ne sont malheureusement pas caractérisés. Cependant, six sous-unités ribosomales et deux protéines en amont des PSII et PSI, CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN, ont été identifiées. Aussi, les observations microscopiques évoquent une distribution anormale de la chlorophylle dans le corps chloroplastique

(Figure 3.5, panneau F). Les thylakoïdes ont déjà été rapportés comme la cible du nécrotrophe *Alternaria brassicicola* (Macioszek et al. 2020). Cette particularité dans l’organisation spatiale de la chlorophylle ainsi que les interactants potentiels identifiés conduisent à l’hypothèse que Mlp86274 semble être proche des thylakoides ou se lie à des molécules ancrées aux membranes des grana.

En somme, les CSEPs HSH de la famille 7 présentent des localisations et une majorité d’interactants potentiels distincts. Malgré tout, l’ensemble de ces protéines partagent un minimum de 55,9 % de similarité ainsi que certains interactants communs. Ne partageant pas le plus haut taux de similarité (58,7 %) ainsi qu’une spécificité d’hôte différente, c’est pourtant Mlp52166 et Mlp86274 qui partagent le plus d’interactants potentiels en communs. Un constat identique est fait quant à l’induction de stromules. Ce sont Mlp72983 et Mlp86274, avec 55,9 % de similarité qui présentent un schéma commun d’induction indépendant à EDS1 et dépendant à NRG1. Dernièrement, Dos Santos et al. 2021 ont justement émis une nuance sur les similarités de séquences qui n’impliquaient pas systématiquement des fonctions similaires (Dos Santos et al. 2021).

#### 4.6 Mise en relief de la notion d’homologie

Fondamentale à la présente recherche, il est nécessaire d’approfondir la notion d’homologie qui s’inscrit dans des phénomènes dynamiques évolutifs. Il est possible de distinguer les notions de similarité et d’homologie. Lorsque la première quantifie en pourcentage l’identité des résidus et les longueurs des séquences comparées, la seconde renseigne sur la probabilité selon laquelle deux séquences découleraient d’une séquence commune (Rost 1999). Ainsi, un haut taux de similarité entre deux protéines d’un même organisme peut contribuer à valider l’hypothèse d’homologie. L’ensemble des paires de CSEPs identifiées partagent des taux de similarité supérieur à 55 % sur des séquences de plus de 100 acides aminés (Tableau 3.1). En se rapportant à la figure 4.3, l’ensemble des paires sélectionnées se retrouvent donc dans la *Safe zone* ce qui illustre de fortes probabilités d’homologie (Xiang 2006).



**Figure 4.3** Trois zones pour distinguer le niveau de confiance quant à l'homologie entre deux séquences.

La relation d'homologie entre deux protéines s'établit sur le taux de similarité d'une séquence d'une longueur donnée. Une relation d'homologie est probable lorsque le point se retrouve dans la *Safe zone*. Elle est moins probable dans la *Twilight zone*. Finalement, une relation d'homologie ne peut être prouvée si le pourcentage de similarité est inférieur à 20 % se retrouve dans la *Midnight zone*. Figure issue de (Xiang 2006).

Ces notions d'homologies de séquence ont, depuis quelques années, été complétées avec les notions d'homologies structurelles et fonctionnelles (Rogers et al. 2017, Bentham et al. 2018, Van Bel et al. 2018, Simoncini et al. 2019, Julian et al. 2021). En ce sens, les études d'induction de stromules sur des plantes *N. benthamiana* sauvages et ces mutants ont présenté des profils d'induction particuliers. N'induisant pas (Famille 1), dépendamment à *EDS1* (Famille 33 et 51) ou à *NRG1* (Famille 7) chacune des CSEPs d'une même famille partage généralement un même profil d'induction malgré leurs localisations cellulaires et leurs potentiels interactants différents. Ce constat pourrait être le résultat de l'activation d'une même cascade de détection par l'hôte modèle (homologie de structure) ou celui d'une homologie d'action sur le métabolisme de l'hôte par les CSEPs d'une même famille (homologie structurelle et/ou fonctionnelle).

L'identification de protéines homologues permet de retracer les phénomènes de divergence apparus dans le passé. Comme expliqué dans la partie 1.3.6 du chapitre I, cette dernière a pu être induite par les pressions de sélection régissant les relations

hôtes-pathogène vers des mutations aux *fitness* favorables à la survie de la population de *Mlp*. Toutefois, de nouvelles études indiquent que les phénomènes de convergence évolutive présentent une occurrence supérieure à ce qui a été établi par la communauté scientifique antérieure (Blount et al. 2018). Ainsi, même si cette étude de paires de protéines similaires s'effectue au sein d'un même organisme, la thèse d'une convergence de séquence ne peut être complètement exclue. Divergence ou convergence, ces dynamiques évolutives à l'œuvre sur de tels effecteurs candidats partagent l'indication que leurs rôles s'imbriquent en des points décisifs du mécanisme d'infection. Rappelons que la biotrophie obligatoire de *Mlp* y ajoute une pression sélective supplémentaire.

#### 4.7 Le chloroplaste semble être une cible de choix pour les CSEPs HSH

Parmi les neuf CSEPs caractérisées ici, six d'entre elles présentent des localisations uniques ou partielles au chloroplaste. D'ailleurs, trois d'entre elles localisent précisément aux nucléoïdes chloroplastiques (Mlp123281, Mlp51690 et Mlp72983). Une telle proportion est relativement surprenante. En effet, lors des premiers criblages des CSEPs de *Mlp* seulement trois CSEPs sur 40 présentaient une telle localisation (Petre et al. 2015, Germain et al. 2018). De plus, aucun d'entre elles ne portent de peptide de transit identifié par la littérature. Aussi, l'alignement de ces six CSEPs ne révèle pas de motifs communs (résultats non montrés). Ces constats appuient, tout d'abord, l'hypothèse de l'existence d'une diversité de mécanismes de translocation chloroplastique empruntés par des protéines exogènes de l'hôte (Petre et al. 2016). Ensuite, les critères de criblage de cette recherche (considération des notions de pression de sélection entre ces trois organismes) semblent placer le chloroplaste comme une organelle d'importance dans le déroulement du processus infectieux. Cette indication corrobore avec l'accumulation d'études qui attribuent à cette organelle photosynthétique des fonctions dans la détection, le déclenchement et la coordination de l'immunité végétale (Caplan et al. 2015, Erickson et Schattat 2018, Kumar et al. 2018, Prautsch et al. 2021). Comme cité dans la partie 1.2.2.2 du chapitre I, avec l'exemple de l'effecteur XopQ, la localisation chloroplastique d'un effecteur candidat n'est pas conditionnelle à l'induction de stromule

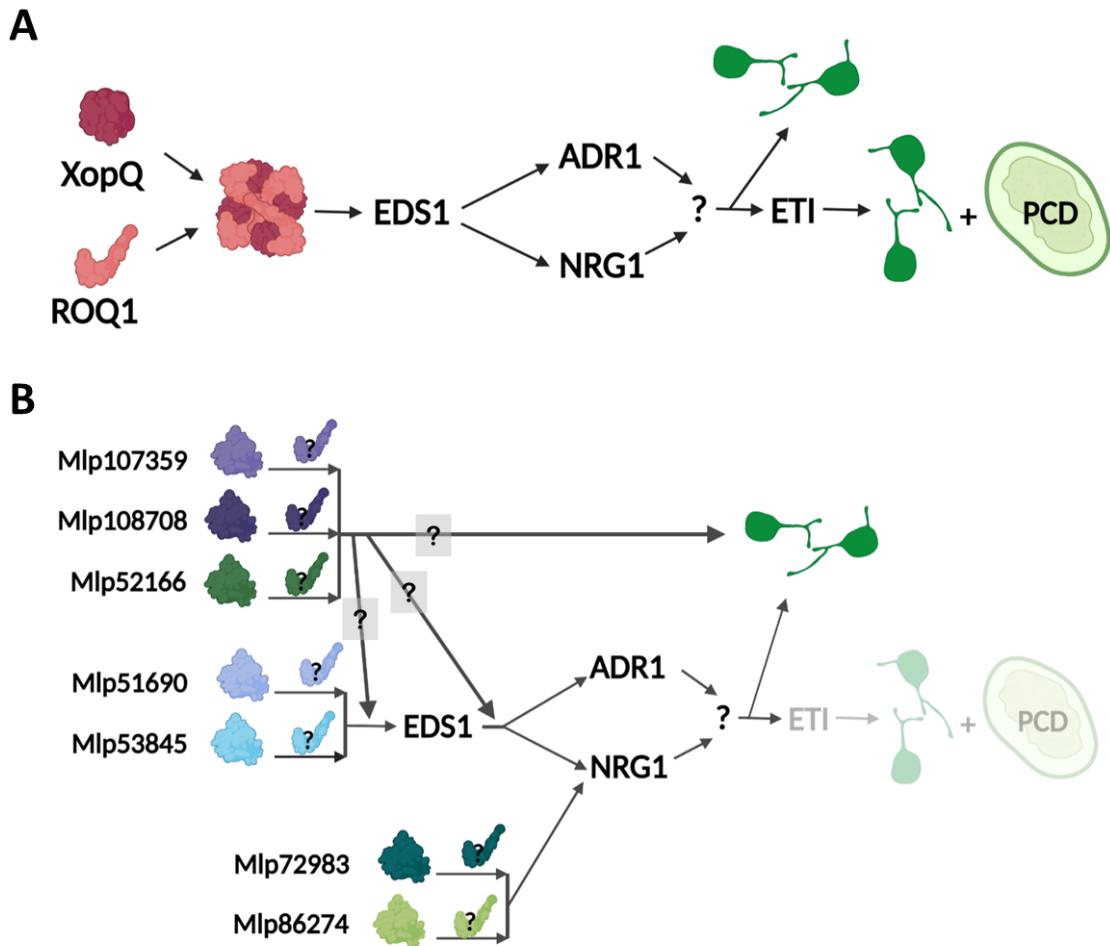
(Erickson et Schattat 2018, Prautsch et al. 2021). Les résultats apportés confirment cette observation. Les familles 33, 51 et 7 induisent des stromules. Cependant, *Mlp53845::eGFP*, *Mlp108708::eGFP* et *Mlp52166::eGFP* n'y localisent pas. À l'inverse, la localisation dans les nucléoides chloroplastiques de *Mlp123281::eGFP* n'induit pas de stromule.

Cette étude s'inscrit donc dans un constat de plus en plus partagé dans la littérature quant à l'importance de plus en plus évidente du rôle chloroplastique dans l'interaction plante-microorganisme. Ce travail offre de nouveaux outils d'étude (les CSEPs) et apporte aussi de nouveaux éléments quant à l'articulation d'une/des cascades d'induction des stromules.

#### **4.8 Une avancée quant à la caractérisation de l'induction biotique des stromules**

L'utilisation d'effecteurs comme outils pour parfaire les connaissances et l'étude de phénomènes cellulaires et moléculaires est de plus en plus fréquente (Erickson et al. 2018, Prautsch et al. 2021). Le produit de ces recherches mène, non seulement, à l'approfondissement des connaissances quant aux CSEPs sécrétées par *Mlp* mais aussi à l'approfondissement des cascades d'induction de stromules. En ce sens, XopQ est l'effecteur le plus caractérisé par la littérature actuellement (Sinha et al. 2013, Schultink et al. 2017, Martin et al. 2020, Prautsch et al. 2021). Comme rapporté dans la figure 1.8, celui-ci induit des stromules par le biais de sa reconnaissance par la NLR ROQ1. À l'interaction avec XopQ, ROQ1 forme un complexe tétramérique qui va déclencher l'hydrolyse de NAD et activer les cascades de réponse de l'ETI et induire la HR (Martin et al. 2020). La délétion de *EDS1* va réduire drastiquement l'induction de stromules et inhiber le déclenchement de la HR (Adlung et Bonas 2017). Cet effecteur bactérien a été utilisé à titre de contrôle positif dans les essais d'induction rapportés dans la partie 4 du chapitre III. La figure 3.7 illustre que la délétion de *EDS1*, inhibe la réaction d'hypersensibilité et réduit fortement l'induction de stromules par XopQ::mOrange. Ces constats font écho aux observations déjà rapportées par (Erickson et al. 2018) et (Prautsch et al. 2021).

Aucun des CSEPs HSH n'induit de réaction d'hypersensibilité lors de l'agroinfiltration chez NbFNR::eGFP\_WT, NbFNR::eGFP\_eds1 et NbFNR::eGFP\_nrg1-4/5 comme il est possible de la voir dans les panneaux A des figures 3.6, 3.7 et 3.8 et l'Annexe C. De légères chloroses peuvent être visibles chez NbFNR::eGFP\_WT pour Mlp104486::eGFP, Mlp123281::eGFP, Mlp51690::eGFP, Mlp53845::eGFP, et Mlp108708::eGFP, mais celles-ci semblent d'une intensité similaire à celles obtenues lors de l'agroinfiltration du contrôle négatif mOrange. Afin de prévenir les biais de délétion de *NRG1*, le comptage a été effectué sur deux lignées indépendante *nrg1*. Les inductions de stromules chez la lignée NbFNR::eGFP\_nrg1-5 sont rapportées en Annexe C. Les comptages effectués sur les deux lignées *nrg1* conduisent aux mêmes conclusions : la réaction d'hypersensibilité de XopQ::mOrange est inhibée, l'induction de XopQ::mOrange est fortement réduite, mais aussi, et surtout, les inductions de Mlp72983::eGFP et Mlp86274::eGFP ne sont plus significativement différentes des contrôles AIM et mOrange. Les impacts de la délétion de NRG1 sur XopQ observées sont identiques à ceux publiés récemment par (Prautsch et al. 2021). La délétion du gène *NRG1* induit une réduction d'induction de stromules significative pour l'ensemble des comptages effectués, exceptés le contrôle AIM. Ainsi, il est possible de distinguer le biais d'induction par la présence de *A. tumefaciens* GV3101 pMP90 et de l'expression de la protéine fluorescente mOrange. À l'image la figure 1.8, les résultats de cette étude peuvent être rassemblés sous la forme la figure 4.4.



**Figure 4.4** Les CSEPs HSH induisent des stromules par le biais de nouvelles voies.

**A.** La reconnaissance de XopQ par ROQ1 va induire des stromules ainsi que la HR par la voie EDS1/NRG1-ADR1. **B.** Les CSEPs de la famille 33, Mlp51690 et Mlp53845, induisent des stromules uniquement par le biais de EDS1. Les CSEPs de la famille 51, Mlp107359 et Mlp108708 ainsi que Mlp52166, de la famille 7, induisent des stromules de façon partiellement dépendante à EDS1. L’activation de la cascade d’induction pourrait alors être en aval de EDS1 ou par le biais d’une autre cascade encore non identifiée. Finalement, les deux autres CSEPs de la famille 7, Mlp72983 et Mlp86274 induisent des stromules par le biais de NRG1 et indépendamment de EDS1. L’ensemble des mécanismes d’induction empruntés n’induisent pas la HR. Figure inspirée de (Prautsch et al. 2021).

