

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

INVESTIGATION D'EFFECTEURS DE *MELAMPSORA LARICI-POPULINA*
CIBLANT DES SOUS-COMPARTIMENTS CHLOROPLASTIQUES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
ALEXANDRE BRISSON

JANVIER 2023

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.

*La chose la plus importante en ce monde est
d'être heureux. Une fois cela compris, tout est
possible avec un brin de patience et
beaucoup de bonne humeur!*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Hugo Germain. Merci de m'avoir donné la chance d'intégrer le laboratoire de recherche en 2017 à la fin de ma technique, tout au long de mon Baccalauréat et finalement pour la réalisation de mon projet de maîtrise. J'ai appris énormément dans le domaine de la biologie végétale et moléculaire, et ce, avec plusieurs personnes tout au long de mes études. Merci pour ton accessibilité, ton encadrement et tes encouragements à faire un stage à l'étranger. Les cinq dernières années ont été bien remplies et ont passé si rapidement!

Je tiens à remercier Claire Letanneur qui m'a appris tellement au cours des années. Elle a été présente dans mon parcours académique à partir des portes ouvertes en 2017, m'introduisant au Baccalauréat en Biochimie et Biotechnologies, jusqu'à la fin de ma maîtrise en 2022. Merci de m'avoir donné la piqure de la microscopie confocale, de la biologie moléculaire et surtout à tous nos fous rires en laboratoire.

Un gros merci à Mélodie B. Plourde qui m'a donné d'innombrables conseils techniques et personnels au fil des années. Ceux-ci se sont avérés justes et pertinents dans toutes les expériences que j'ai entreprises. Un énorme merci à tous mes collègues de laboratoire qui ont fait de moi un meilleur chercheur en me posant des questions sur mon projet et sur les leurs, me permettant de réfléchir et de proposer des solutions créatives.

Je tiens à remercier le Département de chimie, biochimie et physique et Hugo de m'avoir permis d'enseigner le cours de Biologie moléculaire expérimentale en plus d'acquérir de l'expérience en tant que technicien de laboratoire. Ces expériences de travail m'ont fait voir l'envers de la médaille et apprécier encore plus ma formation académique.

Un merci spécial à ma copine qui m'a supporté tout au long de mes études universitaires. Son support quotidien, sa sagesse et sa bonne humeur m'ont permis de persévérer et d'arriver à mes buts. J'espère continuer de vivre de nouvelles expériences et

aventures à tes côtés. Merci à mes amis et ma famille pour le soutien dans l'entreprise de ce nouveau défi intellectuel. Sans tous ces gens, je n'en serais pas où j'en suis aujourd'hui, à la fin de mes études universitaires.

RÉSUMÉ

Melampsora larici-populina (Mlp) est le phytopathogène biotrophe obligatoire provoquant la rouille du peuplier. Ce dernier est l'agent causal de pertes financières énormes dans l'industrie forestière, de la bioénergie ainsi que de la phytoremédiation. Lorsque le champignon arrive à infecter le peuplier, il sécrète une multitude de protéines spécialisées nommées « effecteurs ». Ces petites armes biologiques lui permettent de contourner le système immunitaire de son hôte en plus de s'approprier une partie de ses nutriments afin de se développer à ses dépens. La compréhension de la fonction de ces petites protéines repose sur la caractérisation de celles-ci.

Le présent projet de recherche a tenté de caractériser un couple d'effecteurs homologues dont l'expression est spécifique à l'hôte. En effet, *Melampsora larici-populina* complète son cycle de vie en passant par le mélèze et le peuplier, induisant des profils d'expression d'effecteurs candidats spécifique à chacun de ses deux hôtes. Les deux protéines au cœur de cette étude étaient l'effecteur 51 690 exprimé fortement chez le peuplier et l'effecteur 53 845 fortement exprimé chez le mélèze. Le fort taux d'homologie unissant ces deux protéines spécialisées a soulevé des questions en lien avec leurs ressemblances au niveau de leur localisation cellulaire ainsi que leurs fonctions biologiques.

Ainsi, une comparaison de la localisation des effecteurs a été vérifiée grâce à des analyses *in silico* ainsi que des analyses *in planta* via microscopie confocale par le biais de leur expression transitoire avec *Nicotiana benthamiana*. Finalement, une évaluation de l'intégrité du peptide signal sur la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 a été mise de l'avant afin de déterminer si ce dernier influençait la localisation cellulaire de ce dernier.

Mots-clés : *Melampsora larici-populina*, microscopie confocale, biologie moléculaire, *Nicotiana benthamiana*, extraction de chloroplastes, expression transitoire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Concepts d'immunité.....	1
1.1.1 Immunité naturelle et non-spécifique	2
1.1.2 Immunité induite spécifique et non spécifique	4
1.2 Le chloroplaste au sein de la défense	8
1.2.1 Le chloroplaste.....	9
1.2.2 Les nucléoides chloroplastiques	10
1.2.3 Rôles et métabolites produits lors de la défense	12
1.2.4 Effecteurs chloroplastiques.....	15
1.3 <i>Melampsora larici-populina</i>	17
1.3.1 Mécanismes de reproduction	18
1.3.2 Développement et infection	19
1.4 Objectifs et hypothèse du projet de recherche.....	22
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	24
2.1 Analyses bio-informatiques des effecteurs.....	24
2.2 Croissance et entretien des plants de <i>Nicotiana benthamiana</i>	24
2.3 Vérification de la localisation cellulaire des effecteurs 51 690 et 53 845	25
2.4 Agroinfiltration	25
2.5 Microscopie confocale.....	26
2.6 Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845	26
2.6.1 Clonages de l'effecteur 53 845	26
2.6.2 Recherche de la localisation de l'effecteur 53 845 par centrifugation différentielle et Western Blot.....	27

2.7	Recherche de la localisation de 51 690 et de ses interactants potentiels	28
2.7.1	Colocalisation de l'effecteur 51 690 avec des marqueurs de référence du nucléoïde chloroplastique	28
2.7.2	Extraction et purification de chloroplastes à partir de <i>N. benthamiana</i> ..	29
2.7.3	Clonage d'un marqueur RFP et détection de la protéine WHIRLY-RFP par Western Blot	30
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		31
3.1	Analyses bio-informatiques des effecteurs.	31
3.2	Vérification de la localisation cellulaire <i>in planta</i> des effecteurs 51 690 et 53 845	33
3.3	Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845	35
3.3.1	Clonages de l'effecteur 53 845 et recherche de sa localisation par microscopie confocale	35
3.4	Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 51 690	39
3.4.1	Optimisation de l'extraction et la purification de chloroplastes	41
3.4.2	Clonage d'un marqueur RFP	44
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		47
4.1	Analyse bio-informatiques des effecteurs	47
4.2	Localisation cellulaire de l'effecteur 53 845	48
4.3	Localisation cellulaire de l'effecteur 51 690	50
4.4	Perspectives de recherche et avancée du projet.....	52
CHAPITRE V		
CONCLUSION		54
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		56
ANNEXE A		
AMORCES UTILISÉES AU COURS DES CLONAGES GATEWAY DE L'EFFECTEUR 53 845 ET DU MARQUEUR RFP		75
ANNEXE B		
COLOCALISATION DE L'EFFECTEUR 51 690 AVEC LA PROTÉINE DE RÉFÉRENCE WHIRLY-RFP		76
ANNEXE C		
CARTES DES PLASMIDES 3353-SPC/SPP-GFP ET 3353-SPC/MAT-FLAG UTILISÉS POUR LA RECHERCHE DE LA LOCALISATION DE L'EFFECTEUR 53 845		77