Ces derniers apportent plusieurs nouvelles indications sur le processus d’induction des stromules. Tout d’abord, Mlp72983 et Mlp86274 représentent les premiers inducteurs de stromules complètement indépendant de EDS1. En revanche, ces derniers se distinguent

de XopQ concernant leurs dépendances complètes à NRG1 (Prautsch et al. 2021). Ceci énonce la possibilité de l'action d'une autre protéine dans la cascade d'induction de stromules ou bien sûr un mécanisme d'induction des stromules en aval de EDS1 convergeant vers NRG1. Finalement, ces résultats indiquent que l'induction de stromules n'implique pas obligatoirement le déclenchement de la HR.

Avant de conclure, certaines nuances techniques et fonctionnelles doivent être citées. Tout d'abord, pour des raisons techniques, la majorité des études conduites sur les stromules sont menées dans l'épiderme. Cependant, les comportements et dynamiques des chloroplastes de l'épiderme et du mésophylle peuvent être distincts face à un même stress (Brunkard et al. 2015, Exposito-Rodriguez et al. 2017). Il est donc nécessaire de prendre en compte la nature du tissu dans lequel les comportements chloroplastiques sont étudiés ainsi que le contexte et les types cellulaires dans lesquels les interactions hôte-pathogène ont réellement lieu. Ensuite, la caractérisation du mécanisme d'induction des stromules en est encore à ses balbutiements. Aussi, étant donné la nature et le contexte de sécrétion des CSEPs employées pour l'étude, il est possible que les structures et les raffinements des mécanismes d'induction de stromules divergent entre les plantes modèles *N. benthamiana* ou *A. thaliana* et les plantes pérennes telles que le peuplier et le mélèze.

## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

#### 5.1 Conclusion

La propagation de pathogènes dans de nouveaux environnements n'est pas chose nouvelle (Jones et Baker 2007, Brasier 2008). Catalysée par les échanges économiques mondiaux en perpétuels croissance, l'introduction de nouveaux phytopathogènes dans un environnement propice à une propagation incontrôlée est de plus en plus fréquente (Brasier et Webber 2010). L'étude des interactions inter-organismes, s'intéressant notamment aux pathogènes, représente donc un vaste domaine de recherche aux enjeux incontournables dans un contexte d'accroissement de populations mondiales et de changements climatiques. Les pathogènes fongiques ont régulièrement influencé le cours de l'histoire ou les comportements sociaux (Gullino 2021). La nature d'une interaction plante-microorganisme résulte d'un assemblage de stimuli perçus et de cascades de signaux induits. Longtemps restreint à sa fonction photosynthétique, le chloroplaste se dote de nombreuses autres fonctions essentielles au maintien physiologique cellulaire mais aussi dans la détection et les réponses aux stress abiotiques comme biotiques. Par ailleurs, sa capacité à produire des extensions membranaires, nommées stromules, représente une avenue fonctionnelle prometteuse dans la transmission de signaux rétrogrades. De plus, le chloroplaste est la cible de nombreux effecteurs de pathogènes viraux, bactériens ou fongiques. Regroupant plus de 8 000 espèces, les Rouilles représentent la plus importante famille de pathogènes fongiques et causent de nombreux dommages chaque année sur des cultures de grands champs comme dans les forêts tempérées (Lorrain et al. 2018). *Mlp* est l'agent biotrophe qui cause la Rouille du peuplier. Pour accomplir son cycle de reproduction, il doit accomplir des cycles de parasitisme sur un mélèze pour son cycle sexuel et sur un peuplier pour son cycle végétatif. La notion de spécialisation à l'hôte d'un pathogène est de plus en plus répandue dans la communauté

scientifique (Schwartz et al. 2015, Petre et al. 2020). Optimisant la manipulation de l'hôte, la réorientation des nutriments ou le maintien de l'homéostasie du pathogène, cette spécialisation à l'hôte semble contribuer au succès de survie du pathogène. Cette spécialisation a été identifiée par la distinction de groupes de petites protéines effectrices candidates (Candidate Secreted effector Protein, CSEP) exprimée différemment en fonction de l'hôte infecté (Lorrain et al. 2018). Depuis l'annotation des 1184 CSEPs de *Mlp*, deux campagnes de criblages et d'étude de groupe spécifique de CSEPs ont été menées (Petre et al. 2015, Germain et al. 2018). Ces deux premiers étaient basés uniquement sur les profils transcriptomiques de *Mlp* en interaction avec le peuplier. Dernièrement, les transcriptomes de *Mlp* au cours de l'infection du mélèze ont été révélés. Ce travail représente donc la première campagne qui se base sur des critères de criblage englobant les transcriptomes de *Mlp* dans le cadre des deux types d'interactions. Afin d'identifier les points clés du mécanisme d'infection, nous nous sommes intéressés aux profils d'effecteurs candidats potentiellement en transition évolutive motivée par les pressions de sélection appliquées par les mécanismes de défense de chacun des hôtes. Le processus de criblage de cette recherche a ainsi identifié des paires de CSEPs homologues présentant des profils d'expression opposés : des paires de CSEPs avec des spécificités d'expression à l'hôte (homologue et spécifique à l'hôte, HSH).

La présente étude a donc répondu à l'objectif 1 en identifiant neuf CSEPs aux profils HSH. Ces derniers offrent de nouvelles avenues d'études quant aux mécanismes que *Mlp* empreinte lors de ses processus infectieux. En remplissant l'objectif 2, il est maintenant possible d'enrichir le portrait des localisations subcellulaires potentiellement ciblées par *Mlp*. S'ajoutant aux effecteurs CTP1, CTP2 et *Mlp124111*, les effecteurs *Mlp123281*, *Mlp51690*, *Mlp107359*, *Mlp72983* et *Mlp86274* gonflent la liste des localisations chloroplastiques partielles ou complètes. Aussi, *Mlp107359*, *Mlp108708* s'adjoignent à *Mlp124357* présentant une localisation dans le système endomembranaire. De plus, les listes d'interactants potentiels pour six d'entre eux permettent d'orienter les futures investigations. Cependant, ces interactions devront être confirmées à l'aide une seconde méthode d'étude d'interaction protéine-protéine.

Parmi les six CSEPs HSH chloroplastique, trois d'entre elles localisent précisément aux nucléoïdes. Une telle proportion est surprenante. De plus, sept des CSEPs HSH présentent des profils d'induction de stromules par le biais de voies dépendantes à *EDS1*, partiellement indépendante à *EDS1* et dépendante à *NRG1*. En complétant l'objectif 3, cette recherche apporte des résultats qui s'inscrivent donc dans un constat de plus en plus partagé par la communauté scientifique quant à l'importance du rôle chloroplastique dans l'interaction plante-microorganisme.

Aux vues de l'ensemble des résultats apportés, les effecteurs Mlp123281, Mlp51690, Mlp107359, Mlp108708, Mlp72983 et Mlp86274 sont respectivement proposés pour être renommés Chloroplastic nucleoid Targeted Protein 1 (CnTP1), Chloroplastic nucleoid Targeted Protein 33 (CnTP33), Membrane and Chloroplast Targeted Protein 51 (MCTP51), Membrane Traffic Targeted Protein 51 (MTTP51), Chloroplastic nucleoid Targeted Protein 7 (CnTP7) et Chloroplastic Targeted Protein 7 (CTP7).

Pour finir, les contributions des travaux de ce projet de recherche enrichissent deux domaines interreliés.

Tout d'abord, l'étude d'un pathogène responsable de nombreuses pertes sylvicoles est la première étape pour maîtriser à long terme les dommages qu'il provoque. La mise en lumière d'étapes clés des mécanismes d'infection de *Mlp* entre ces deux hôtes contribue à une meilleure compréhension du pathosystème et permettra, *in fine*, d'élaborer des cultivars davantage résistants et résilients. Ces mécanismes clés pourraient aussi partager certaines homologies avec les processus d'infection déployés par d'autres membres de la famille des rouilles, offrant, ainsi, des avenues de solutions pour plus d'un pathogène.

Finalement, ce projet apportera de nouvelles connaissances fondamentales quant à/aux cascades d'induction des stromules en contexte de réponse immunitaire spécifique aux effecteurs. La littérature actuelle s'accorde sur le potentiel réel du chloroplaste et des stromules dans les mécanismes de défense et la coordination inter-organelle chez les végétaux. En revanche, comme souligné par Savage et al 2021., la limitation actuelle dans

l'étude des stromules est un manque d'inducteurs et de suppresseurs de ce mécanisme. En ce sens, cette étude fournit sept nouveaux inducteurs présentant trois schémas d'induction distincts sans induire de HR (possibilité d'observer à long terme le phénomène et ces conséquences). La caractérisation de ces effecteurs, utilisés dans ce cas comme des outils d'études fondamentales, auront alors une portée bien plus vaste sur la compréhension des schémas de défense chez les plantes.

## 5.2 Perspectives

Commun à l'ensemble des études scientifiques, les résultats apportés par ces travaux ouvrent de nombreuses avenues d'études possibles. Ci-dessous sont cités les points expérimentaux à court et long terme permettant d'approfondir les hypothèses qui représentent les plus hauts potentiels d'intérêts.

### 5.2.1 Avenues à court terme

Tout d'abord, le criblage par le système du double hybride chez la levure a débuté le processus d'étude de potentiels interactants pour Mlp104486, Mlp123286, Mlp53845, Mlp52166, Mlp72983 et Mlp86274. Afin de cheminer dans le processus de caractérisation de ces derniers, ces interactions doivent être confirmées par au moins une autre technique d'étude d'interaction protéine-protéine. Les constructions CSEP::FLAG et Interactant::HA ont déjà été clonées, la **confirmation d'interaction par coimmunoprécipitation et immunobuvardage** sera donc prochainement réalisée. Du même temps, les **hypothèses d'interaction à l'ADN** des CSEPs Mlp104486, Mlp123281, Mlp51690 et Mlp72983 pourraient être explorées par ChIP (Furey 2012).

Aussi, des observations de colocalisations pourraient contribuer à préciser les localisations de certaines CSEPs. La **confirmation d'une proximité de Mlp107359 avec le réseau endomembranaire** nécessiterait la répétition d'essais de colocalisation avec les marqueurs employés pour son homologue Mlp108708. D'autre part, une étude de **colocalisation entre Mlp72983 et le marqueur spécifique aux Cajal bodies**, RFP-FIB2,

pourrait préciser la nature des corps nucléaires observés (Robin et al. 2018). Dans le même élan, une **précision de la localisation chloroplastique de Mlp86274**, quant à sa possible localisation aux membranes internes du chloroplaste pourrait être éprouvée par une colocalisation avec la protéine MGD1, enzyme clé de la synthèse des acides gras qui est associée à la membrane interne du chloroplaste (Rast et al. 2015).

Poussées par les diverses pressions de sélections, les CSEPs présentent une plus grande propension à l'intégration de SNPs. Cependant, ces polymorphismes ne sont pas les seuls moteurs forgeant la spécificité d'hôte d'un pathogène. Des phénomènes de transferts horizontaux de gènes ou même de tronçons de chromosomes ont été mis en lumière dans le processus de spécificité d'hôte. Ainsi, **étudier la localisation génomique des gènes codant pour des CSEPs en prenant en compte la spécificité d'hôte** pourrait explorer les mécanismes en lien avec leurs profils d'expression spécifique et leurs régulations (Li et al. 2020).

D'autres part, le cas des localisations de Mlp72983 met en évidence la limitation des plantes modèles. Ainsi, une avenue à court-moyen terme serait de **confirmer chacune des localisations subcellulaires des CSEPs HSH** par la production de lignées mutantes du peuplier INRA 717-1-B4 (*P. alba x P. tremula*) exprimant chacune des CSEPs HSH.

Finalement, l'étude des cascades impliquées dans l'induction de stromule pourrait être approfondie avec les sept CSEPs inductrices. Des comptages d'induction de stromules sur des *N. benthamiana* dépourvues des protéines ROQ1, ADR1 ou sur de doubles mutants (*eds1 adr1*) pourraient détailler cette cascade (Prautsch et al. 2021).

### 5.2.2 Avenues à long terme

Les **processus impliqués dans les translocations des effecteurs** du pathogène à l'hôte, mais aussi dans les compartiments subcellulaires de l'hôte restent encore des questions en suspens. L'identification puis la caractérisation de plus en plus de CSEPs accroît d'autant plus les chances de pouvoir découvrir des acteurs issus de l'hôte ou du pathogène

impliqués dans ces phénomènes. Petre et al. 2016 se sont consacrés à la question de la translocation vers le chloroplaste (Petre et al. 2016). Malgré tout, de nombreux mécanismes inconnus sont suspectés d'être impliqués. Ainsi, les caractérisations approfondies de la diversité de CSEPs chloroplastiques exemptes de peptide de transit comme Mlp123281, Mlp51690, Mlp107359, Mlp72983 et Mlp86274 pourraient contribuer à identifier ces mécanismes.

Comme soulevé par (Dos Santos et al. 2021), la similarité de séquence présente certaines limitations dans la prédiction fonctionnelle des CSEPs. Celle-ci se doit d'être combinée à une étude d'homologie structurelle. Pour cela, la **résolution des structures de davantage de CSEPs** apporterait de nombreuses précisions et/ou de solides confirmations quant aux fonctions remplies par ces dernières. Jusqu'à présent seulement Mlp124266 et Mlp124017 ont vu leurs structures résolues chez *Mlp* (Ortiz et al. 2022). Des techniques comme la cristallisation ou la cryo-microscopie électronique ont déjà été employées dans la résolution structurelle de protéines (Bonomi et Vendruscolo 2019).

Enfin, l'élucidation des transcriptomes de *Mlp* dépendamment de l'hôte ciblé permet de restreindre le nombre de CSEPs réalisant le processus d'infection (94 CSEPs spécifiques au peuplier et 92 CSEPs spécifiques au mélèze). Combiné à une analyse transcriptomique recoupant des périodes plus courtes du processus d'infection, la dynamique précise de sécrétion de ces CSEPs permettrait de sélectionner des groupes de taille techniquement acceptable pour **débuter l'étude des potentiels phénomènes de synergie entre les CSEPs**.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adlung, N. and U. Bonas (2017). "Dissecting virulence function from recognition: cell death suppression in *Nicotiana benthamiana* by XopQ/HopQ1-family effectors relies on EDS 1-dependent immunity." *The Plant Journal* **91**(3): 430-442.
- Ahmed, M. B., K. C. G. d. Santos, I. B. Sanchez, B. Petre, C. Lorrain, M. B. Plourde, S. Duplessis, I. Desgagné-Penix and H. Germain (2018). "A rust fungal effector binds plant DNA and modulates transcription." *Scientific reports* **8**(1): 1-14.
- Aime, M. C., A. R. McTaggart, S. J. Mondo and S. Duplessis (2017). "Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi." *Advances in genetics* **100**: 267-307.
- Allen, J. F., W. B. de Paula, S. Puthiyaveetil and J. Nield (2011). "A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis." *Trends in plant science* **16**(12): 645-655.
- An, Y., Y. Zhou, X. Han, C. Shen, S. Wang, C. Liu, W. Yin and X. Xia (2020). "The GATA transcription factor GNC plays an important role in photosynthesis and growth in poplar." *Journal of experimental botany* **71**(6): 1969-1984.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W.-L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel and J. Sheen (2002). "MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity." *Nature* **415**(6875): 977-983.
- Avelino, J., H. Zelaya, A. Merlo, A. Pineda, M. Ordóñez and S. Savary (2006). "The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations." *Ecological modelling* **197**(3-4): 431-447.
- Azaiez, A., B. Boyle, V. Levée and A. Séguin (2009). "Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(2): 190-200.
- Barajas-López, J. d. D., D. Kremnev, J. Shaikhali, A. Piñas-Fernández and Å. Strand (2013). "PAPP5 is involved in the tetrapyrrole mediated plastid signalling during chloroplast development." *PloS one* **8**(3): e60305.
- Barea, J., G. Andrade, V. Bianciotto, D. Dowling, S. Lohrke, P. Bonfante, F. O'gara and C. Azcon-Aguilar (1998). "Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens." *Applied and environmental microbiology* **64**(6): 2304-2307.