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Représentation schématisée de la <i>PAMP-Triggered Immunity</i> et de l' <i>Effector Triggered Immunity</i> selon (Nguyen et al., 2021).....	6
1.2	Représentation de la relation synergique entre les réactions de PTI d'ETI (Nguyen et al., 2021)	8
1.3	Illustration des différentes structures et compartiments chloroplastiques (Kelvinsong, 2013)	9
1.4	Visualisation de la protéine membranaire PEND-GFP (<i>Plastid Envelope DNA-binding</i>) localisée au niveau des nucléoïdes chloroplastiques (Terasawa et Sato, 2005).....	10
1.5	Représentation du nucléoïde chloroplastique et ses divers compartiments selon les différents stades de développement du chloroplaste (Pfalz et Pfannschmidt, 2013)	11
1.6	Illustration simplifiée du rôle du chloroplaste dans la défense immunitaire .	15
1.7	Reproduction de <i>Melampsora larici-populina</i> grâce à ses cinq types de spores en fonction des différentes saisons (Hacquard et al., 2011)	18
1.8	Représentation du cycle de vie végétatif et infectieux de <i>Melampsora larici-populina</i> (Hacquard et al., 2011).	20
1.9	Formation détaillée de l'haustorium, structure spécialisée utilisée par <i>Mlp</i> lors de son cycle infectieux (Garnica et al., 2014)	21
2.1	Schéma de la séparation au Percoll après l'extraction chloroplastique	29
3.1	Alignement local des effecteurs 51 690 (Query) et 53 845 (Subject) effectuée avec le logiciel BLASTp	31
3.2	Prédiction de la localisation cellulaire des effecteurs 51 690 et 53 845 par le biais du logiciel LOCALIZER 1.0.4	32
3.3	Analyse de la présence d'un motif de liaison à l'ADN dans les effecteurs 51 690 et 53 845 par le biais des logiciels iDNA-Prot, DNABIND et GYM 2.0	33

3.4	Localisation des effecteurs 51 690 et 53 845 sans signal peptide chez <i>N benthamiana</i> 48 h post-agroinfiltration.....	34
3.5	Localisation de l'effecteur 53 845 avec un signal peptide complet, partiel et absent chez <i>N. benthamiana</i> 48 h post-agroinfiltration	36
3.6	Détection de l'effecteur 53 845 sous sa forme mature (MAT) et avec le signal peptide complet (SPC) par immunobuvardage de type Western	38
3.7	Localisation de l'effecteur 51 690-eGFP et de la protéine de référence SWIB-6-RFP chez <i>N. benthamiana</i> 48 h post-agroinfiltration.....	40
3.8	Visualisation de l'expression de la protéine WHIRLY chez <i>N. benthamiana</i> avant l'extraction de chloroplastes.....	42
3.9	Évaluation de la présence de la protéine recombinante WHIRLY-RFP dans des fractions de chloroplastes solubles et insolubles par le biais d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide et par immunobuvardage à la Western.....	43
3.10	Visualisation de l'expression du marqueur RFP chez <i>N. benthamiana</i> avant son extraction pour la détecter par immunobuvardage de type Western	44
3.11	Détection du marqueur 1x-RFP par immunobuvardage de type Western	45
B1	Localisation de l'effecteur 51 690 et de la protéine de référence WHIRLY chez <i>N. benthamiana</i> 48 h post-agroinfiltration	76
C1	Cartes des constructions utilisées pour évaluer la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 avec son signal peptide complet (SPC) et son signal peptide partiel (SPP) en fusion avec la GFP	77
C2	Cartes des constructions utilisées pour évaluer la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 avec son signal peptide complet (SPC) et sans son signal peptide (MAT) en fusion avec l'étiquette FLAG	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

a.a.	Acide aminé
Ac 1°	Anticorps primaire
Ac 2°	Anticorps secondaire
Ac α -FLAG	Anticorps anti-FLAG
Ac α -RFP	Anticorps anti-RFP
ADN	Acide désoxyribonucléique
attB	Attachment sequence (from <i>bacterium</i>)
attL	Attachment sequence Left
attR	Attachment sequence Right
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CSEPs-HSH	<i>Candidate Secreted Effector Protein</i> Homologue spécifique à l'hôte
ccdB	Protéine de toxicité chez <i>Escherichia coli</i>
Co-IP	Co-immunoprécipitation
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EST	Expressed Sequence Tags
ETI	Effector Triggered Immunity
HyD	Hybrid Detector (Détecteur Hybride)
hpi	Heures post agroinfiltration

Kb	Kilobase
LB	Left Border
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
<i>Mlp</i>	<i>Melampsora larici-populina</i>
NLR	Nucleotide-binding Leucine Rich domains
pb	Paires de bases
PAMPs	<i>Pathogens Associated Molecular Patterns</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMT	Photomultiplier tube (tube photomultiplicateur)
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PTI	PAMP Triggered Immunity
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RB	Right Border
RFP	Red Fluorescent Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
SP	Signal peptide
SPC	Signal peptide complet
SPP	Signal peptide partiel
TBBT	Tampon Trans-Blot Turbo
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
WB	Western Blot

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celcius
g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
mL	Millilitre
μL	Microlitre
M	Molaire
mM	Millimolaire
μm	Micromètre
%	Pourcentage
u.a.	Unités d'absorbance
xg	Multiple de la force de la gravité

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Concepts d'immunité

L'immunité, selon sa définition élargie, consiste en l'« ensemble des mécanismes de défense d'un organisme contre les éléments étrangers à l'organisme, en particulier les agents infectieux (virus, bactéries ou parasites) » (Larousse, 2022). Cette définition, certes large, est autant véridique pour les agents pathogènes que pour les organismes complexes qu'ils infectent. Notamment, les organismes unicellulaires comme les bactéries ont évolué afin de pouvoir se défendre contre les bactériophages grâce à un système de défense nommé CRISPR, ou *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (Ishino et al., 1987). En bref, le microorganisme arrive à intégrer des petits fragments de l'ADN de son assaillant au sein de son propre génome, entre des séquences répétées et inversées, afin de le reconnaître et le détruire lors d'une infection ultérieure (Barrangou et al., 2007). Ce type de système immunitaire, quoique rudimentaire, démontre une certaine efficacité contre les menaces auxquels les organismes procaryotes font face.

Les organismes plus complexes, comme l'homme, sont dotés de systèmes immunitaires comprenant de multiples paliers. La première ligne de défense est nommée innée, ou non spécifique et est composée de plusieurs barrières physiques. Celles-ci sont composées principalement par des cellules épithéliales, de mucus et de métabolites axées sur la défense et l'attraction de cellules immunitaires (Chaplin, 2010). Par exemple, l'activation de la cascade protéique du complément permet entre autres de lyser les cellules des agents pathogènes et d'attirer les phagocytes au site de l'infection afin d'éliminer leurs restes (Sarma et Ward, 2011). La deuxième ligne de défense, quant à elle, est spécifique et basée sur la reconnaissance du soi, des antigènes d'organismes étrangers, des cellules immunitaires spécialisées et des éléments de régulation génétique. Une fois la reconnaissance d'un pathogène établi, une cellule immunitaire est conservée à titre de

cellule mémoire jusqu'à la fin de la vie de l'hôte et est prête à resurgir en cas de besoin (Chaplin, 2010). Ces deux barrières agissent conjointement et offrent une défense immunitaire robuste chez l'homme. Cependant, l'immunité retrouvée chez les plantes est bien différente de celle observée chez *Homo sapiens*. Devant tout de même résister aux différentes conditions environnementales et microorganismes, les plantes ont ainsi évoluées afin de se défendre autant au niveau des stress biotiques et abiotiques. Celles-ci disposent donc de deux niveaux d'immunité, soit non-spécifique, et, induite par le biais de pathogènes.