Barton, K. A., M. R. Wozny, N. Mathur, E.-A. Jaipargas and J. Mathur (2018). "Chloroplast behaviour and interactions with other organelles in *Arabidopsis thaliana* pavement cells." *J Cell Sci* **131**(2): jcs202275.

Baslam, M., K. Oikawa, A. Kitajima-Koga, K. Kaneko and T. Mitsui (2016). "Golgi-to-plastid trafficking of proteins through secretory pathway: insights into vesicle-mediated import toward the plastids." *Plant Signaling & Behavior* **11**(9): e1221558.

Bauer, R., E.-M. Wenzig, C. Franz, B. Stefanon, E. Tzika, S. Kyriakis, M. Farinacci and S. Sgorlon (2009). Use larch wood material for treating inflammation, Google Patents.

Baynes, M., G. Newcombe, L. Dixon, L. Castlebury and K. O'Donnell (2012). "A novel plant-fungal mutualism associated with fire." *Fungal Biology* **116**(1): 133-144.

Béchard-Dubé, S.-A. (2015). Effets de l'environnement lumineux et de l'âge foliaire sur la croissance, la capacité photosynthétique et la production protéique chez Nicotiana benthamiana, Université Laval.

Bellucci, M., F. De Marchis and A. Pompa (2018). "The endoplasmic reticulum is a hub to sort proteins toward unconventional traffic pathways and endosymbiotic organelles." *Journal of Experimental Botany* **69**(1): 7-20.

Beltrán, J., Y. Wamboldt, R. Sanchez, E. W. LaBrant, H. Kundariya, K. S. Virdi, C. Elowsky and S. A. Mackenzie (2018). "Specialized plastids trigger tissue-specific signaling for systemic stress response in plants." *Plant Physiology* **178**(2): 672-683.

Benjamin, D. (2013). "La vie de Néron, Paragraphes VIII à X-Suetone: Premières mesures du jeune empereur." Publications Pimido.

Bennett, A. E. and K. Grotel (2022). "The Costs and Benefits of Plant–Arbuscular Mycorrhizal Fungal Interactions." *Annual Review of Plant Biology* **73**.

Bennett, J. and R. Bentley (1999). "Pride and prejudice: the story of ergot." *Perspectives in biology and medicine* **42**(3): 333-355.

Bentham, A. R., R. Zdrzałek, J. C. De la Concepcion and M. J. Banfield (2018). "Uncoiling CNLs: Structure/function approaches to understanding CC domain function in plant NLRs." *Plant and Cell Physiology* **59**(12): 2398-2408.

Bernoux, M., T. Timmers, A. Jauneau, C. Briere, P. J. de Wit, Y. Marco and L. Deslandes (2008). "RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector." *The Plant Cell* **20**(8): 2252-2264.

Bettgenhaeuser, J., B. Gilbert, M. Ayliffe and M. J. Moscou (2014). "Nonhost resistance to rust pathogens—a continuation of continua." Frontiers in plant science **5**: 664.

Blanco, N. E., M. Guinea-Díaz, J. Whelan and Å. Strand (2014). "Interaction between plastid and mitochondrial retrograde signalling pathways during changes to plastid redox status." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **369**(1640): 20130231.

Block, A., T. Y. Toruño, C. G. Elowsky, C. Zhang, J. Steinbrenner, J. Beynon and J. R. Alfano (2014). "The *P. syringae* type III effector H op D 1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the *A. thaliana* transcription factor NTL 9." New Phytologist **201**(4): 1358-1370.

Blount, Z. D., R. E. Lenski and J. B. Losos (2018). "Contingency and determinism in evolution: Replaying life's tape." Science **362**(6415): eaam5979.

Bonomi, M. and M. Vendruscolo (2019). "Determination of protein structural ensembles using cryo-electron microscopy." Current Opinion in Structural Biology **56**: 37-45.

Börner, T., A. Y. Aleynikova, Y. O. Zubko and V. V. Kusnetsov (2015). "Chloroplast RNA polymerases: role in chloroplast biogenesis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1847**(9): 761-769.

Boudsocq, M., M. R. Willmann, M. McCormack, H. Lee, L. Shan, P. He, J. Bush, S.-H. Cheng and J. Sheen (2010). "Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases." Nature **464**(7287): 418-422.

Brasier, C. (2008). "The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants." Plant Pathology **57**(5): 792-808.

Brasier, C. and J. Webber (2010). "Sudden larch death." Nature **466**(7308): 824-825.

Breeze, E. and P. M. Mullineaux (2022). "The Passage of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from Chloroplasts to Their Associated Nucleus during Retrograde Signalling: Reflections on the Role of the Nuclear Envelope." Plants **11**(4): 552.

Bresson, A. (2011). Caractérisation de R1 et Rus: deux loci de résistance à la rouille foliaire sur le chromosome 19 du peuplier, Université d'Évry-Val-d'Essonne.

Brisson, A., C. Letanneur, M. Bisaillon and H. Germain (2019). "Une protéine effectrice, deux organelles différentes!"

Brodo, I. M., S. D. Sharnoff and S. Sharnoff (2001). Lichens of north America, Yale University Press.

Brunkard, J. O., A. M. Runkel and P. C. Zambryski (2015). "Chloroplasts extend stromules independently and in response to internal redox signals." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(32): 10044-10049.

Bueno-Sancho, V., A. Persoons, A. Hubbard, L. E. Cabrera-Quio, C. M. Lewis, P. Corredor-Moreno, D. C. Bunting, S. Ali, S. Chng and D. P. Hodson (2017). "Pathogenomic analysis of wheat yellow rust lineages detects seasonal variation and host specificity." Genome Biology and Evolution **9**(12): 3282-3296.

Busch, F. A., R. F. Sage and G. D. Farquhar (2018). "Plants increase CO<sub>2</sub> uptake by assimilating nitrogen via the photorespiratory pathway." Nature plants **4**(1): 46-54.

Cai, Q., L. Qiao, M. Wang, B. He, F.-M. Lin, J. Palmquist, S.-D. Huang and H. Jin (2018). "Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes." Science **360**(6393): 1126-1129.

Caplan, J. L., A. S. Kumar, E. Park, M. S. Padmanabhan, K. Hoban, S. Modla, K. Czymmek and S. P. Dinesh-Kumar (2015). "Chloroplast stromules function during innate immunity." Developmental cell **34**(1): 45-57.

Carrie, C., K. Kühn, M. W. Murcha, O. Duncan, I. D. Small, N. O'Toole and J. Whelan (2009). "Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*." The Plant Journal **57**(6): 1128-1139.

Cervera, M. T., J. Gusmão, M. Steenackers, J. Peleman, V. Storme, A. Vanden Broeck, M. Van Montagu and W. Boerjan (1996). "Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*." Theoretical and applied genetics **93**(5): 733-737.

Ceulemans, R., I. Impens and V. Steenackers (1987). "Variations in photosynthetic, anatomical, and enzymatic leaf traits and correlations with growth in recently selected *Populus* hybrids." Canadian Journal of Forest Research **17**(4): 273-283.

Chan, K. X., P. A. Crisp, G. M. Estavillo and B. J. Pogson (2010). "Chloroplast-to-nucleus communication: current knowledge, experimental strategies and relationship to drought stress signaling." Plant signaling & behavior **5**(12): 1575-1582.

Chan, K. X., S. Y. Phua, P. Crisp, R. McQuinn and B. J. Pogson (2016). "Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond." Annual review of plant biology **67**: 25-53.

- Chen, Q., J. Wang, D. Li, Z. Wang, F. Wang and R. Zhang (2019). "Molecular characterization of the transcription factors in susceptible poplar infected with virulent *Melampsora laricis-populina*." *International journal of molecular sciences* **20**(19): 4806.
- Chen, W., N. J. Provart, J. Glazebrook, F. Katagiri, H.-S. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou and S. A. Whitham (2002). "Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses." *The plant cell* **14**(3): 559-574.
- Chen, Y., Y. Song, J. Liu, G. Xu and D. Dou (2022). "Ubiquitination of Receptosomes, Frontline of Plant Immunity." *International Journal of Molecular Sciences* **23**(6): 2937.
- Chi, W., B. He, J. Mao, Q. Li, J. Ma, D. Ji, M. Zou and L. Zhang (2012). "The function of RH22, a DEAD RNA helicase, in the biogenesis of the 50S ribosomal subunits of *Arabidopsis* chloroplasts." *Plant Physiology* **158**(2): 693-707.
- Ciuffetti, L. M., V. A. Manning, I. Pandelova, M. F. Betts and J. P. Martinez (2010). "Host-selective toxins, *Ptr ToxA* and *Ptr ToxB*, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction." *New Phytologist* **187**(4): 911-919.
- Clarke, A., R. Desikan, R. D. Hurst, J. T. Hancock and S. J. Neill (2000). "NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures." *The Plant Journal* **24**(5): 667-677.
- Collemare, J., R. O'Connell and M. H. Lebrun (2019). "Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant-fungal interactions." *New Phytologist* **223**(2): 590-596.
- Connors, I. L. (1972). *Plant pathology in Canada*, Canadian Phytopathological Society.
- Crisp, P. A., A. B. Smith, D. R. Ganguly, K. D. Murray, S. R. Eichten, A. A. Millar and B. J. Pogson (2018). "RNA polymerase II read-through promotes expression of neighboring genes in SAL1-PAP-XRN retrograde signaling." *Plant Physiology* **178**(4): 1614-1630.
- D Aljawasim, B., H. M Khaeim and M. A Manshood (2020). "Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) as potential biocontrol agents against damping-off disease *Rhizoctonia solani* on cucumber." *Journal of Crop Protection* **9**(1): 141-147.
- Dabrowski, S. A. and Z. Frenkel (2021). "Diversity and evolution of pathogenesis-related proteins family 4 beyond plant kingdom." *Plant Gene* **26**: 100279.

- Dai, L., D. Wang, X. Xie, C. Zhang, X. Wang, Y. Xu, Y. Wang and J. Zhang (2016). "The novel gene VpPR4-1 from *Vitis pseudoreticulata* increases powdery mildew resistance in transgenic *Vitis vinifera* L." *Frontiers in plant science* **7**: 695.
- Daniell, H. (1999). "New tools for chloroplast genetic engineering." *Nature biotechnology* **17**(9): 855-856.
- De Wit, P. J., A. C. Testa and R. P. Oliver (2016). "Fungal plant pathogenesis mediated by effectors." *Microbiology Spectrum* **4**(6): 4.6. 19.
- Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann and J. Ellis (2012). "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology." *Molecular plant pathology* **13**(4): 414-430.
- Deciduous, A. (2008). "Western Larch."
- Delfosse, K., M. R. Wozny, K. A. Barton, N. Mathur, N. Griffiths and J. Mathur (2018). "Plastid envelope-localized proteins exhibit a stochastic spatiotemporal relationship to stromules." *Frontiers in Plant Science* **9**: 754.
- Deng, Z. and L. Cao (2017). "Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review." *Chemosphere* **168**: 1100-1106.
- Derbyshire, M., M. Mbengue, M. Barascud, O. Navaud and S. Raffaele (2019). "Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance." *Molecular Plant Pathology* **20**(9): 1279-1297.
- Ding, X., T. Jimenez-Gongora, B. Krenz and R. Lozano-Duran (2019). "Chloroplast clustering around the nucleus is a general response to pathogen perception in *Nicotiana benthamiana*." *Molecular plant pathology* **20**(9): 1298-1306.
- Dixon, R. A. (2001). "Natural products and plant disease resistance." *Nature* **411**(6839): 843-847.
- Dong, S., R. Stam, L. M. Cano, J. Song, J. Sklenar, K. Yoshida, T. O. Bozkurt, R. Oliva, Z. Liu and M. Tian (2014). "Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen." *Science* **343**(6170): 552-555.
- Dos Santos, K. C. G., G. Pelletier, A. Séguin, F. Guillemette, J. Hawkes, I. Desgagné-Penix and H. Germain (2021). "Unrelated fungal rust candidate effectors act on overlapping plant functions." *Microorganisms* **9**(5): 996.

- Duplessis, S., C. A. Cuomo, Y.-C. Lin, A. Aerts, E. Tisserant, C. Veneault-Fourrey, D. L. Joly, S. Hacquard, J. Amselem and B. L. Cantarel (2011). "Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(22): 9166-9171.
- Duplessis, S., S. Hacquard, C. Delaruelle, E. Tisserant, P. Frey, F. Martin and A. Kohler (2011). "Melampsora larici-populina transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy." Molecular Plant-Microbe Interactions **24**(7): 808-818.
- Duplessis, S., I. Major, F. Martin and A. Séguin (2009). "Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling." Critical Reviews in Plant Science **28**(5): 309-334.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity." BMC bioinformatics **5**(1): 1-19.
- Erickson, J. L., N. Adlung, C. Lampe, U. Bonas and M. H. Schattat (2018). "The *Xanthomonas* effector XopL uncovers the role of microtubules in stromule extension and dynamics in *Nicotiana benthamiana*." The Plant Journal **93**(5): 856-870.
- Erickson, J. L. and M. H. Schattat (2018). "Shaping plastid stromules—principles of in vitro membrane tubulation applied in planta." Current opinion in plant biology **46**: 48-54.
- Erickson, J. L., J. Ziegler, D. Guevara, S. Abel, R. B. Klösgen, J. Mathur, S. J. Rothstein and M. H. Schattat (2014). "Agrobacterium-derived cytokinin influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays." BMC plant biology **14**(1): 1-20.
- Exposito-Rodriguez, M., P. P. Laissac, G. Yvon-Durocher, N. Smirnoff and P. M. Mullineaux (2017). "Photosynthesis-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism." Nature communications **8**(1): 1-11.
- Fabro, G., J. Steinbrenner, M. Coates, N. Ishaque, L. Baxter, D. J. Studholme, E. Körner, R. L. Allen, S. J. Piquerez and A. Rougon-Cardoso (2011). "Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsis* suppress host plant immunity." PLoS pathogens **7**(11): e1002348.
- Faino, L., M. F. Seidl, X. Shi-Kunne, M. Pauper, G. C. van den Berg, A. H. Wittenberg and B. P. Thomma (2016). "Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen." Genome Research **26**(8): 1091-1100.