1.1.1 Immunité naturelle et non-spécifique

Les plantes sont constamment soumises aux conditions environnementales et en sont directement affectées. En effet, la quantité d'eau disponible, la concentration en sels, la présence de métaux lourds et le rayonnement ultraviolet sont parmi les stress abiotiques causant de lourdes pertes agricoles annuelles (He et al., 2018; Wang et al., 2003; Wani et al., 2016). En plus de devoir faire face à ces menaces, celles-ci sont constamment exposées à la présence de plusieurs groupes de pathogènes présents dans l'environnement. Notamment, elles doivent être en mesure de reconnaître les processus d'infections contre les virus, les bactéries et les champignons en plus de pouvoir se défendre contre chaque type de microorganismes. Les phytopathogènes sont classés selon trois grands groupes basés sur le type d'infection qu'ils engendrent (Jh, 2015). Les nécrotrophes sont des microorganismes qui tuent leurs hôtes afin de se nourrir de leurs tissus pour se développer. Les hémibiotrophes quant à eux sont des pathogènes qui utilisent les ressources de l'hôte pour croître et finissent par le tuer lors d'un stade d'infection ultérieur. Les biotrophes, eux, utilisent les ressources de leurs hôtes afin de pouvoir se développer et poursuivre leur cycle de croissance et d'infection. En règle générale, les phytopathogènes sont majoritairement biotrophes (ex : *Melampsora larici-populina*, décrit au point 1.3) et nécrotrophes (*Botrytis cinerea* organisme causant la pourriture grise). Les virus phytopathogènes sont quant à eux plus communément associés au mode d'infection hémibiotrophe. En effet, ceux-ci utilisent les ressources de l'hôte pour se multiplier et

infectent ensuite de nouvelles cellules par la lyse des cellules les contenant (Dou et Zhou, 2012; Guttman et al., 2014; Pusztahelyi et al., 2015; Wen, 2013).

Afin de prévenir les infections sans même devoir initier une défense immunitaire cellulaire, les végétaux disposent d'une première ligne de défense qui regroupe des mécanismes chimiques et structuraux (Hammond-Kosack et Jones, 1997; Jh, 2015). Les mécanismes dits « passifs » regroupent deux classes de défense; les structures constitutives à l'espèce végétale et les défenses biochimiques. Ces deux types de mécanismes ont pour but de prévenir l'infection par les pathogènes (Laluk et Mengiste, 2010). Par exemple, les cellules épithéliales sont recouvertes d'une cuticule cireuse, permettant de limiter l'accumulation d'eau qui est nécessaire pour la germination de spores infectieux en plus de limiter le contact cellulaire direct avec les pathogènes (Serrano et al., 2014). De plus, les cellules végétales sont équipées de paroi cellulaire robuste et contenant une variété de molécules chimiques prêtes à être libérées lors d'une éventuelle infection (Guest et Brown, 2005). Les mécanismes biochimiques quant à eux regroupent plusieurs groupes de métabolites spécialisés qui sont produites lors de la détection de blessures et qui agissent à titre d'agents antibiotiques. Notamment, elles peuvent libérer des monoterpénoïdes et des sesquiterpénoïdes qui sont des molécules fragrances et comprises dans certaines préparations d'huiles essentielles. Elles peuvent même produire des alcaloïdes, molécules reconnues pour leurs rôles variés, mais aussi pour leurs effets toxiques chez les insectes et de prévention d'attaques en provenance des bactéries et des champignons (Guest et Brown, 2005; Hammond-Kosack et Jones, 1997; Reyes-Escogido et al., 2011). Ces mécanismes passifs représentent quelques exemples recensés chez différentes espèces de végétaux et agissent de concert afin de minimiser l'effet des différents stress qui leur sont infligés.

Or, les microorganismes ne sont pas uniquement nocifs pour les plantes. Afin de s'adapter aux différents stress biotiques et abiotiques, les premiers végétaux terrestres ont développé au cours de leurs évolutions des relations symbiotiques avec les champignons présents au niveau de la rhizosphère (Lee et al., 2012). Ces relations bénéfiques dites mutualistes fournissent des avantages aux deux partis. Les mycorhizes augmentent la

nutrition en augmentant l'accessibilité aux minéraux et à l'eau en plus de promouvoir la croissance et la résistance à des maladies. Le champignon quant à lui reçoit des molécules en provenance de la plante qui sont nécessaires à son développement et à sa reproduction (Bonfante et Genre, 2010; Sally E. Smith, 2008). En revanche, même avec cette première barrière d'immunité, les végétaux restent la cible de plusieurs types de pathogènes qui peuvent être nocifs. Ceux-ci disposent donc de mécanismes de défense cellulaire pouvant générer des réactions d'immunité complexes et très spécifiques au niveau moléculaire.

1.1.2 Immunité induite spécifique et non spécifique

Deux niveaux d'immunité spécifique sont observés lorsqu'un phytopathogène arrive à infecter une plante ; une défense histologique et une défense biochimique. Les mécanismes de défense engendrés au niveau histologique visent à limiter l'avancée de l'infection au sein de la plante. La lignification est un processus lors duquel la lignine est polymérisée au niveau de la paroi cellulaire. Cette structure est constituée de plusieurs milliers de monomères phénoliques qui sont assemblés afin de limiter l'accès aux cellules par le pathogène. Cette structure est rigide, insoluble et pratiquement indigestible, faisant en sorte que les nutriments et les métabolites recherchés par le pathogène sont inaccessibles (Jh, 2015; Jones et Dangl, 2006). Un autre mécanisme inductible au niveau histologique est associé à la déposition de gomme végétale dans les espaces intercellulaires. La substance visqueuse inhibe la prolifération ainsi que l'absorption de nutriments par les cellules infectieuses. Ce premier type de défense repose sur des éléments constitutifs qui sont activés uniquement lorsque la plante est en situation de défense active. Cette réponse peut être couplée aux mécanismes cellulaires et biochimiques afin d'assurer une défense systémique contre une menace biologique.

Le niveau d'immunité biochimique est quant à lui très spécifique et repose sur une série d'événements biochimiques et génétiques. Ceci débute lorsque la plante détecte des structures associées aux microorganismes appelés *Microbe/Pathogens Associated Molecular Patterns* (MAMPs/PAMPs) grâce à des récepteurs de *Pathogens Recognition Receptors* (PRRs) au niveau de la membrane cellulaire externe. Les motifs reconnus par

les récepteurs extracellulaires incluent la flagelline bactérienne, la chitine et les *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs). La détection de ces molécules peut ultimement activer la première ligne de défense, soit la *PAMP Triggered Immunity* (PTI) (Figure 1.1) (Mogensen, 2009; Zipfel et Felix, 2005). La PTI active une réponse immunitaire rapide incluant la fermeture des stomates, l'entrée d'ions Ca^{2+} dans le cytosol et l'activation des voies *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Jeworutzki et al., 2010; Nguyen et al., 2021; Nomura et al., 2012; Ranf et al., 2011). Cette cascade enzymatique provoque alors la transcription de gènes reliés à la défense en plus de la production des espèces réactives d'oxygène (*Reactive Oxygen Species*) et induire la déposition de callose à l'interface entre la membrane et la paroi cellulaire (Wang et al., 2019; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2012). Cette première réponse peut cependant être déjouée par les pathogènes grâce au relâchement de protéines effectrices.

Les cellules végétales disposent d'une seconde ligne de défense, soit l'*Effector Triggered Immunity* (ETI), basée sur des protéines de reconnaissance des effecteurs qui comportent deux domaines conservés. Le premier est le domaine *Nucleotide-Binding* (NB) et le second est le *Leucine-Rich Repeat* (LRR) qui se combinent pour former les NLRs (*Nucleotide-binding Leucine Rich domains*). La diversité des NLRs provient du troisième domaine qui les compose, soit les *Toll-Interleukin-1 Receptor* (TIR) et *Coiled-Coil* (CC) qui sont attachés en position N-terminale de la protéine de reconnaissance (Richard et al., 2018; Van Wersch et Li, 2019). Les NLRs reconnaissent directement ou indirectement les effecteurs libérés par le pathogène, ce qui conduit à une réponse impliquant une réaction d'hypersensibilité (HR) et ultimement, à la mort cellulaire (Dangl et Jones, 2001; Gao et al., 2017; Zavaliev et al., 2020).