- Fang, X., G. Zhao, S. Zhang, Y. Li, H. Gu, Y. Li, Q. Zhao and Y. Qi (2019). "Chloroplast-to-nucleus signaling regulates microRNA biogenesis in *Arabidopsis*." Developmental Cell **48**(3): 371-382. e374.
- Fiorilli, V., C. Vannini, F. Ortolani, D. Garcia-Seco, M. Chiapello, M. Novero, G. Domingo, V. Terzi, C. Morcia and P. Bagnaresi (2018). "Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat." Scientific reports **8**(1): 1-18.
- Fitzpatrick, A., A. Roberts and S. Witherly (2004). "Larch arabinogalactan: a novel and multifunctional natural product." Agro Food Industry Hi Tech **15**(1): 30-32.
- Foyer, C. H. and G. Noctor (2009). "Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications." Antioxidants & redox signaling **11**(4): 861-905.
- Frey, P. and J. Pinon (1997). "Variability in pathogenicity of *Melampsora allii-populina* expressed on poplar cultivars." European journal of forest pathology **27**(6): 397-407.
- Fritz, M., I. Jakobsen, M. F. Lyngkjær, H. Thordal-Christensen and J. Pons-Kühnemann (2006). "Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*." Mycorrhiza **16**(6): 413-419.
- Furey, T. S. (2012). "ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions." Nature Reviews Genetics **13**(12): 840-852.
- Gaouar, O., M.-J. Morency, C. Letanneur, A. Séguin and H. Germain (2016). "The 124202 candidate effector of *Melampsora larici-populina* interacts with membranes in *Nicotiana* and *Arabidopsis*." Canadian Journal of Plant Pathology **38**(2): 197-208.
- Garnica, D. P., A. Nemri, N. M. Upadhyaya, J. P. Rathjen and P. N. Dodds (2014). "The ins and outs of rust haustoria." PLoS pathogens **10**(9): e1004329.
- Garnica, D. P., N. M. Upadhyaya, P. N. Dodds and J. P. Rathjen (2013). "Strategies for wheat stripe rust pathogenicity identified by transcriptome sequencing." PLoS One **8**(6): e67150.
- Gaulin, E. (2017). Effector-mediated communication of filamentous plant pathogens with their hosts. Advances in Botanical Research, Elsevier. **82**: 161-185.
- Germain, H., D. L. Joly, C. Mireault, M. B. Plourde, C. Letanneur, D. Stewart, M. J. Morency, B. Petre, S. Duplessis and A. Séguin (2018). "Infection assays in *Arabidopsis* reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens." Molecular plant pathology **19**(1): 191-200.

Godoy, C. V., C. D. S. Seixas, R. M. Soares, F. C. Marcelino-Guimarães, M. C. Meyer and L. M. Costamilan (2016). "Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future." Pesquisa Agropecuária Brasileira **51**: 407-421.

Goellner, K., M. Loehrer, C. Langenbach, U. Conrath, E. Koch and U. Schaffrath (2010). "Phakopsora pachyrhizi, the causal agent of Asian soybean rust." Molecular plant pathology **11**(2): 169-177.

Gotoh, E., N. Suetsugu, T. Higa, T. Matsushita, H. Tsukaya and M. Wada (2018). "Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis." Scientific reports **8**(1): 1-9.

Goulet, M.-C., L. Gaudreau, M. Gagné, A.-M. Maltais, A.-C. Laliberté, G. Éthier, N. Bechtold, M. Martel, M.-A. D'Aoust and A. Gosselin (2019). "Production of biopharmaceuticals in *Nicotiana benthamiana*—axillary stem growth as a key determinant of total protein yield." Frontiers in plant science **10**: 735.

Grabowski, E., Y. Miao, M. Mulisch and K. Krupinska (2008). "Single-stranded DNA-binding protein Whirly1 in barley leaves is located in plastids and the nucleus of the same cell." Plant physiology **147**(4): 1800-1804.

Green, B. R. (2011). "Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes." The plant journal **66**(1): 34-44.

Gu, Y., R. Zavaliev and X. Dong (2017). "Membrane trafficking in plant immunity." Molecular plant **10**(8): 1026-1034.

Gullino, M. L. (2021). Poisons of the Past: A Very Fascinating Hypothesis. Spores, Springer: 9-14.

Guttman, D. S., A. C. McHardy and P. Schulze-Lefert (2014). "Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions." Nature Reviews Genetics **15**(12): 797-813.

Hacquard, S., C. Delaruelle, V. Legué, E. Tisserant, A. Kohler, P. Frey, F. Martin and S. Duplessis (2010). "Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation." Molecular plant-microbe interactions **23**(10): 1275-1286.

Hacquard, S., D. L. Joly, Y.-C. Lin, E. Tisserant, N. Feau, C. Delaruelle, V. Legué, A. Kohler, P. Tanguay and B. Petre (2012). "A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust)." Molecular plant-microbe interactions **25**(3): 279-293.

- Hacquard, S., B. Petre, P. Frey, A. Hecker, N. Rouhier and S. Duplessis (2011). "The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics." Journal of pathogens **2011**.
- Han, H., X. Sun, Y. Xie, J. Feng and S. Zhang (2014). "Transcriptome and proteome profiling of adventitious root development in hybrid larch (*Larix kaempferi* × *Larix olgensis*)."  
BMC plant biology **14**(1): 305.
- Hanson, M. R. and R. H. Köhler (2001). "GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants." Journal of Experimental Botany **52**(356): 529-539.
- Hawksworth, D. L. and R. Lücking (2017). "Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species." Microbiology spectrum **5**(4): 5.4. 10.
- Hu, X., J. Yang and C. Li (2015). "Transcriptomic response to nitric oxide treatment in *Larix olgensis* Henry." International journal of molecular sciences **16**(12): 28582-28597.
- Hwang, J., S. Lee, J.-H. Lee, W.-H. Kang, J.-H. Kang, M.-Y. Kang, C.-S. Oh and B.-C. Kang (2015). "Plant translation elongation factor 1B $\beta$  facilitates potato virus X (PVX) infection and interacts with PVX triple gene block protein 1." PloS one **10**(5): e0128014.
- Igiehon, N. O. and O. O. Babalola (2018). "Below-ground-above-ground plant-microbial interactions: focusing on soybean, rhizobacteria and mycorrhizal fungi." The open microbiology journal **12**: 261.
- Innes, L., L. Marchand, P. Frey, M. Bourassa and R. Hamelin (2004). "First report of *Melampsora larici-populina* on *Populus* spp. in eastern North America." Plant disease **88**(1): 85-85.
- Isemer, R., K. Krause, N. Grabe, N. Kitahata, T. Asami and K. Krupinska (2012). "Plastid located WHIRLY1 enhances the responsiveness of *Arabidopsis* seedlings toward abscisic acid." Frontiers in plant science **3**: 283.
- Ivanov, S. and M. J. Harrison (2014). "A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*." The Plant Journal **80**(6): 1151-1163.
- Jelenska, J., N. Yao, B. A. Vinatzer, C. M. Wright, J. L. Brodsky and J. T. Greenberg (2007). "AJ domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses." Current biology **17**(6): 499-508.

- Jiang, R., B. Haas, M. Zody, S. Raffaele, T. Bozkurt, L. Cano, H. Versluis, F. Govers, S. Kamoun and C. Nusbaum (2009). Host-pathogen interaction drives genome plasticity in the late blight pathogen. 25th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, California, USA.
- Jiao, Y., N. J. Wickett, S. Ayyampalayam, A. S. Chanderbali, L. Landherr, P. E. Ralph, L. P. Tomsho, Y. Hu, H. Liang and P. S. Soltis (2011). "Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms." Nature **473**(7345): 97-100.
- Joly, D. L., N. Feau, P. Tanguay and R. C. Hamelin (2010). "Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (Melampsora spp.)." BMC genomics **11**(1): 1-16.
- Jones, D. and R. Baker (2007). "Introductions of non-native plant pathogens into Great Britain, 1970–2004." Plant Pathology **56**(5): 891-910.
- Julian, A. T., A. C. Mascarenhas dos Santos and J.-F. Pombert (2021). "3DFI: a pipeline to infer protein function using structural homology." Bioinformatics Advances **1**(1): vbab030.
- Kacprzak, S. M., N. Mochizuki, B. Naranjo, D. Xu, D. Leister, T. Kleine, H. Okamoto and M. J. Terry (2019). "Plastid-to-nucleus retrograde signalling during chloroplast biogenesis does not require ABI4." Plant Physiology **179**(1): 18-23.
- Kadota, A., N. Yamada, N. Suetsugu, M. Hirose, C. Saito, K. Shoda, S. Ichikawa, T. Kagawa, A. Nakano and M. Wada (2009). "Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(31): 13106-13111.
- Kamel, L., N. Tang, M. Malbreil, H. San Clemente, M. Le Marquer, C. Roux and N. Frei dit Frey (2017). "The comparison of expressed candidate secreted proteins from two arbuscular mycorrhizal fungi unravels common and specific molecular tools to invade different host plants." Frontiers in Plant Science **8**: 124.
- Karmous, I., R. Trevisan, E. El Ferjani, A. Chaoui and D. Sheehan (2017). "Redox biology response in germinating *Phaseolus vulgaris* seeds exposed to copper: Evidence for differential redox buffering in seedlings and cotyledon." PloS one **12**(10): e0184396.
- Khalid, M., H. Nan, S.-I. Kayani and T. Kexuan (2020). "Diversity and versatile functions of metallothioneins produced by plants: a review." Pedosphere **30**(5): 577-588.
- Kirchhoff, H., U. Mukherjee and H.-J. Galla (2002). "Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone." Biochemistry **41**(15): 4872-4882.

- Köhler, R. H., W. R. Zipfel, W. W. Webb and M. R. Hanson (1997). "The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo." *The plant journal* **11**(3): 613-621.
- Kombrink, A., A. Sánchez-Vallet and B. P. Thomma (2011). "The role of chitin detection in plant-pathogen interactions." *Microbes and Infection* **13**(14-15): 1168-1176.
- Krebs, M., D. Beyhl, E. Görlich, K. A. Al-Rasheid, I. Marten, Y.-D. Stierhof, R. Hedrich and K. Schumacher (2010). "Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(7): 3251-3256.
- Krenz, B., H. Jeske and T. Kleinow (2012). "The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra-and intercellular macromolecular trafficking route." *Frontiers in plant science* **3**: 291.
- Krupinska, K., S. Braun, M. S. Nia, A. Schäfer, G. Hensel and W. Bilger (2019). "The nucleoid-associated protein WHIRLY1 is required for the coordinate assembly of plastid and nucleus-encoded proteins during chloroplast development." *Planta* **249**(5): 1337-1347.
- Kryazhimskiy, S. and J. B. Plotkin (2008). "The population genetics of dN/dS." *PLoS genetics* **4**(12): e1000304.
- Kumar, A. S., E. Park, A. Nedo, A. Alqarni, L. Ren, K. Hoban, S. Modla, J. H. McDonald, C. Kambhamettu and S. P. Dinesh-Kumar (2018). "Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity." *Elife* **7**: e23625.
- Lacaze, A. and D. L. Joly (2020). "Structural specificity in plant-filamentous pathogen interactions." *Molecular Plant Pathology* **21**(11): 1513-1525.
- Laflamme, G. (2008). "Un siècle de pathologie forestière au Québec, sur fond de grands pins." *Phytoprotection* **89**(2-3): 67-72.
- Lapin, D., V. Kovacova, X. Sun, J. A. Dongus, D. Bhandari, P. von Born, J. Bautor, N. Guarneri, J. Rzemieniewski and J. Stuttmann (2019). "A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-domain immune receptors." *The Plant Cell* **31**(10): 2430-2455.
- Leary, A. Y., Z. Savage, Y. Tumtas and T. O. Bozkurt (2019). "Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity." *Current opinion in plant biology* **52**: 46-53.

- Leister, D. (2003). "Chloroplast research in the genomic age." TRENDS in Genetics **19**(1): 47-56.
- Lepage, É., É. Zampini and N. Brisson (2013). "Plastid genome instability leads to reactive oxygen species production and plastid-to-nucleus retrograde signaling in *Arabidopsis*." Plant Physiology **163**(2): 867-881.
- Levée, V., I. Major, C. Levasseur, L. Tremblay, J. MacKay and A. Séguin (2009). "Expression profiling and functional analysis of *Populus* WRKY23 reveals a regulatory role in defense." New Phytologist **184**(1): 48-70.
- Li, D., F. Wang, C. Wang, L. Zou, Z. Wang, Q. Chen, C. Niu, R. Zhang, Y. Ling and B. Wang (2016). "MicroRNA-mediated susceptible poplar gene expression regulation associated with the infection of virulent *Melampsora larici-populina*." BMC genomics **17**(1): 1-16.
- Li, G., J. E. Froehlich, C. Elowsky, J. Msanne, A. C. Ostosh, C. Zhang, T. Awada and J. R. Alfano (2014). "Distinct *Pseudomonas* type-III effectors use a cleavable transit peptide to target chloroplasts." The Plant Journal **77**(2): 310-321.
- Li, J., B. Cornelissen and M. Rep (2020). "Host-specificity factors in plant pathogenic fungi." Fungal Genetics and Biology **144**: 103447.
- Li, Z., B. Ding, X. Zhou and G.-L. Wang (2017). "The rice dynamin-related protein OsDRP1E negatively regulates programmed cell death by controlling the release of cytochrome c from mitochondria." PLoS pathogens **13**(1): e1006157.
- Liu, L. and J. Li (2019). "Communications between the endoplasmic reticulum and other organelles during abiotic stress response in plants." Frontiers in Plant Science **10**: 749.
- Lively, C. M. (2010). "A review of Red Queen models for the persistence of obligate sexual reproduction." Journal of Heredity **101**(suppl\_1): S13-S20.
- Lorrain, C., K. C. Gonçalves dos Santos, H. Germain, A. Hecker and S. Duplessis (2019). "Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi." New Phytologist **222**(3): 1190-1206.
- Lorrain, C., C. Marchal, S. Hacquard, C. Delaruelle, J. Pétrowski, B. Petre, A. Hecker, P. Frey and S. Duplessis (2018). "The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar" Molecular Plant-Microbe Interactions(ja).

- Lu, D., S. Wu, X. Gao, Y. Zhang, L. Shan and P. He (2010). "A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(1): 496-501.
- Macioszek, V. K., M. Gapińska, A. Zmienko, M. Sobczak, A. Skoczowski, J. Oliwa and A. K. Kononowicz (2020). "Complexity of *Brassica oleracea*–*Alternaria brassicicola* susceptible interaction reveals downregulation of photosynthesis at ultrastructural, transcriptional, and physiological levels." *Cells* **9**(10): 2329.
- Maddipatla, R. and P. Tankam (2020). Bleed-through elimination method in a dual-channel fluorescence microscopy system. Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XX, International Society for Optics and Photonics.
- Madina, M. H., H. Zheng and H. Germain (2018). "New insight into bulb dynamics in the vacuolar lumen of *Arabidopsis* cells." *Botany* **96**(8): 511-520.
- Majeran, W., G. Friso, Y. Asakura, X. Qu, M. Huang, L. Ponnala, K. P. Watkins, A. Barkan and K. J. van Wijk (2012). "Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions." *Plant physiology* **158**(1): 156-189.
- Martin, F. (2012). "Fifteen years of the yeast three-hybrid system: RNA–protein interactions under investigation." *Methods* **58**(4): 367-375.
- Martin, R., T. Qi, H. Zhang, F. Liu, M. King, C. Toth, E. Nogales and B. J. Staskawicz (2020). "Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ." *Science* **370**(6521): eabd9993.
- Mathur, J. (2021). "Organelle extensions in plant cells." *Plant Physiology* **185**(3): 593-607.
- McFadden, G. I., P. R. Gilson, C. Hofmann, G. J. Adcock and U.-G. Maier (1994). "Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(9): 3690-3694.
- Melonek, J., A. Matros, M. Trösch, H.-P. Mock and K. Krupinska (2012). "The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins." *The Plant Cell* **24**(7): 3060-3073.
- Men, L., S. Yan and G. Liu (2013). "De novo characterization of *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. transcriptome and analysis of its gene expression induced by jasmonates." *BMC genomics* **14**(1): 1-14.

Meng, X. and S. Zhang (2013). "MAPK cascades in plant disease resistance signaling." Annual review of phytopathology **51**: 245-266.

Menke, F. L., H.-G. Kang, Z. Chen, J. M. Park, D. Kumar and D. F. Klessig (2005)." Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco." Molecular plant-microbe interactions **18**(10): 1027-1034.

Miozzi, L., A. M. Vaira, M. Catoni, V. Fiorilli, G. P. Accotto and L. Lanfranco (2019). "Arbuscular mycorrhizal symbiosis: plant friend or foe in the fight against viruses?" Frontiers in Microbiology **10**: 1238.

Miranda, M., S. G. Ralph, R. Mellway, R. White, M. C. Heath, J. Bohlmann and C. P. Constabel (2007). "The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoids*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(7): 816-831.

Mitschke, J., J. Fuss, T. Blum, A. Höglund, R. Reski, O. Kohlbacher and S. A. Rensing (2009). "Prediction of dual protein targeting to plant organelles." New Phytologist **183**(1): 224-236.

Mizoguchi, T., K. Ichimura and K. Shinozaki (1997). "Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases." Trends in biotechnology **15**(1): 15-19.

Morton, M. J., M. Awlia, N. Al-Tamimi, S. Saade, Y. Pailles, S. Negrão and M. Tester (2019). "Salt stress under the scalpel—dissecting the genetics of salt tolerance." The Plant Journal **97**(1): 148-163.

Nabeta, K. (1994). *Larix leptolepis* (Japanese larch): in vitro culture and the production of secondary metabolites. Medicinal and aromatic plants VII, Springer: 271-288.

Nanjundappa, A., D. J. Bagyaraj, A. K. Saxena, M. Kumar and H. Chakdar (2019). "Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants." Fungal biology and biotechnology **6**(1): 1-10.

Nelson, B. K., X. Cai and A. Nebenführ (2007). "A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants." The Plant Journal **51**(6): 1126-1136.

Newcombe, G., H. Bradshaw Jr, G. Chastagner and R. Stettler (1996). "A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae* in a hybrid poplar pedigree." Phytopathology **86**(1): 87-94.

- Newcombe, G. and G. Chastagner (1993). "First report of the Eurasian poplar leaf rust fungus, *Melampsora larici-populina*, in North America." Plant Disease;(United States) **77**(5).
- Ngou, B. P. M., H.-K. Ahn, P. Ding and J. D. Jones (2021). "Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors." Nature **592**(7852): 110-115.
- Ngou, B. P. M., P. Ding and J. D. Jones (2022). "Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system." The Plant Cell **34**(5): 1447-1478.
- Nguyen Ba, A. N., A. Pogoutse, N. Provart and A. M. Moses (2009). "NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction." BMC bioinformatics **10**(1): 1-11.
- Oikawa, K., A. Yamasato, S.-G. Kong, M. Kasahara, M. Nakai, F. Takahashi, Y. Ogura, T. Kagawa and M. Wada (2008). "Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement." Plant physiology **148**(2): 829-842.
- Ortiz, D., J. Chen, M. A. Outram, I. M. Saur, N. M. Upadhyaya, R. Mago, D. J. Ericsson, S. Cesari, C. Chen and S. J. Williams (2022). "The stem rust effector protein AvrSr50 escapes Sr50 recognition by a substitution in a single surface-exposed residue." New Phytologist **234**(2): 592-606.
- Pan, Q., B. Cui, F. Deng, J. Quan, G. J. Loake and W. Shan (2016). "RTP 1 encodes a novel endoplasmic reticulum (ER)-localized protein in *Arabidopsis* and negatively regulates resistance against biotrophic pathogens." New Phytologist **209**(4): 1641-1654.
- Pandey, S. P. and I. E. Somssich (2009). "The role of WRKY transcription factors in plant immunity." Plant physiology **150**(4): 1648-1655.
- Parsons, H. T. and K. S. Lilley (2018). Mass spectrometry approaches to study plant endomembrane trafficking. Seminars in Cell & Developmental Biology, Elsevier.
- Pei, M., D. Royle and T. Hunter (1999). "Hybridization in larch-alternating *Melampsora* epitea (*M. larici-epitea*)."Mycological Research **103**(11): 1440-1446.
- Pei, M. and Y. Shang (1984). "Study on the leaf rust of cathay poplar caused by *Melampsora larici-tremulae* Kleb." J Northeastern Forestry Institute **12**: 40-49.
- Pernaci, M. (2015). Étude des traits d'histoire de vie de " Melampsora larici-populina", agent de la rouille du peuplier: de leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives, Université de Lorraine.

- Persoons, A. (2015). Le contournement de résistance par Melampsora Larici-populina l'agent de la rouille du peuplier: impact démographique et déterminisme génétique, Université de Lorraine.
- Persoons, A., K. J. Hayden, B. Fabre, P. Frey, S. De Mita, A. Tellier and F. Halkett (2017). "The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust." Molecular Ecology **26**(7): 1902-1918.
- Petre, B. and S. Kamoun (2014). "How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells?" PLoS biology **12**(2): e1001801.
- Petre, B., C. Lorrain, D. G. Saunders, J. Win, J. Sklenar, S. Duplessis and S. Kamoun (2016). "Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts." Cellular microbiology **18**(4): 453-465.
- Petre, B., C. Lorrain, E. H. Stukenbrock and S. Duplessis (2020). "Host-specialized transcriptome of plant-associated organisms." Current Opinion in Plant Biology **56**: 81-88.
- Petre, B., I. Major, N. Rouhier and S. Duplessis (2011). "Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar." BMC plant biology **11**(1): 1-16.
- Petre, B., E. Morin, E. Tisserant, S. Hacquard, C. Da Silva, J. Poulaing, C. Delaruelle, F. Martin, N. Rouhier and A. Kohler (2012). "RNA-Seq of early-infected poplar leaves by the rust pathogen *Melampsora larici-populina* uncovers *PtSultr3;5*, a fungal-induced host sulfate transporter."
- Petre, B., D. G. Saunders, J. Sklenar, C. Lorrain, J. Win, S. Duplessis and S. Kamoun (2015). "Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments." Molecular Plant-Microbe Interactions **28**(6): 689-700.
- Pinon, J. (1986). "Situation de *Melampsora medusae* en Europe." EPPO Bulletin **16**(3): 547-551.
- Pinon, J. and P. Frey (2005). "Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance." Rust diseases of willow and poplar: 139-154.
- Placidi, G. and C. C. Campa (2021). "Deliver on Time or Pay the Fine: Scheduling in Membrane Trafficking." International Journal of Molecular Sciences **22**(21): 11773.

- Prautsch, J., J. L. Erickson, S. Özyürek, R. Gormannns, L. Franke, J. E. Parker, J. Stuttmann and M. H. Schattat (2021). "XopQ induced stromule formation in Nicotiana benthamiana is causally linked to ETI signaling and depends on ADR1 and NRG1." bioRxiv.
- Prikryl, J., K. P. Watkins, G. Friso, K. J. van Wijk and A. Barkan (2008). "A member of the Whirly family is a multifunctional RNA-and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis." Nucleic acids research **36**(16): 5152-5165.
- Pusztahelyi, T., I. J. Holb and I. Pócsi (2015). "Secondary metabolites in fungus-plant interactions." Frontiers in plant science **6**: 573.
- Raffaello, T. and F. O. Asiegbu (2017). "Small secreted proteins from the necrotrophic conifer pathogen *Heterobasidion annosum* sl (HaSSPs) induce cell death in *Nicotiana benthamiana*." Scientific reports **7**(1): 1-11.
- Rahman, M., M. H. Madina, M. B. Plourde, K. C. G. Dos Santos, X. Huang, Y. Zhang, J.-F. Laliberté and H. Germain (2021). "The fungal effector Mlp37347 alters plasmodesmata fluxes and enhances susceptibility to pathogen." Microorganisms **9**(6): 1232.
- Rajagopala, S. V., B. Titz, J. Goll, J. R. Parrish, K. Wohlbold, M. T. McKevitt, T. Palzkill, H. Mori, R. L. Finley Jr and P. Uetz (2007). "The protein network of bacterial motility." Molecular systems biology **3**(1): 128.
- Rajagopala, S. V. and P. Uetz (2011). Analysis of protein–protein interactions using high-throughput yeast two-hybrid screens. Network Biology, Springer: 1-29.
- Rast, A., S. Heinz and J. Nickelsen (2015). "Biogenesis of thylakoid membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1847**(9): 821-830.
- Read, D., P. Freer-Smith, J. Morison, N. Hanley, C. West and P. Snowdon (2009). "Combating Climate Change: A Role for UK Forests. An Assessment of the Potential of the UK's Trees and Woodlands to Mitigate and Adapt to Climate Change. The Synthesis Report."
- Rinaldi, C., A. Kohler, P. Frey, F. Duchaussay, N. Ningre, A. Couloux, P. Wincker, D. Le Thiec, S. Fluch and F. Martin (2007). "Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*." Plant physiology **144**(1): 347-366.
- Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J.-F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan and E. A. Gies (2013). "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter." Nature **499**(7459): 431-437.

- Robin, G. P., J. Kleemann, U. Neumann, L. Cabre, J.-F. Dallery, N. Lapalu and R. J. O'Connell (2018). "Subcellular localization screening of *Colletotrichum higginsianum* effector candidates identifies fungal proteins targeted to plant peroxisomes, golgi bodies, and microtubules." *Frontiers in plant science* **9**: 562.
- Rocafort, M., I. Fudal and C. H. Mesarich (2020). "Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes." *Current opinion in plant biology* **56**: 9-19.
- Rodríguez-Puerto, C. M. (2019). Understanding how the Effectors HopD1 and HopG1 from the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 target the *Arabidopsis thaliana* Protein AtNHR2B to cause Disease in Plants, University of Arkansas.
- Rodríguez-Herva, J. J., P. González-Melendi, R. Cuartas-Lanza, M. Antúnez-Lamas, I. Río-Alvarez, Z. Li, G. López-Torrejón, I. Díaz, J. C. Del Pozo and S. Chakravarthy (2012). "A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses." *Cellular microbiology* **14**(5): 669-681.
- Roeber, V. M., I. Bajaj, M. Rohde, T. Schmülling and A. Cortleven (2021). "Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants." *Plant, Cell & Environment* **44**(3): 645-664.
- Rogers, C. M., J. C.-Y. Wang, H. Noguchi, T. Imasaki, Y. Takagi and M. L. Bochman (2017). "Yeast Hrq1 shares structural and functional homology with the disease-linked human RecQ4 helicase." *Nucleic acids research* **45**(9): 5217-5230.
- Rosquete, M. R. and G. Drakakaki (2018). "Plant TGN in the stress response: a compartmentalized overview." *Current opinion in plant biology* **46**: 122-129.
- Rost, B. (1999). "Twilight zone of protein sequence alignments." *Protein engineering* **12**(2): 85-94.
- Rouxel, T., J. Grandaubert, J. K. Hane, C. Hoede, A. P. Van de Wouw, A. Couloux, V. Dominguez, V. Anthouard, P. Bally and S. Bourras (2011). "Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations." *Nature communications* **2**(1): 1-10.
- Sadovsky, M., Y. Putintseva, V. Birukov, S. Novikova and K. Krutovsky (2016). De novo assembly and cluster analysis of Siberian larch transcriptome and genome. International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Springer.
- Sagar, A., P. Rathore, P. W. Ramteke, W. Ramakrishna, M. S. Reddy and L. Pecoraro (2021). "Plant growth promoting rhizobacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and their synergistic interactions to counteract the negative effects of saline soil on agriculture: Key macromolecules and mechanisms." *Microorganisms* **9**(7): 1491.

Sakamoto, W. and T. Takami (2018). "Chloroplast DNA dynamics: copy number, quality control and degradation." Plant and Cell Physiology **59**(6): 1120-1127.

Sasani, N., L. E. Pâques, G. Boulanger, A. P. Singh, N. Gierlinger, S. Rosner and O. Brendel (2021). "Physiological and anatomical responses to drought stress differ between two larch species and their hybrid." Trees **35**(5): 1467-1484.

Savage, Z., C. Duggan, A. Toufexi, P. Pandey, Y. Liang, M. E. Segretn, L. H. Yuen, D. C. Gaboriau, A. Y. Leary and Y. Tumtas (2021). "Chloroplasts alter their morphology and accumulate at the pathogen interface during infection by *Phytophthora infestans*." The Plant Journal **107**(6): 1771-1787.

Savage, Z., J. L. Erickson, J. Prautsch, A. I. Balmez, Y. Tumtas, E. L. H. Yuen, J. Stuttmann, E. Fantino, C. Duggan and C. Molinari (2021). "Chloroplast movement and positioning protein CHUP1 is required for focal immunity against *Phytophthora infestans*." bioRxiv.

Schattat, M., K. Barton and J. Mathur (2011). "Correlated behavior implicates stromules in increasing the interactive surface between plastids and ER tubules." Plant signaling & behavior **6**(5): 715-718.

Schattat, M. H., S. Griffiths, N. Mathur, K. Barton, M. R. Wozny, N. Dunn, J. S. Greenwood and J. Mathur (2012). "Differential coloring reveals that plastids do not form networks for exchanging macromolecules." The Plant Cell: tpc. 111.095398.

Schultink, A., T. Qi, A. Lee, A. D. Steinbrenner and B. Staskawicz (2017). "Roq1 mediates recognition of the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* effector proteins XopQ and HopQ1." The Plant Journal **92**(5): 787-795.

Schwartz, A. R., N. Potnis, S. Timilsina, M. Wilson, J. Patané, J. Martins Jr, G. V. Minsavage, D. Dahlbeck, A. Akhunova and N. Almeida (2015). "Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity." Frontiers in Microbiology **6**: 535.

Shalla, T. A. (1964). "Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets." The Journal of cell biology **21**(2): 253-264.

Shao, Y., G. Wei, L. Wang, Q. Dong, Y. Zhao, B. Chen and Y. Xiang (2011). "Genome-wide analysis of BURP domain-containing genes in *Populus trichocarpa*." Journal of integrative plant biology **53**(9): 743-755.

Shi, B., X. Zhao, M. Li, Z. Dong, Q. Yang, Y. Wang, H. Gao, B. Day and Q. Ma (2021). "Wheat Thioredoxin (TaTrxh1) Associates With RD19-Like Cysteine Protease TaCP1 to Defend Against Stripe Rust Fungus Through Modulation of Programmed Cell Death." Molecular Plant-Microbe Interactions **34**(4): 426-438.