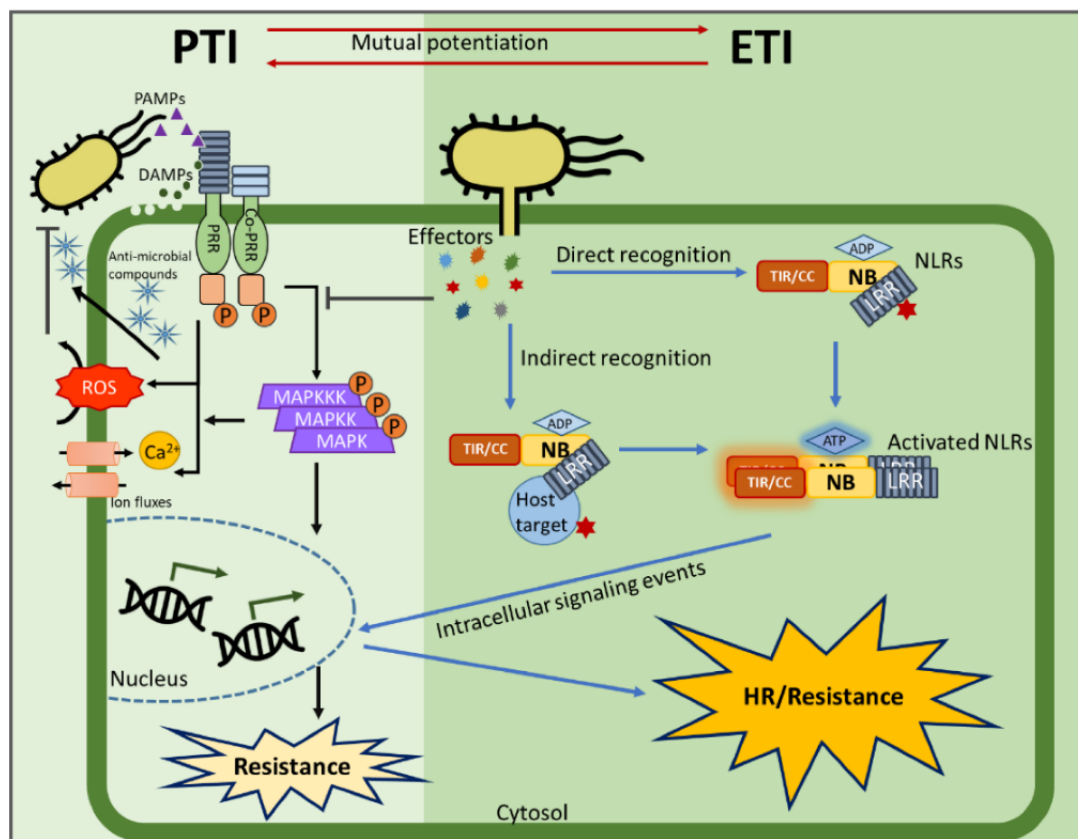


Figure 1.1 Représentation schématisée de la *PAMP-Triggered Immunity* et de l'*Effector Triggered Immunity* selon (Nguyen et al., 2021).

La réponse reliée à la PTI est indiquée par les flèches noires et débute par la reconnaissance du pathogène par les PAMPs. Ceci active les MAPK, fait entrer le calcium dans les cellules et active la production de ROS, réduisant la progression de l'infection. La voie de l'ETI est représentée par les flèches bleues et débute par la reconnaissance des effecteurs par le biais des NLRs. Ceci active alors des gènes de résistance et conduit à la réponse d'hypersensibilité.

Lors d'une attaque par un pathogène, la première réponse qui est mise de l'avant est la PTI et lorsque celle-ci est déjouée, l'ETI prend le relais afin de poursuivre la réponse immunitaire. Ainsi, l'immunité associée à la PTI a longtemps été perçue comme la première approche contre l'invasion et lorsque l'ETI était initiée, elle n'avait que très peu d'effets pendant la réponse reliée aux effecteurs. Cependant, des études transcriptomiques tendent à démontrer que la PTI et l'ETI sont reliées et qu'elles agissent ensemble afin de protéger les plantes en situation d'infection (Figure 1.2) (Caldo et al., 2004; Tao et al., 2003). Récemment, deux équipes de chercheurs indépendants ont démontré que la réponse

immunitaire qui se base sur l'action des NLRs requérait l'activation des PRRs pour être amorcée (Ngou et al., 2021; Yuan et al., 2021). Selon les expériences du groupe Ngou et al., la signalisation des PRRs par la voie de la PTI accroît la production de ROS pendant la réponse induite par les effecteurs. La *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D* (RBOHD) est une enzyme exprimée pendant la phase d'ETI et régule la production des espèces réactives d'oxygène. Le mutant *rbohd* d'*Arabidopsis thaliana*, qui présente une déficience au niveau de la PTI, a démontré un phénotype de susceptibilité au pathogène *Pseudomonas syringae* DC3000 exprimant le gène *avrRpt2*. Les conclusions de cette expérience suggèrent que RBOHD est un élément reliant la PTI et l'ETI. La production de ROS pendant la phase ETI est médiée par la phosphorylation de la protéine BIK1, qui est une kinase associée à la voie de la PTI (Ngou et al., 2021). Le groupe de Yuan et al. a effectué des expériences avec un récepteur de la PTI similaire à BIK1, soit le *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor* et les protéines kinase MAPK3 et MAPK6. Ceux-ci ont remarqué que la réponse immunitaire était augmentée lorsque la plante était en contact avec un traitement bactérien exprimant la protéine *avrRpt2*. Ces données suggèrent que l'ETI a un rôle dans la signalisation, la force et l'intensité de la réponse associée à la PTI. Or, la PTI est tout autant importante et régule aussi la force de la réponse associée aux effecteurs (Yuan et al., 2021). Ultimement, les mécanismes enclenchés par l'ETI conduisent à la résistance systémique acquise (SAR) et entraînent une réponse spécifique contre les effecteurs qui sont reconnus par la plante (Zhang et al., 2018). Ces mécanismes basés sur la reconnaissance des pathogènes et des protéines effectrices requièrent la collaboration de plusieurs autres compartiments cellulaires afin de produire une réponse immunitaire robuste.

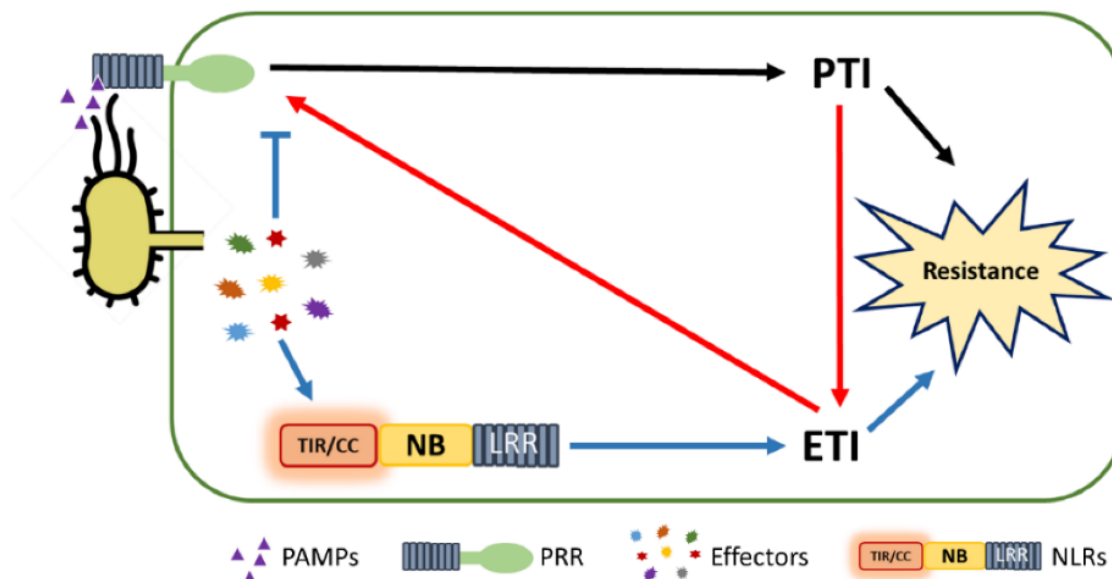


Figure 1.2 Représentation de la relation synergique entre les réactions de PTI d'ETI (Nguyen et al., 2021).