- Shi, L.-X. and S. M. Theg (2013). "Energetic cost of protein import across the envelope membranes of chloroplasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(3): 930-935.
- Simoncini, D., K. Y. Zhang, T. Schiex and S. Barbe (2019). "A structural homology approach for computational protein design with flexible backbone." *Bioinformatics* **35**(14): 2418-2426.
- Sinha, D., M. K. Gupta, H. K. Patel, A. Ranjan and R. V. Sonti (2013). "Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *PLoS One* **8**(9): e75867.
- Spatafora, J. W., M. C. Aime, I. V. Grigoriev, F. Martin, J. E. Stajich and M. Blackwell (2017). "The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies." *The fungal kingdom*: 1-34.
- Struk, S., A. Jacobs, E. Sánchez Martín-Fontecha, K. Gevaert, P. Cubas and S. Goormachtig (2019). "Exploring the protein-protein interaction landscape in plants." *Plant, cell & environment* **42**(2): 387-409.
- Sun, X., D. Lapin, J. M. Feehan, S. C. Stolze, K. Kramer, J. A. Dongus, J. Rzemieniewski, S. Blanvillain-Baufumé, A. Harzen and J. Bautor (2021). "Pathogen effector recognition-dependent association of NRG1 with EDS1 and SAG101 in TNL receptor immunity." *Nature communications* **12**(1): 1-15.
- Suzuki, T., H. Oshumi, M. Miyashita, H. H. Aly, M. Matsumoto and T. Seya (2013). "Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA." *PloS one* **8**(12): e83639.
- Tabassum, N., L. Eschen-Lippold, B. Athmer, M. Baruah, M. Brode, L. D. Maldonado-Bonilla, W. Hoehenwarter, G. Hause, D. Scheel and J. Lee (2020). "Phosphorylation-dependent control of an RNA granule-localized protein that fine-tunes defence gene expression at a post-transcriptional level." *The Plant Journal* **101**(5): 1023-1039.
- Takagi, S. (2003). "Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells." *Journal of Experimental Biology* **206**(12): 1963-1969.
- Talhinas, P., D. Batista, I. Diniz, A. Vieira, D. N. Silva, A. Loureiro, S. Tavares, A. P. Pereira, H. G. Azinheira and L. Guerra-Guimarães (2017). "The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics." *Molecular plant pathology* **18**(8): 1039.

Taylor, R. E., C. E. West and C. H. Foyer (2022). "WHIRLY protein functions in plants." Food and Energy Security: e379.

Tedesco, D., L. Garavaglia, M. Spagnuolo, E. Pferschy-Wenzig, R. Bauer and C. Franz (2015). "In vivo assessment of an industrial waste product as a feed additive in dairy cows: Effects of larch (*Larix decidua* L.) sawdust on blood parameters and milk composition." The Veterinary Journal **206**(3): 322-326.

Teixeira, P. F. and E. Glaser (2013). "Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1833**(2): 360-370.

Terauchi, R. and K. Yoshida (2010). "Towards population genomics of effector–effector target interactions." New Phytologist **187**(4): 929-939.

Terrón-Camero, L. C., M. Rodríguez-Serrano, L. M. Sandalio and M. C. Romero-Puertas (2020). "Nitric oxide is essential for cadmium-induced peroxule formation and peroxisome proliferation." Plant, Cell & Environment **43**(10): 2492-2507.

Teubner, M., B. Lenzen, L. B. Espenberger, J. Fuss, J. Nickelsen, K. Krause, H. Ruwe and C. Schmitz-Linneweber (2020). "The chloroplast ribonucleoprotein CP33B quantitatively binds the psbA mRNA." Plants **9**(3): 367.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic acids research **22**(22): 4673-4680.

Toufexi, A., C. Duggan, P. Pandey, Z. Savage, M. E. Segretn, L. H. Yuen, D. C. Gaboriau, A. Y. Leary, V. Khandare and A. D. Ward (2019). "Chloroplasts navigate towards the pathogen interface to counteract infection by the Irish potato famine pathogen." BioRxiv: 516443.

Tretiakova, I. (2013). Embryogenic cell lines and somatic embryogenesis in an vitro culture of Siberian larch. Doklady Biological Sciences, Springer Nature BV.

Tuo, Y., Y. Junxiu and J. Yao (1997). "Fungus disease flora of larch plantation in the Qinling Mountains." Journal of Northwest Forestry College **12**(2): 57-63.

Tuskan, G. A., S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts and A. Salamov (2006). "The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)." science **313**(5793): 1596-1604.

- Van Aken, O., B. Zhang, S. Law, R. Narsai and J. Whelan (2013). "AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins." Plant physiology **162**(1): 254-271.
- Van Bel, M., T. Diels, E. Vancaester, L. Kreft, A. Botzki, Y. Van de Peer, F. Coppens and K. Vandepoele (2018). "PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics." Nucleic acids research **46**(D1): D1190-D1196.
- van den Burg, H. A., S. J. Harrison, M. H. Joosten, J. Vervoort and P. J. de Wit (2006). "Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection." Molecular Plant-Microbe Interactions **19**(12): 1420-1430.
- Van der Merwe, M. M., M. W. Kinnear, L. G. Barrett, P. N. Dodds, L. Ericson, P. H. Thrall and J. J. Burdon (2009). "Positive selection in AvrP4 avirulence gene homologues across the genus Melampsora." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **276**(1669): 2913-2922.
- Van Kraayenoord, C., G. Laundon and A. Spiers (1974). "Poplar rusts invade New Zealand." Plant disease reporter **58**(5): 423-427.
- Van Niel, G., G. d'Angelo and G. Raposo (2018). "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles." Nature reviews Molecular cell biology **19**(4): 213-228.
- Vialle, A., P. Frey, S. Hambleton, L. Bernier and R. C. Hamelin (2011). "Poplar rust systematics and refinement of Melampsora species delineation." Fungal Diversity **50**(1): 227-248.
- Voiniciuc, C., M. Pauly and B. Usadel (2018). "Monitoring polysaccharide dynamics in the plant cell wall." Plant physiology **176**(4): 2590-2600.
- Wada, M. (2016). "Chloroplast and nuclear photorelocation movements." Proceedings of the Japan Academy, Series B **92**(9): 387-411.
- Wada, M. and S.-G. Kong (2019). Chloroplast actin filaments involved in chloroplast photorelocation movements. The Cytoskeleton, Springer: 37-48.
- Wang, C., S. Liu, Y. Dong, Y. Zhao, A. Geng, X. Xia and W. Yin (2016). "Pd EPF 1 regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density in poplar." Plant biotechnology journal **14**(3): 849-860.
- Wang, L.-C., M.-C. Tsai, K.-Y. Chang, Y.-S. Fan, C.-H. Yeh and S.-J. Wu (2011). "Involvement of the Arabidopsis HIT1/AtVPS53 tethering protein homologue in the acclimation of the plasma membrane to heat stress." Journal of experimental botany **62**(10): 3609-3620.

- Wang, N., P. Cao, W. Xia, L. Fang and H. Yu (2017). "Identification and characterization of long non-coding RNAs in response to early infection by *Melampsora larici-populina* using genome-wide high-throughput RNA sequencing." *Tree Genetics & Genomes* **13**(2): 1-11.
- Wang, N., B. Xiao and L. Xiong (2011). "Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice." *Journal of plant physiology* **168**(18): 2212-2224.
- Wang, S., H. Y. Chen, Y. Tan, H. Fan and H. Ruan (2016). "Fertilizer regime impacts on abundance and diversity of soil fauna across a poplar plantation chronosequence in coastal Eastern China." *Scientific reports* **6**(1): 1-10.
- Wang, W., J. Y. Barnaby, Y. Tada, H. Li, M. Tör, D. Caldelari, D.-u. Lee, X.-D. Fu and X. Dong (2011). "Timing of plant immune responses by a central circadian regulator." *Nature* **470**(7332): 110-114.
- Wei, T., T.-S. Huang, J. McNeil, J.-F. Laliberté, J. Hong, R. S. Nelson and A. Wang (2010). "Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication." *Journal of virology* **84**(2): 799-809.
- Win, J., K. V. Krasileva, S. Kamoun, K. Shirasu, B. J. Staskawicz and M. J. Banfield (2012). "Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species." *PLoS pathogens* **8**(1): e1002400.
- Woodson, J. D. and J. Chory (2008). "Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes." *Nature Reviews Genetics* **9**(5): 383-395.
- Wurzinger, B., E. Nukarinen, T. Nägele, W. Weckwerth and M. Teige (2018). "The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles." *Plant Physiology* **176**(2): 1085-1094.
- Xiang, Z. (2006). "Advances in homology protein structure modeling." *Current Protein and Peptide Science* **7**(3): 217-227.
- Xu, G., X. Zhong, Y. Shi, Z. Liu, N. Jiang, J. Liu, B. Ding, Z. Li, H. Kang and Y. Ning (2020). "A fungal effector targets a heat shock–dynamin protein complex to modulate mitochondrial dynamics and reduce plant immunity." *Science advances* **6**(48): eabb7719.
- Xu, Q., C. Tang, X. Wang, S. Sun, J. Zhao, Z. Kang and X. Wang (2019). "An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function." *Nature communications* **10**(1): 1-13.

- Yan, J. and L. Kurgan (2017). "DRNAPred, fast sequence-based method that accurately predicts and discriminates DNA-and RNA-binding residues." Nucleic acids research **45**(10): e84-e84.
- Yang, F., K. Xiao, H. Pan and J. Liu (2021). "Chloroplast: the emerging battlefield in plant-microbe interactions." Frontiers in Plant Science **12**: 218.
- Yuan, M., B. P. M. Ngou, P. Ding and X.-F. Xin (2021). "PTI-ETI crosstalk: An integrative view of plant immunity." Current opinion in plant biology **62**: 102030.
- Zeng, W., H. Duo, X. Lei, X. Chen, X. Wang, Y. Pu and W. Zou (2017). "Individual tree biomass equations and growth models sensitive to climate variables for Larix spp. in China." European Journal of Forest Research **136**(2): 233-249.
- Zhang, M., Y.-H. Chiang, T. Y. Toruño, D. Lee, M. Ma, X. Liang, N. K. Lal, M. Lemos, Y.-J. Lu and S. Ma (2018). "The MAP4 kinase SIK1 ensures robust extracellular ROS burst and antibacterial immunity in plants." Cell host & microbe **24**(3): 379-391. e375.
- Zhang, X.-P. and E. Glaser (2002). "Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone." Trends in plant science **7**(1): 14-21.
- Zhang, Y., S. Zhang, S. Han, X. Li and L. Qi (2012). "Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (Larix leptolepis)." Plant cell reports **31**(9): 1637-1657.
- Zhao, J.-P., X.-L. Jiang, B.-Y. Zhang and X.-H. Su (2012). "Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker disease in Populus trichocarpa."
- Zhu, J.-K. (2016). "Abiotic stress signaling and responses in plants." Cell **167**(2): 313-324.
- Zoschke, R. and R. Bock (2018). "Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation." The Plant Cell **30**(4): 745-770.

## ANNEXE A

### AMORCES

CSEPs	S	Full sequence	Tm (°C)	Length(bp)
<b>Yeast two Hybrid constructs</b>				
Mlp104486	F	GAGAGAATTCCAACCTGTGGACATCACAGC	56,2	20
	R	GAGAGTCGACTCAAGTTGGTTACAACCG	50,5	19
Mlp123281	F	GAGAGAATTCCAACCTGTGGACCTCACAGCC	60,3	21
	R	GAGAGTCGACTCATGGTGGTTGCAGCCCG	58,9	20
Mlp51690	F	GAGAGAATTCACTCACTTGTACACTCTCGC	54,6	21
	R	GAGAGTCGACTTATTGGTGGGTGCAGACG	55,2	19
Mlp53845	F	GAGAGAATTCGCTAACCTTGACAATCTCG	54	20
	R	GAGAGTCGACTTACGTGTAGGTGCAGAGGAC	56,3	21
Mlp107359	F	GAGAGAATTCGCAATTATGAGAGTACCAAGGAC	55	23
	R	GAGAGTCGACTCAGACCTGGCAAACCAAT	57	20
Mlp108708	F	GAGAGAATTCGCAATTATGAGAATACCCGGAC	55,6	23
	R	GAGAGTCGACTCAGACCTGGCAAACCA	56,9	18
Mlp52166	F	GAGAGAATTCACTGAGCATACTCTGCTTC	54	21
	R	GAGAGTCGACCTAACAGGTCCAATTCGGG	53,3	20
Mlp72983	F	GAGAGAATTCACTAGTCATACGATCTGTTTG	50	22
	R	GAGAGTCGACCTAAATAGGTCCGTACGGG	52,2	20
Mlp86274	F	GAGAGAATTCCAAAATACTGGATGTTACAACATTTC	52,8	28
	R	GAGAGTCGACTTAGACCGGTGCGGCT	56,7	16
<b>Colony PCR screening</b>				
pGADT7	F	taatacgaactcactataggc	50	21
	R	ggggttttcagtatctacg	50	20
<b>Gateway cloning</b>				
Mlp104486	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgCAACTCGTGGACATCACAGC	56,2	20
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgAGT TGG TTT ACA ACC GTT ACA TCG	55,5	24
Mlp123281	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgCAACTCGTGGACCTCACAGCC	60,3	21
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgTGT TGG TTT GCA GCC CGA AC	59	20
Mlp51690	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgACTCACTTGTACACTCTCGC	54,6	21
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgTTG GTG GGT GCA GAC GAC	58	18
Mlp53845	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgGCTAACCTTGACAATCTCG	54	20
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgCGT GTA GGT GCA GAG GAC	55,1	18
Mlp107359	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgGCAATTATGAGAGTACCAAGGAC	55	23
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgGAG CCT GGC AAA CCA ATG C	57,6	19
Mlp108708	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgGCAATTATGAGAATACCCGGAC	55,6	23
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgGAG CCT GGC AAA CCA ATG C	57,6	19
Mlp52166	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgACTGAGCATACTCTGCTTC	54	21
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtAAC AGG TCC ATT TCG GGT G	55,2	19
Mlp72983	F	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgACTAGTCATACGATCTGTTTG	50	22
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtAAAT AGG TCC GTT ACG GG	50,9	17
Mlp86274	F	gggacaagttgtacaaaaaagcaggctggatgCAAAATACTGGATGTTACAACATTTC	52,8	28
	R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtGAC CGG TGC GGC TGT	60,1	15

S : sens de lecture, F; forward, R : reverse

Tm : température de fusion calculé par *OligoAnalyzer Tool* de <https://www.idtdna.com/>

## ANNEXE B

### INTERACTANTS CANDIATS DE MLP104486, MLP123281, MLP53845, MLP72983, MLP52166 ET MLP86274

#### Mlp104486

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
7	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 11 (LOC105110733), transcript variant X2, mRNA	XM_011005892.1	3E-80
7	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5 (LOC18100279), mRNA	XM_006381496.2	1E-01
5	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 11 (LOC7475018), mRNA	XM_006379056.2	3E-94
4	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> major facilitator superfamily domain-containing protein 12 (LOC18095009), transcript variant X2, mRNA	XM_024604397.1	5E-45
4	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g49770 (LOC18098391), transcript variant X2, mRNA	XM_024599962.1	8E-40
4	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> cysteine proteinase 15A-like (LOC105128811), mRNA	XM_011030638.1	7E-51
4	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> cysteine protease RD19A (LOC7461242), mRNA	XM_002305415.3	2E-53
3	subtilisin-like protease SBT1.7 [ <i>Populus trichocarpa</i> ]	XM_006374776.2	2E-50
3	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> mpv17-like protein (LOC105129173), mRNA	XM_011031131.1	2E-20
2	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> pathogenesis-related protein PR-4 (LOC7487673), mRNA	XM_002319041.3	2E-39
2	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> pathogen-related protein (LOC105139361), mRNA	XM_011045773.1	2E-38
2	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> beta-galactosidase 8 (LOC105139588), mRNA	XM_011046076.1	2E-145
2	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial (LOC7454876), transcript variant X2, mRNA	XM_002313970.3	3E-19

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
2	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> serine--glyoxylate aminotransferase (LOC7467988), transcript variant X2, mRNA	XM_006369508.2	5E-36
2	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (LOC7496484), transcript variant X1, mRNA	XM_002315433.3	5E-24
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> UPF0481 protein At3g47200 (LOC7489832), transcript variant X3, mRNA	XM_024592403.1	9E-02
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> GATA transcription factor 5 (LOC7495523), mRNA	XM_002310251.3	7E-25
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein At4g39970 (LOC7466800), transcript variant X2, mRNA	XM_002309936.3	1E-24
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> bifunctional bis(5'-adenosyl)-triphosphatase/adenylylsulfatase FHIT (LOC7494644), mRNA	XM_024591241.1	2E-60
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC7496491 (LOC7496491), mRNA	XM_002314303.3	1E-13
1	<i>Populus trichocarpa</i> clone Pop1-80E22, complete sequence	AC182707.2	8E-04
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> carbonic anhydrase 2 (LOC7496826), transcript variant X1, mRNA	XM_002298488.3	3E-35
1	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> probable mannitol dehydrogenase (LOC105138196), mRNA	XM_011044229.1	1E-21
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> alanine aminotransferase 2 (LOC7461955), mRNA	XM_024598308.1	7E-54
1	<i>Nicotiana benthamiana</i> isolate Z1.24 ubiquitin mRNA, partial cds	EU862551.1	1E-37
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> meiosis-specific protein ASY3 (LOC7457191), transcript variant X1, mRNA	XM_024595063.1	4E-44
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (LOC7492465), transcript variant X2, mRNA	XM_024602024.1	4E-29
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4A (LOC18098088), mRNA	XM_006384712.2	5E-21
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> 40S ribosomal protein S21-2 (LOC18098676), transcript variant X2, mRNA	XM_006382426.2	3E-56

## Mlp123281

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
3	Picea sitchensis clone WS02726_K09 unknown mRNA	EF084345.1	2E-22
2	Picea sitchensis clone WS02772_M02 unknown mRNA	BT071135.1	3E-80
1	Picea glauca clone GQ03316_F13 mRNA sequence	BT112499.1	1E-45
1	Picea abies metallothionein-like protein class II (MTL) mRNA, complete cds	AY961943.1	4E-15
1	<sup>a</sup> Picea glauca needle chlorophyll a/b-binding protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product	AF247178.1	4E-22
1	PREDICTED: Selaginella moellendorffii SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-2 (LOC9647410), mRNA	XM_002981390.2	5E-61
1	Lemna minor polyubiquitin mRNA, partial cds	AY683447.1	3E-24
1	Picea glauca clone GQ03903_E14 mRNA sequence	BT117558.1	2E-03
1	Pinus monticola thaumatin-like protein mRNA, complete cds	AY500845.1	2E-53
1	PREDICTED: Selaginella moellendorffii dynein light chain 1, cytoplasmic (LOC9662392), mRNA	XM_002992438.2	1E-38
1	Larix laricina rbcS gene for ribulose-1,5-carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39)	X16039.1	8E-28
1	Picea sitchensis clone WS02711_H19 unknown mRNA	BT070242.1	1E-10

## Mlp53845

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
2	Pseudotsuga menziesii var. menziesii haplotype Pm-PolyUBQ_3 polyubiquitin gene, complete cds	AY832764.1	2E-12
1	Picea abies metallothionein-like protein class II (MTL) mRNA, complete cds	AY961943.1	3E-15
1	Picea sitchensis clone WS0442_P23 unknown mRNA	BT122293.1	9E-50
1	Picea sitchensis clone WS02750_O21 unknown mRNA	EF676756.1	8E-85
1	Picea sitchensis clone WS0297_F07 unknown mRNA	EF082125.1	1E-15
1	Picea sitchensis clone WS02750_J20 unknown mRNA	EF086352.1	7E-85
1	Picea sitchensis clone WS0279_H04 unknown mRNA	EF081823.1	2E-04
1	Picea sitchensis clone WS02737_J14 unknown mRNA	EF085985.1	2E-12
1	Picea sitchensis clone WS0451_F21 unknown mRNA	BT122419.1	3E-48
1	Picea sitchensis clone WS02728_B15 unknown mRNA	EF084524.1	3E-72
1	PREDICTED: Quercus suber protein kinase kin1-like (LOC112014241), mRNA	XM_024046623.1	7E-21
1	Picea sitchensis clone WS02729_B11 unknown mRNA	EF084505.1	3E-54
1	Picea sitchensis clone WS02924_L03 unknown mRNA	BT071563.1	4E-54
1	Picea sitchensis clone WS02772_M02 unknown mRNA	BT071135.1	3E-80

## Mlp72983

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC7474819 (LOC7474819), transcript variant X1, mRNA	XM_024585954.1	1E-07
1	<i>Picea glauca</i> clone GQ03717_I15 mRNA sequence	BT116373.1	4E-07
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 24 (LOC18110143), transcript variant X1, mRNA	XM_024593445.1	1E-46

## Mlp52166

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
5	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> BURP domain protein RD22-like (LOC112327842), transcript variant X3, mRNA	XM_024602687.1	3E-60
5	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> iron-sulfur cluster assembly protein 1 (LOC7458036), mRNA	XM_002318616.2	1E-10
5	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> tRNA 2'-phosphotransferase 1 (LOC7472650), transcript variant X5, mRNA	XM_024595613.1	1E-59
4	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> mitotic spindle checkpoint protein MAD1-like (LOC105110382), mRNA	XM_011005404.1	5E-10
4	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> thiol protease aleurain (LOC18100334), mRNA	XM_006381559.2	2E-131
3	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF217 (LOC18104531), transcript variant X6, mRNA	XM_024584186.1	6E-06
3	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized protein At5g02240 (LOC7487262), mRNA	XM_002309028.3	1E-39
3	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> cysteine protease RD19A (LOC7456351), mRNA	XM_002313734.3	6E-97
3	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> alcohol dehydrogenase class-3 (LOC7461480), mRNA	XM_002301800.3	1E-96
3	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> probable galacturonosyltransferase 14 (LOC7467877), mRNA	XM_002324058.3	2E-07
2	<sup>a</sup> <i>Populus deltoides</i> x <i>Populus maximowiczii</i> partial mRNA for putative cytochrome P450	AJ698923.1	1E-58
2	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> nodulin-related protein 1 (LOC7481547), mRNA	XM_002316065.3	5E-28

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
2	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> zinc finger CCCH domain-containing protein 13 (LOC7463023), transcript variant X1, mRNA	XM_024599339.1	8E-43
1	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> F-box/LRR-repeat protein At5g63520-like (LOC105125292), transcript variant X1, mRNA	XM_011025678.1	8E-11
1	<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> mitochondrion, complete genome	KT429213.1	9E-33
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> 60S ribosomal protein L24 (LOC7479265), mRNA	XM_002304439.2	2E-34
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> carbonic anhydrase 2 (LOC7496826), transcript variant X1, mRNA	XM_002298488.3	8E-34
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> primary amine oxidase (LOC7477811), mRNA	XM_002299382.3	4E-91
1	<i>Lacistema aggregatum</i> isolate 26 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY935816.1	8E-19
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC7474819 (LOC7474819), transcript variant X1, mRNA	XM_024585954.1	1E-07
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC18099221 (LOC18099221), mRNA	XM_006383072.2	4E-13
1	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 8 (LOC7493268), transcript variant X2, mRNA	XM_024597870.1	1E-30
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC7473623 (LOC7473623), transcript variant X1, mRNA	XM_024602825.1	9E-26
1	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> flavanone 3-dioxygenase (LOC105110076), mRNA	XM_011004986.1	4E-138
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> truncated transcription factor CAULIFLOWER D (LOC7463134), mRNA	XM_002321675.3	7E-47
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> putative dual specificity protein phosphatase DSP8 (LOC7471644), mRNA	XM_002303330.3	5E-18
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> serine/arginine-rich splicing factor RS2Z33 (LOC7491956), transcript variant X1, mRNA	XM_002308454.3	5E-48
1	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> uncharacterized LOC105123355 (LOC105123355), mRNA	XM_011022914.1	6E-04

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
1	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> uncharacterized LOC105119411 (LOC105119411), mRNA	XM_011017553.1	2E-13
1	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> NAC domain-containing protein 18-like (LOC105133738), mRNA	XM_011037830.1	3E-25
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> leucine aminopeptidase 1 (LOC7493395), mRNA	XM_002325098.3	5E-16
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> BTB/POZ domain-containing protein At2g30600 (LOC7496859), transcript variant X1, mRNA	XM_002300607.3	2E-32
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> probable glutamyl endopeptidase, chloroplastic (LOC7455430), transcript variant X2, mRNA	XM_024584797.1	1E-30
1	PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> low-temperature-induced cysteine proteinase (LOC105142757), mRNA	XM_011050538.1	4E-17
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> uncharacterized LOC7457746 (LOC7457746), mRNA	XM_002321571.3	3E-36
1	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> heat shock 70 kDa protein 17 (LOC7495642), mRNA	XM_002308790.3	1E-27
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> ATP-dependent RNA helicase DBP2 (LOC7494659), mRNA	XM_024591464.1	1E-04
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> 28S ribosomal RNA (LOC112327715), rRNA	XR_002982136.1	5E-28
1	<sup>a</sup> PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> wall-associated receptor kinase-like 10 (LOC7460785), mRNA	XM_002314586.3	2E-35
1	PREDICTED: <i>Populus trichocarpa</i> metalloendopeptidase 2-MMP (LOC18108449), mRNA	XM_006371365.2	7E-105

## Mlp86274

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
2	<i>Pinus nigra</i> 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	U90680.1	3E-12
2	<i>Picea sitchensis</i> clone WS02924_L03 unknown mRNA	BT071563.1	5E-70
2	PREDICTED: <i>Nicotiana tabacum</i> phosphoglucomutase, cytoplasmic-like (LOC107798006), partial mRNA	XM_016620933.1	2E-52
2	<i>Wolffia arrhiza</i> clone 11SB09.09 23S ribosomal RNA-like, partial sequence	HQ149094.1	3E-06
1	<sup>a</sup> <i>Cupressus sempervirens</i> isolate cyplp080 putative chloroplast chlorophyll a/b-binding protein mRNA, partial cds; nuclear gene for chloroplast product	FJ237489.1	1E-19

Occurrence	Blast hit	Reference	e-value
1	<sup>a</sup> <i>Pinus contorta</i> chloroplast light harvesting chlorophyll a/b binding protein (ifg1934) gene, partial cds; nuclear gene for chloroplast product	AY617084.1	3E-03
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS0272_P02 unknown mRNA	EF084070.1	2E-22
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS02813_B23 unknown mRNA	EF085858.1	3E-07
1	<i>Picea glauca</i> clone GQ03704_D12 mRNA sequence	BT115677.1	5E-04
1	<i>Pinus sylvestris</i> oxygen-evolving enhancer protein 1 mRNA, complete cds	KM921746.1	2E-01
1	<i>Picea glauca</i> clone GQ03609_G04 mRNA sequence	BT115107.1	6E-03
1	<i>Carex duriuscula</i> voucher CCDB-18345-F8 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MG215874.1	3E-11
1	<i>Ephedra americana</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY056485.1	7E-04
1	<i>Larix leptolepis</i> 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY056502.1	2E-06
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS02729_K15 unknown mRNA	EF086258.1	2E-09
1	<i>Picea glauca</i> clone GQ02808_M04 mRNA sequence	BT104304.1	6E-18
1	<i>Lippia sidoides</i> chloroplast gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: DGGE band: A13	AB778317.1	2E-28
1	<i>Picea glauca</i> clone GQ03909_O08 mRNA sequence	BT117745.1	4E-31
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS0476_D13 unknown mRNA	BT124676.1	3E-06
1	<i>Larix decidua</i> isolate AcesapB01 hypothetical protein (UMN_5051_01) gene, partial cds	JQ443388.1	7E-15
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS02712_N16 unknown mRNA	EF083867.1	4E-67
1	<i>Picea abies</i> fosmid clone LuSpFOS_45, isolate Z4006	KX603840.1	9E-08
1	<i>Picea sitchensis</i> clone WS02715_I20 unknown mRNA	EF083469.1	4E-73

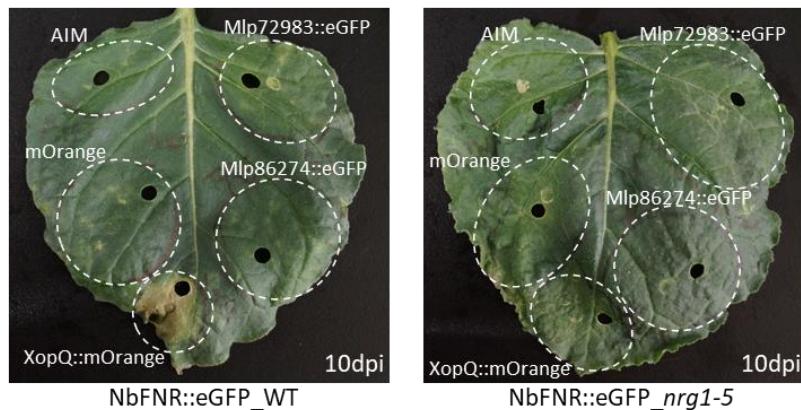
<sup>a</sup> Gènes rapportés comme significativement dérégulés chez le peuplier 'Robusta' (*Populus nigra* x *P. deltoides*) en interaction compatible avec *Mlp* E4, 12 heures post-infection et 4 jours post-infection (Zhang et al. 2019).