La réponse aux pathogènes lors de la phase PTI est montrée par les flèches noires et celle de l'ETI par les flèches bleues. Les flèches rouges indiquent la communication entre la PTI et l'ETI et que la PTI a un fort impact sur l'intensité de l'ETI.

1.2 Le chloroplaste au sein de la défense

Les mécanismes de défense mentionnés plus tôt sont nombreux et requièrent la coopération de plusieurs organelles afin d'être mis de l'avant. La régulation de ceux-ci repose notamment sur la communication entre le noyau, le réticulum endoplasmique, la membrane cellulaire et le chloroplaste. Ces organelles sont au cœur de la régulation et de la synchronisation de la réponse immunitaire induite spécifique et non spécifique (Bobik et Burch-Smith, 2015; Caplan et al., 2015; Nomura et al., 2012; Padmanabhan et Dinesh-Kumar, 2010; Serrano et al., 2016). Le chloroplaste est notamment responsable de la production de plusieurs molécules d'intérêt au cœur de la défense, ce qui le rend l'étude de son fonctionnement en situation d'attaque très importante afin de comprendre comment les pathogènes arrivent à échapper à celles-ci.

1.2.1 Le chloroplaste

Le chloroplaste est une organelle photosynthétique essentielle pour la croissance, la synthèse de plusieurs métabolites ainsi que la défense immunitaire. Cette structure proviendrait de l'endosymbiose d'une cyanobactérie par une cellule eucaryote, s'étant produite il y a plus d'un milliard d'années (McFadden et al., 1994) (Figure 1.3). Celui-ci est composé d'une double membrane, séparant son contenu du reste de la cellule, mais qui grâce à des transporteurs protéiques (*Translocon on the Inner Chloroplast membrane* et *Translocon on the Outer Chloroplast membrane* TIC/TOC), permet un grand échange de métabolites et de protéines (Shi et Theg, 2013). En son sein se retrouvent plusieurs structures avec des fonctions précises, notamment les thylakoïdes, qui impliqués de la production d'adénosine triphosphate (ATP), de sucres et d'oxygène lors du cycle de Calvin (Bose et al., 2017; Chan et al., 2016). Il contient aussi des granules d'amidon, structure d'entreposage de ce polysaccharide complexe (Hizukuri et al., 1981; Vandromme et al., 2019) et des plastoglobules, qui contiennent des triacylglycérols, des caroténoïdes, des esters phytyliques acides, du tocophérol ainsi que de nombreuses quinones (Bhuiyan et al., 2016; Gaude et al., 2007; Lippold et al., 2012; Piller et al., 2011; Zbierzak et al., 2009). Toutes ces structures, voués à la production et l'entreposage de molécules d'intérêt ne sont que quelques raisons qui font en sorte que ce compartiment cellulaire peut représenter une cible intéressante pour un pathogène.

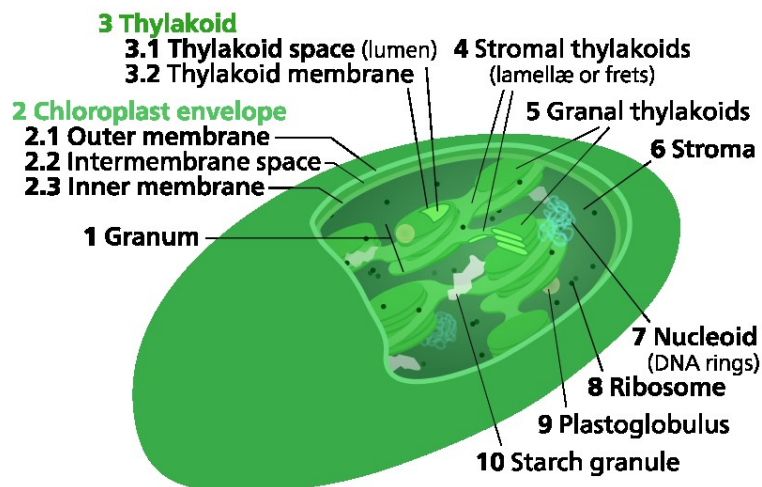


Figure 1.3 Illustration schématisée des différentes structures et compartiments retrouvés dans les chloroplastes (Kelvinsong, 2013).

1.2.2 Les nucléoïdes chloroplastiques

Le génome chloroplastique s'est considérablement rapetissé au fil du temps, préconisant le génome nucléaire à celui de la cyanobactérie, afin d'établir une relation symbiotique robuste pour la cellule eucaryote (Bogorad, 2008; Kobayashi et al., 2015; Timmis et al., 2004). Le génome chloroplastique possède une taille réduite et ne code que pour des gènes critiques impliqués dans la photosynthèse ainsi que la biogenèse de nouveaux chloroplastes (Allen, 2003; Stern et al., 2010; Timmis et al., 2004). Ce génome chloroplastique (cpDNA) n'est pas libre dans le stroma, mais fait partie d'un complexe protéique appelé nucléoïde chloroplastique. Ce sous-compartiment cellulaire, formant des petits points dans les chloroplastes, peut être observé grâce à un colorant se fixant à l'ADN (Figure 1.4).

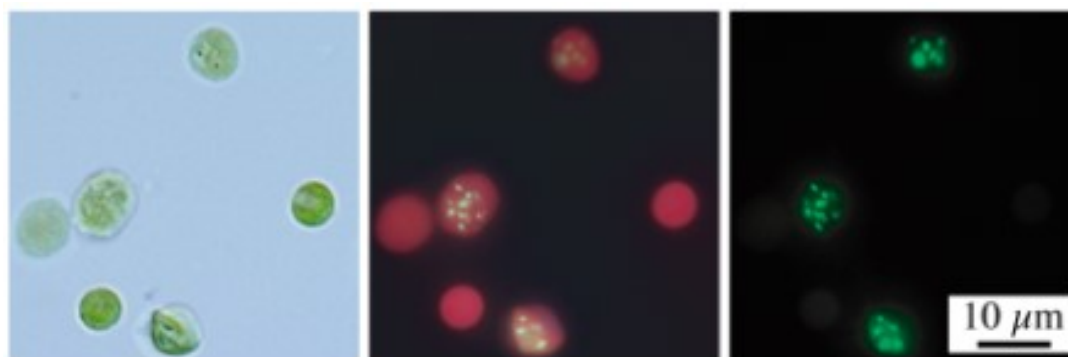


Figure 1.4 Visualisation par microscopie confocale de la protéine membranaire PND-GFP (*Plastid Envelope DNA-binding*) localisée au niveau des nucléoïdes chloroplastiques (Terasawa et Sato, 2005).

Les rôles de cette structure sont multiples; réplication du cpDNA, la transcription de l'ARN et le contrôle de la descendance des chloroplastes (Kuroiwa, 1991; Pfalz et Pfannschmidt, 2013; Pfalz et Pfannschmidt, 2015; Powikrowska et al., 2014; Sakai et al., 2004). Dans les plantes supérieures, incluant le genre *Nicotiana*, le nombre de nucléoïdes chloroplastique estimé est d'environ de 8 à 40 par chloroplaste et chacun d'entre eux peut contenir jusqu'à 10 copies du cpDNA (Kuroiwa, 1991). Afin de se diviser et se maintenir, de nombreuses protéines au sein du nucléoïde chloroplastiques ont été étudiées en fonction du stade de développement des chloroplastes (Pfalz et Pfannschmidt, 2013) (Figure 1.5).

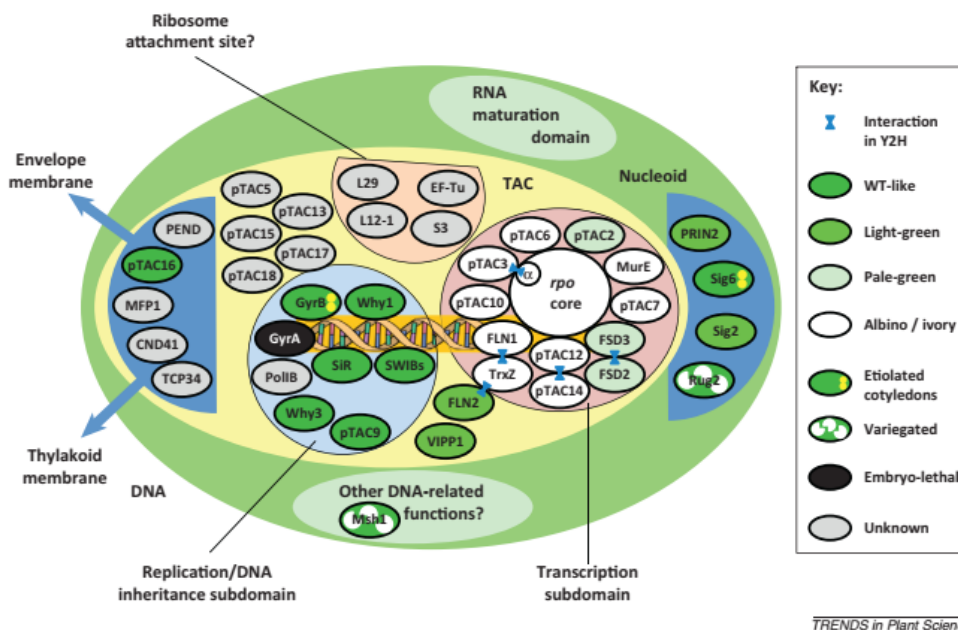


Figure 1.5 Représentation du nucléoïde chloroplastique et ses divers compartiments selon les différents stades de développement du chloroplaste (Pfalz et Pfannschmidt, 2013).

Dans la phase d'activité chloroplastique intense, les nucléoïdes se divisent extensivement tout en étant attachés à la membrane des thylakoïdes. Notamment, la protéine *Plastid Envelope DNA-binding* (PEND) est un dimère de deux peptides de 70 kDa qui possèdent un domaine en N-terminal se liant à la séquence d'ADN "TAAGAAGT" en plus de contenir un domaine transmembranaire en C-terminal (Sato et al., 1993; Sato et Ohta, 2001). Les protéines *Sulfite Reductase* (SiR) (Sato et al., 2001), WHIRLY (Krupinska et al., 2014), et *Switch/sucrose non-fermentable complex B* (SWIB)-4 (Melonek et al., 2012), sont quant à elles au cœur de la réplication, la compaction et de l'organisation du cpDNA. La protéine WHIRLY, communément appelé WHY1, est autant retrouvée dans le noyau que dans les chloroplastes, indiquant qu'elle est mobile ou activement maintenue dans les deux compartiments cellulaires (Grabowski et al., 2008; Isemer et al., 2012). Les fonctions de cette protéine sont distinctes dépendamment de l'organelle où elle se retrouve. Dans le noyau, WHY1 régule l'expression des gènes de défense en présence de stress biotique alors que dans le chloroplaste, elle est responsable de l'organisation du nucléoïde, assure la réplication du cpDNA et joue un rôle dans la germination (Czarnecki et al., 2012;

Isemer et al., 2012; Lepage et al., 2013). Plus récemment, les protéines WHY, retrouvées en trois variantes chez *Arabidopsis thaliana*, se sont vue découvert des rôles de stabilisation de l'ADN simple brin lors de sa réplication (Taylor et al., 2022). De plus, des études de transcriptomique d'*Arabidopsis thaliana* ont démontrées des niveaux d'expression supérieur des gènes codant pour les protéines WHY lorsqu'exposés à des stress abiotiques, telle la salinité et la sécheresse (Akbulak et Filiz, 2019; Yan et al., 2020), la chaleur (Zhuang et al., 2020), les stress oxydatifs (Tunc-Ozdemir et al., 2009), et une infection par le phytopathogène *Botrytis cinerea* (Akbulak et Filiz, 2019). Un phénomène similaire est observable avec SWIB lorsqu'une suspension cellulaire de protoplastes d'*A. thaliana* est en présence de polyéthylène glycol, agent simulant un stress hydrique chez les cellules végétales (Marondedze et al., 2019).

Ces expériences simulant des stress chez les végétaux démontrent que la compréhension des rôles du nucléoïde chloroplastique est en constante évolution. Ce compartiment joue un grand rôle au niveau de la croissance et de la régulation de l'expression des gènes chloroplastiques, mais ses impacts dans la défense immunitaire sont encore peu élucidés. De plus, le transport associé à ces protéines pouvant se retrouver au niveau du noyau, de la mitochondrie et du chloroplaste doit encore être exploré afin de comprendre leur polyvalence et leur importance. Cependant, plusieurs messagers et métabolites chloroplastiques jouent un grand rôle déjà connu et qui est important pour la protection des cellules végétales en situation d'infection par un phytopathogène.

1.2.3 Rôles et métabolites produits lors de la défense

Le chloroplaste est impliqué non seulement dans la synthèse et l'entreposage de plusieurs métabolites d'intérêt, mais aussi dans la production de métabolites de défense tels l'acide salicylique (SA), l'acide nitrique (NO), l'acide jasmonique (JA) et les ROS.

Les gènes impliqués dans la synthèse de l'acide salicylique sont hautement régulés et sa synthèse est activée majoritairement pendant la PTI et l'ETI en raison de ses impacts négatifs sur la condition normale de croissance des plantes (Chandran et al., 2014;

Ishihara et al., 2008; Mishina et Zeier, 2007; Pajerowska-Mukhtar et al., 2012). Ce métabolite, provenant de la voie de synthèse de l'isochorismate chloroplastique, est transporté dans le cytosol par le biais du transporteur ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5 (EDS5). Il est ensuite conjugué au glutamate par l'amidotransférase PBS3 (avrPphB SUSCEPTIBLE3) pour former l'isochorismate-9-glutamate, qui se décompose spontanément en acide salicylique (Littlejohn et al., 2021; Rekhter et al., 2019; Torrens-Spence et al., 2019; Warren et al., 1999). L'augmentation de sa concentration inhibe les *Nonexpressor of Pathogenesis-Related gene* NPR-3 et NPR-4 et active NPR1, qui active à son tour la transcription de gènes clés dans la défense immunitaire (Ding et al., 2018). L'acide salicylique joue aussi un rôle d'inhibiteur servant à neutraliser les ROS provenant des catalases et des peroxidases de phytopathogènes (Durner et Klessig, 1995; Zhang et al., 2016). La SA est aussi une molécule de signalisation clé lors de la défense contre les phytopathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Pieterse et al., 2012) en plus d'avoir une implication limitée dans la réponse contre les nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Cette molécule agit à titre de régulateur central de la défense en interagissant avec des voies de signalisation hormonales, notamment la voie du jasmonate, afin de réguler finement et efficacement la réponse immunitaire mise en branle (Thaler et al., 2012; Vlot et al., 2009).

Les jasmonates sont des hormones dérivées des lipides dont la synthèse débute dans le chloroplaste pour se terminer dans le peroxisome (Serrano et al., 2016). Contrairement à l'acide salicylique, les jasmonates sont libérés lors d'attaques par des pathogènes nécrotrophes, des nématodes et même d'insectes herbivores (Pieterse et al., 2012). La réponse en cas d'attaque par un phytopathogène n'est pas la même en fonction de son type d'infection. Ce phénomène d'antagonismes entre les voies de la SA et des JA a été éclairci pour la première fois chez la tomate et a permis de démontrer que la résistance à un pathogène nécrotrophe corrèle directement avec une sensibilité accrue aux biotrophes (Gimenez-Ibanez et Solano, 2013; Grant et Lamb, 2006; Spoel et al., 2003; van Wees et al., 1999). L'interaction entre ces deux voies permet alors d'optimiser et de sélectionner la voie à induire en fonction du type de phytopathogène provoquant l'infection (Bostock, 2005; Kunkel et Brooks, 2002; Verhage et al., 2010). Ces deux molécules immunitaires

sont produites initialement dans le chloroplaste et ne sont pas les seules molécules pouvant avoir un impact sur la réaction de défense végétale.