## ANNEXE C

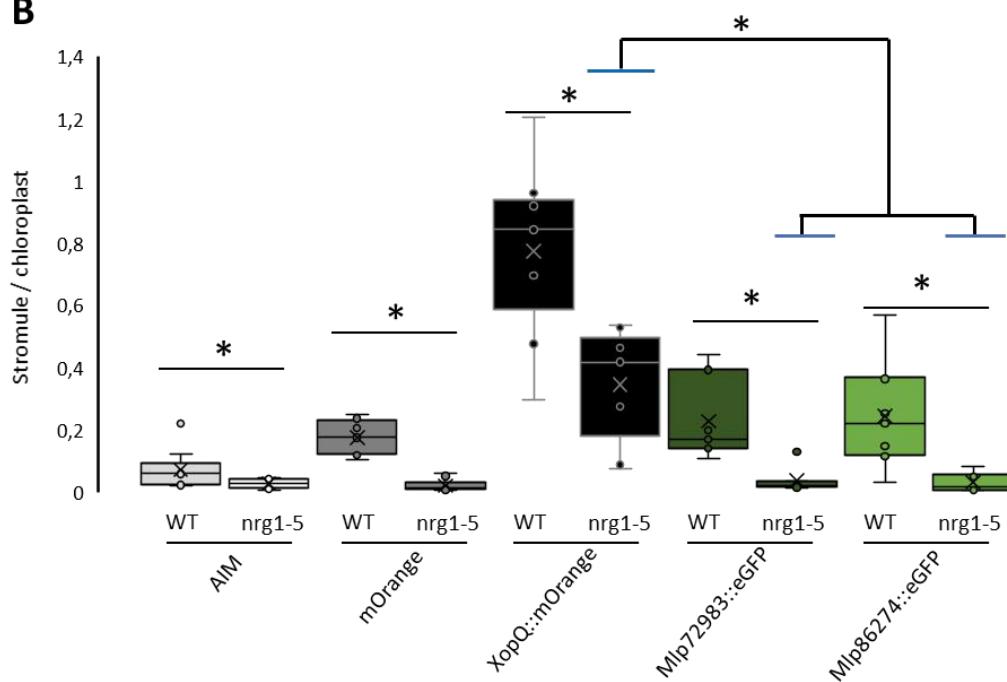
### INDUCTION DE STROMULES DANS LA LIGNÉE NbFNR::eGFP\_nrg1-5

La lignée NbFNR::eGFP\_nrg1-5 présente des résultats d'induction identiques à la lignée NbFNR::eGFP\_nrg1-4.

**A**



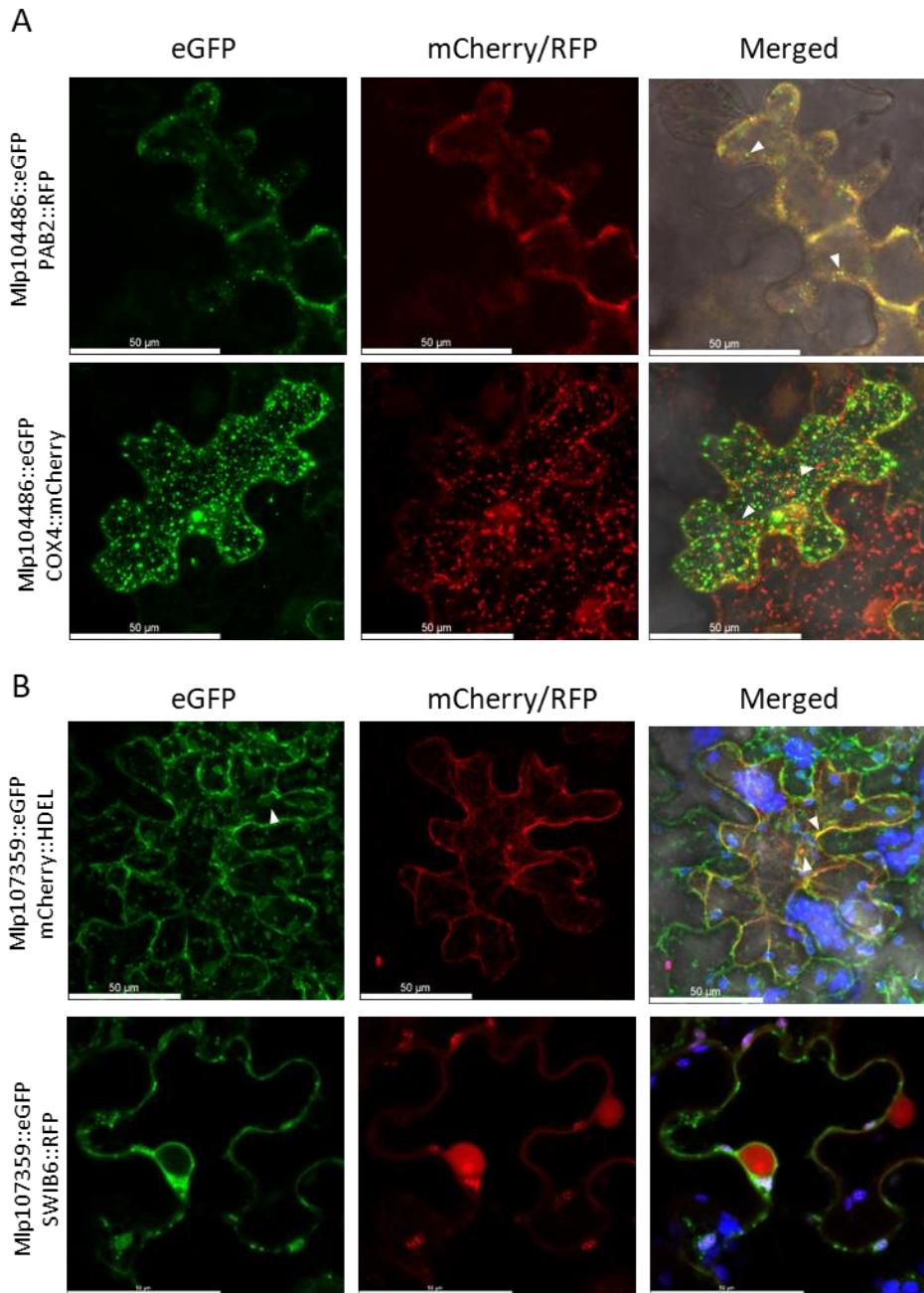
**B**



**A.** État d'avancement de la réponse hypersensible à 10 dpi. **B.** Ratio de stromules par chloroplaste à 72 hpi ( $n = 9$ , 3 répliques sur 3 plantes sauvages et FNR::eGFP\_nrg1-5). Les étoiles signalent la différence significative ( $p \leq 0,05$ ) d'après le test statistique Mann-Whitney.

## ANNEXE D

### LOCALISATIONS INCERTAINES OU DIFFÉRENTES ENTRE MLP104486 ET MLP107359 AVEC PLUSIEURS MARQUEURS CELLULAIRES

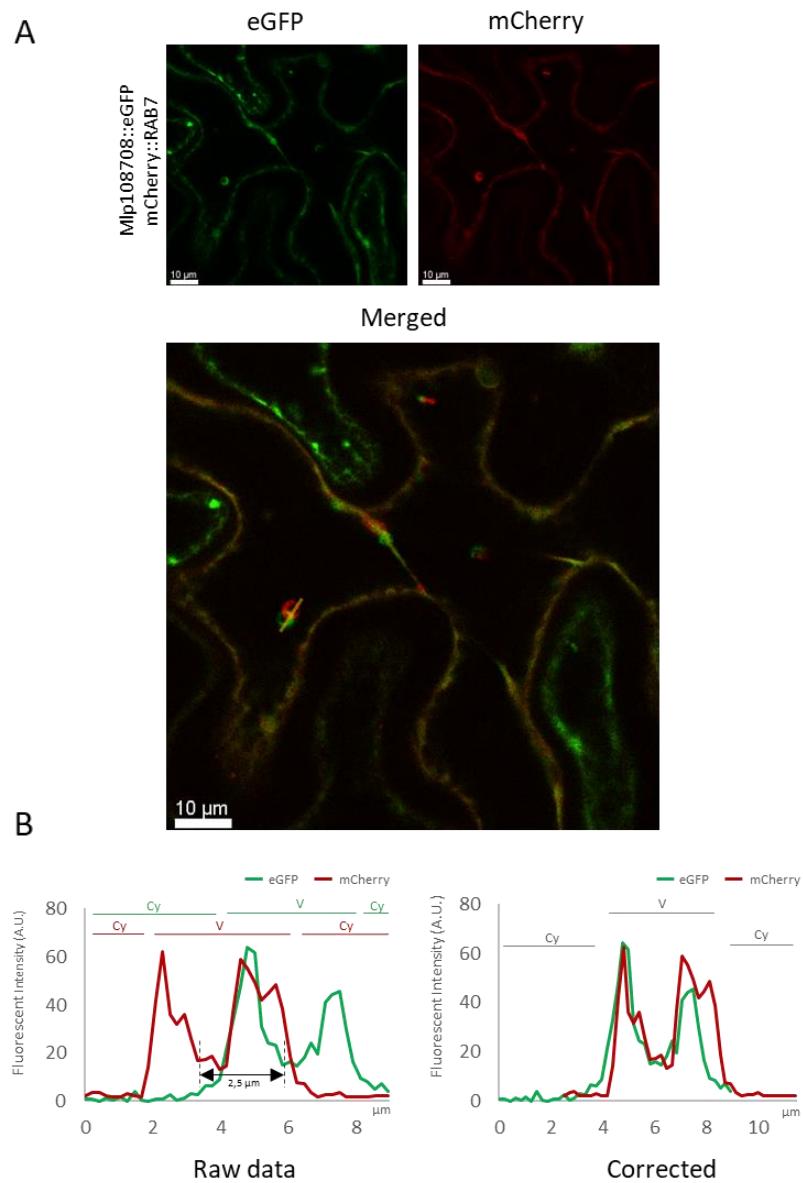


**A.** Observation de l'accumulation de Mlp104486::eGFP dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* à 3 dpi. Les marqueurs cellulaires PAB2::RFP et COX4::mCherry, respectivement marqueurs des granules de stress et des mitochondries ne colocalisent pas avec Mlp104486::eGFP (Köhler et al. 1997, Tabassum et al. 2020). Les têtes de flèches présentent les points évidents d'une différence de localisation **B.** Observation de l'accumulation de Mlp107359::eGFP dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* à 3 dpi. Le marqueur cellulaire mCherry::HDEL (marqueur du réticulum endoplasmique) présente des similitudes de localisation, mais le nombre de réplicas et la qualité du signal ne sont pas assez suffisantes pour affirmer une colocalisation (Ivanov et Harrison 2014). Le marqueur SWIB6::RFP, marqueur des nucléoïdes chloroplastiques, ne colocalisent pas avec Mlp107359::eGFP (Melonek et al. 2012). Les têtes de flèches présentent les points évidents d'une différence de localisation

## ANNEXE E

### CORRECTION DU MOUVEMENT VESICULAIRE

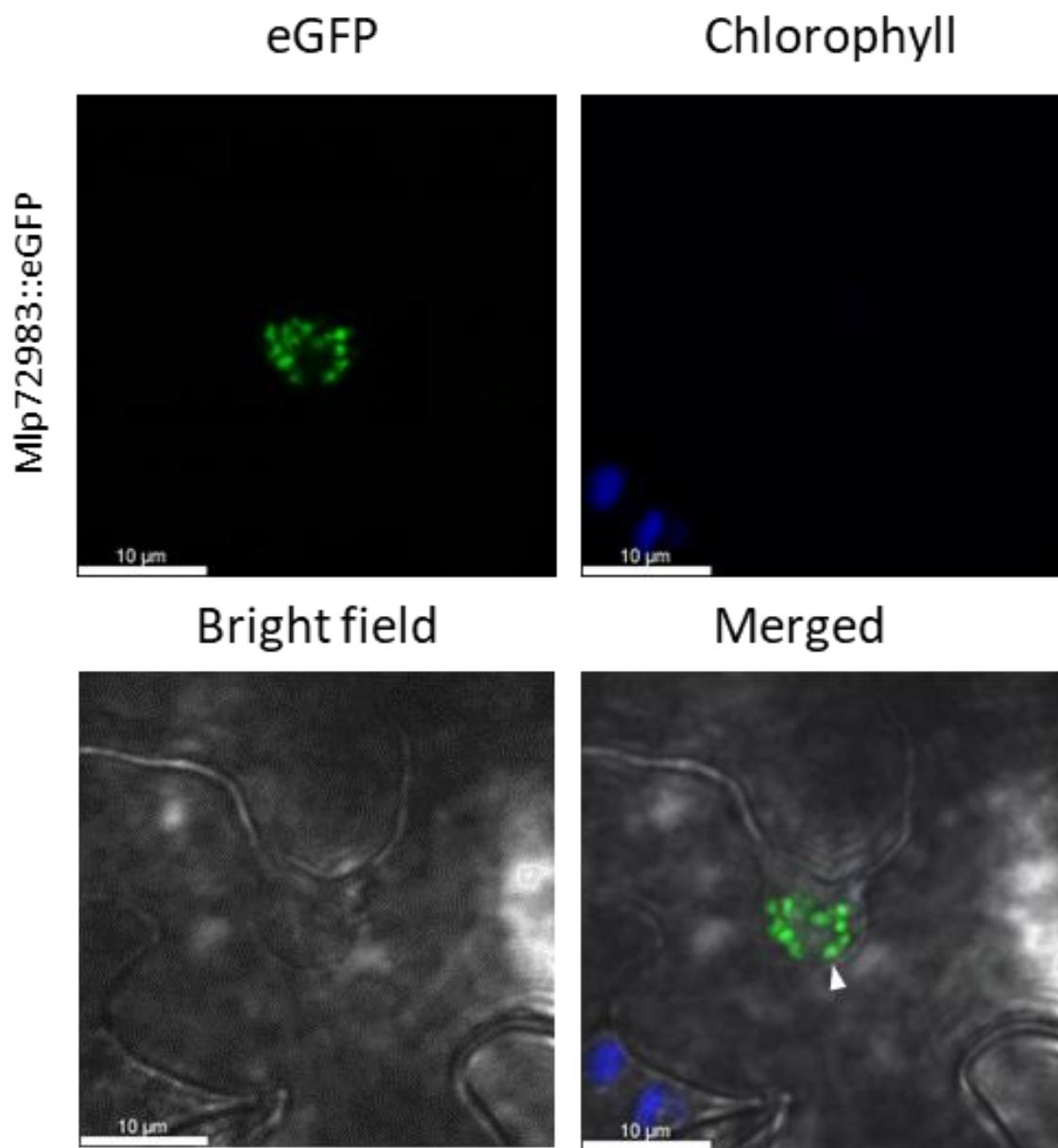
Un décalage de 2,5  $\mu\text{m}$  est visible entre l'acquisition du canal vert (Mlp108708::eGFP) et du canal rouge (mCherry::RAB7).



**A.** Observation de l'accumulation de Mlp108708::eGFP dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* à 3 dpi. **B.** Le graphique d'intensité est issu du trait jaune tracé sur la vésicule. Les minima et maxima des courbes d'intensités vertes (Mlp108708::eGFP) et rouges (mCherry::RAB7, marqueur de la vacuole) se superposent si une correction de 2,5  $\mu$ m est appliquée. Ce décalage est dû au mouvement de la vésicule entre l'acquisition des deux canaux de fluorescence.

## ANNEXE F

### LOCALISATION DE MLP72983 DANS DES CORPS NUCLÉAIRES



Observation de l'accumulation de Mlp72983::eGFP dans l'épiderme abaxiale de *N. benthamiana* à 3 dpi. L'accumulation nucléaire est hétérogène et forme des corps nucléaires indiqués par la tête de flèche.