Les espèces réactives en oxygène (ROS) sont produites en grande quantité dans le chloroplaste. Leur production est engendrée par la photoréduction de l'oxygène par le photosystème I (PSI) et par la plastoquinone qui est l'accepteur d'électrons du photosystème II (PSII) compris dans la chaîne de transport des électrons (Dietz et al., 2016; Vetoshkina et al., 2017). Le produit généré, soit l'oxygène sous la forme de singulet ($^1\text{O}_2$), est formé dans le PSII par le transfert d'énergie provenant de la chlorophylle excitée (Dogra et al., 2019; Mullineaux et al., 2018) et est un des ROS les plus impliqués dans la réponse ETI (Zoeller et al., 2012). D'autres formes d'espèces réactives d'oxygène chloroplastiques (cROS) sont importantes pendant la réponse d'hypersensibilité (HR), soit le peroxyde (H_2O_2), le superanion radical d'oxygène (O_2^-) et même le radical hydroxyle (OH^\cdot) (Pospíšil, 2012). Des études de transcriptomique ont démontré que la perception de PAMPs mène à une suppression rapide de l'expression de gènes photosynthétiques encodés dans le noyau et est ensuite suivie par la production massive de cROS provenant de la chaîne de transport des électrons (de Torres Zabala et al., 2015; Lewis et al., 2015). Il fut démontré, dans les deux premières heures suivant l'activation de la PTI, que le transcriptome indiquait une augmentation de l'expression de gènes reliés à la photosynthèse, la production d'acide salicylique et de ROS chloroplastiques (Lewis et al., 2015). Les molécules produites en abondance par le chloroplaste ont une grande importance dans la mise en branle des défenses immunitaires végétale. Cette organelle représente donc une cible stratégique avec laquelle interférer pour qu'un pathogène puisse arriver à croître et se développer aux dépens de son hôte. Un résumé de ces processus est illustré et détaillé à la figure 1.6 (Büttner, 2016; Campos et al., 2014; Ding et al., 2018; Lefevre et al., 2020; Liu et al., 2016; Pokotylo et al., 2022; Stael et al., 2015; Wang et al., 2022).

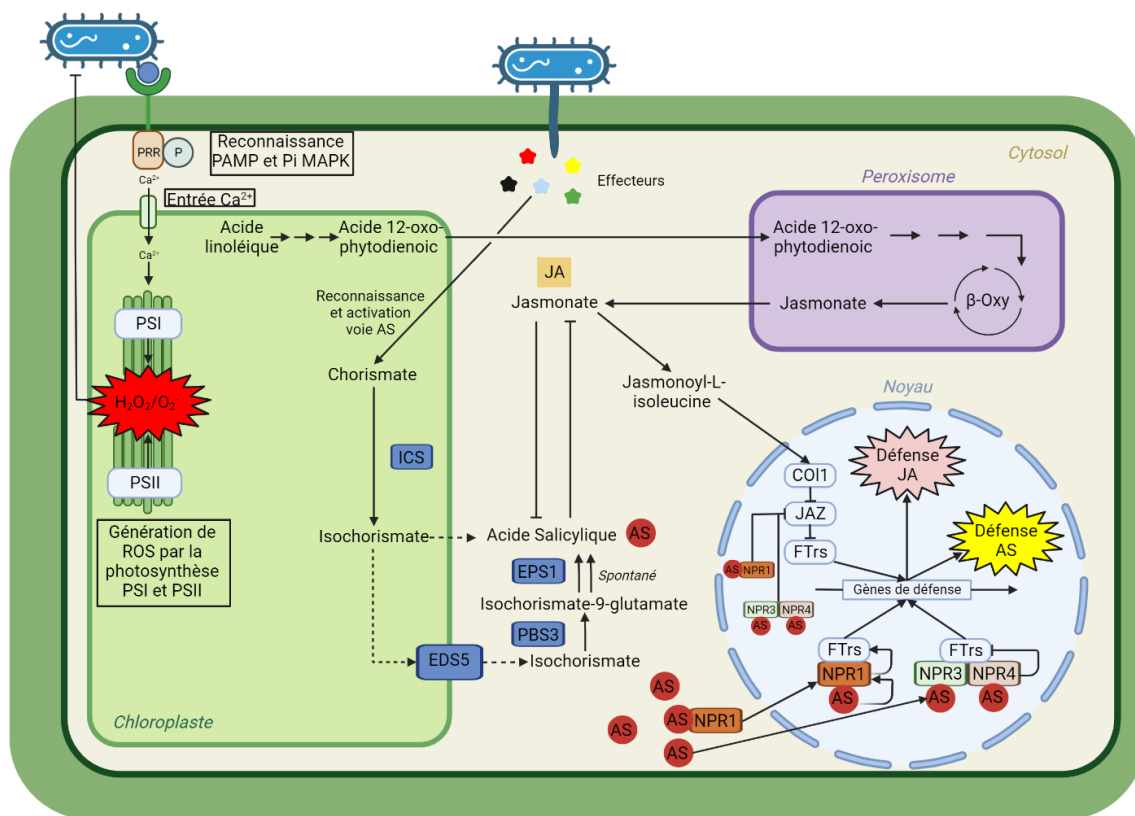


Figure 1.6 Illustration simplifiée du rôle du chloroplaste dans la défense immunitaire.

Lors de la reconnaissance des effecteurs, une activation de la voie du chorismate est mise de l'avant jusqu'à l'obtention d'acide salicylique. L'acide salicylique peut alors se fixer au *Nonexpressor of Pathogenesis-Related gene 1, 3 et 4* (NPR1, NPR3 et NPR4) et activer des facteurs de transcriptions impliqués dans la défense immunitaire. La voie du jasmonate est quant à elle activée par le biais de l'inhibition des protéines *Coronatine-insensitive 1* (COI1) et *Jasmonate-ZIM Domain* (JAZ), provoquant la synthèse *de novo* de jasmonate et permettant d'obtenir une résistance accrue aux pathogènes nécrotrophes. Les *Reactive Oxygen Species* (ROS) sont quant à eux produits par la chaîne de transport des électrons lors de la reconnaissance du pathogène par les *Pathogen Recognition Receptors* (PRR) et l'entrée de calcium dans le chloroplaste. Les ROS peuvent ensuite interagir avec le pathogène et ralentir la progression de son infection.

1.2.4 Effecteurs chloroplastiques

Les rôles que le chloroplaste joue dans la défense immunitaire font de lui une cible de choix pour les phytopathogènes. Les effecteurs, qu'ils soient bactériens, viraux ou fongiques, peuvent moduler l'activité chloroplastique directement ou indirectement.

Pour ce faire, ils peuvent être transloqués directement dans l'organelle et interagir avec des protéines en son sein (Littlejohn et al., 2021). L'effecteur HopI1 (*Hypersensitive response and pathogenicity Outer Protein*) fut un des premiers effecteurs identifiés, provenant de la bactérie *Pseudomonas syringae*, se dirigeant au niveau du chloroplaste. Cet effecteur comporte un signal de localisation chloroplastique et un domaine pouvant se fixer à la *Heat shock protein 70* (HSP70) retrouvé dans le chloroplaste. *In planta*, l'effecteur interagit avec HSP70 et altère la structure des thylakoïdes, ce qui réduit l'accumulation d'acide salicylique et diminue la réponse immunitaire (Jelenska et al., 2007; Littlejohn et al., 2021). HopN1 quant à lui inhibe l'accumulation de ROS, le dépôt de callose et la réponse d'hypersensibilité (HR) (López-Solanilla et al., 2004; Rodríguez-Herva et al., 2012). Il est localisé au niveau de la membrane des thylakoïdes, interagit et dégrade la protéine PsbQ au sein du photosystème II, ce qui réduit la production d'oxygène, ralentit le transfert d'électrons et inhibe ainsi la production de cROS. L'effecteur A1 RipAL de *Ralstonia solanacearum* a été identifié comme une phospholipase chloroplastique et catalyse le relâchement de l'acide linoléique, qui est le principal précurseur de la voie de synthèse des acides jasmoniques. Ceci a pour effet d'accroître la production des JA et ainsi de supprimer la réponse induite par l'acide salicylique, étant très impliqué dans la phase de PTI chez *Nicotiana benthamiana* (Nakano et Mukaiharu, 2018). Au niveau des effecteurs fongiques, *Pyrenophora tritici-repentis* produit les toxines sélectives d'hôtes ToxA et ToxB qui expriment un mode d'attaque nécrotrophe sur les plants de blé. La toxine ToxA est produite et endocytée dans le chloroplaste où elle induit la mort cellulaire dépendante de la lumière en provoquant l'accumulation de ROS en réduisant la quantité des photosystèmes I et II (Ciuffetti et al., 2010; Kretschmer et al., 2019; Manning et al., 2010; Manning et al., 2009). Les effecteurs d'autres espèces de champignons possèdent des mécanismes d'entrée dans les cellules qui sont différents. En effet, *Melampsora larici-populina* (*Mlp*) montre des séquences homologues au niveau du signal peptide de ses effecteurs et de l'hôte dans lequel ils sont injectés (Lorrain et al., 2019; Lorrain et al., 2018). Notamment, les peptides signaux des effecteurs CTP1, CTP2 et CTP3 (*Chloroplast-Target Proteins*) s'accumulent au niveau du chloroplaste lorsque leur peptide est clivé *in planta* (Petre et al., 2016; Petre et al., 2015). Les effets de ces effecteurs ne sont toutefois pas encore tout à fait connus et

commencent à être étudiés (Germain et al., 2018), mais ces études démontrent que le phytopathogène a évolué et imite le principe de signalisation cellulaire de ses hôtes.

1.3 *Melampsora larici-populina*

Melampsora larici-populina est un phytopathogène faisant partie de la famille des Basidiomycètes, de la classe des Puccinomyces et à l'ordre des Puccinales (Persoons, 2015). Ce champignon biotrophe obligatoire est l'agent responsable de la rouille foliaire du peuplier qui entraîne des pertes énormes dans les plantations mondiales de cette essence d'arbre (Gaouar et al., 2016; Hacquard et al., 2012; Hacquard et al., 2011; Joly et al., 2010; Miranda et al., 2007; Steenackers et al., 1996). Les rouilles, de l'ordre Puccinales, sont composées de plus de 8 000 espèces (Lorrain et al., 2019) et sont les agents causals de pertes énormes de plantes destinées à la consommation humaine (Aime et al., 2006; Cummins et Hiratsuka, 2003; Duplessis et al., 2011). Par exemple, elles infectent le blé (*Triticum aestivum*), le soya (*Glycine max*) et peut à la fois nuire à la production de soya et de café (Dean et al., 2012; Fisher et al., 2012; Snieszko et al., 2012). L'industrie de la bioénergie est aussi affectée par les différentes espèces de rouilles. Notamment, *Mlp* est responsable de lourdes contraintes sur les programmes bioénergétiques basés sur les peupliers domestiques (Rubin, 2008), car ceux-ci ne sont pas résistants à ce phytopathogène (Duplessis et al., 2009; Gérard et al., 2006). Ce champignon est considéré comme un des organismes modèles dans le domaine de la pathologie forestière, car il s'agit de la première rouille dont le génome a été entièrement séquencé en plus de ses deux hôtes (Duplessis et al., 2009; Feau et al., 2007; Hacquard et al., 2012; Hacquard et al., 2011). De plus, *M. larici-populina* est génétiquement très près de *M. lini*, l'agent causal de la rouille du lin, qui est considéré comme l'espèce modèle des rouilles (Hacquard et al., 2012). La reproduction de ceux-ci est différente. *Melampsora lini* se reproduit avec un seul hôte (Bettgenhaeuser et al., 2014) alors que *Mlp* relève d'un cycle complexe impliquant *Larix spp.* et *Populus spp.* (Cummins et Hiratsuka, 2003), et produit cinq types de spores distincts (Hacquard et al., 2011).

1.3.1 Mécanismes de reproduction

Melampsora larici-populina est un champignon microscopique ayant un macrocycle de vie passant par cinq étapes distinctes de sporulation et parasite le mélèze (*Larix spp.*) pour son cycle sexuel et le peuplier (*Populus spp.*) pour son cycle infectieux et de reproduction asexuée (Hacquard et al., 2011) (Figure 1.7).

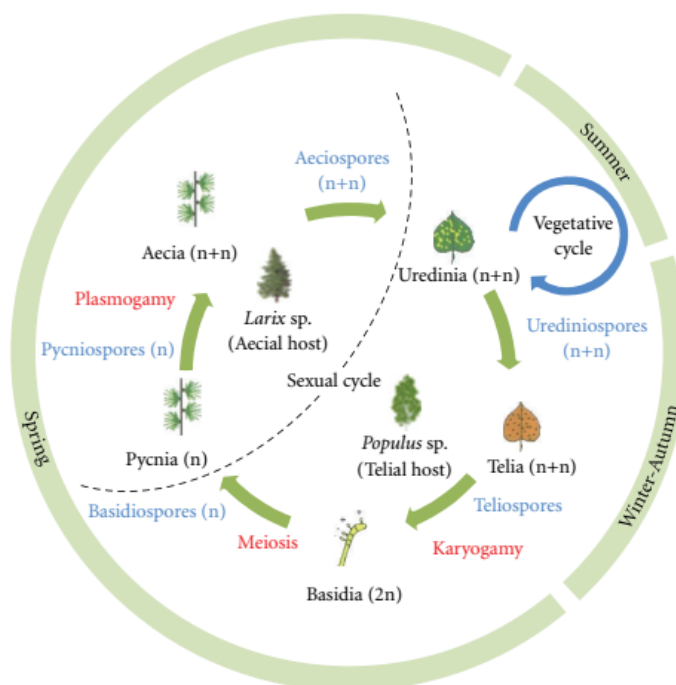


Figure 1.7 Reproduction de *Melampsora larici-populina* grâce à ses cinq types de spores en fonction des différentes saisons (Hacquard et al., 2011).

Le cycle végétatif prend place pendant l'été alors que le cycle de reproduction prend place pendant le reste de l'année.

Le cycle de reproduction s'amorce au début du printemps lorsque les télisporos diploïdes, qui ont subi une caryogamie et la méiose dans du sol contenant des feuilles décomposées de peupliers infectés, produisent des basidiospores haploïdes. Celles-ci, après s'être fait transporter par le vent, se déposent et infectent les aiguilles du mélèze et initient la production de pycniospores. La plasmogamie des spores génère ensuite les aeciospores et celles-ci peuvent, par l'action du vent, infecter le peuplier et se différencier en urediniospores. Cette spore est d'aspect orangée et forme des pustules sur la face abaxiale des feuilles matures, ce qui correspond au symptôme principal de la rouille

foliaire du peuplier. De grandes quantités d'urediniospores sont produites, propagées et infectent à leur tour de nouveaux arbres, exécutant ainsi de nombreux cycles d'infections au cours de l'été. Lors de l'arrivée de l'automne, les pustules présentes sur les feuilles sénescences de peupliers contiennent les téliospores, qui sont prêt pour l'hivernation à venir (Hacquard et al., 2011). Comme les dommages sont essentiellement contenus pendant la phase asexuelle du champignon, l'étude de ses mécanismes d'infection pendant celle-ci ont été mis de l'avant.

1.3.2 Développement et infection

L'infection et la prolifération de *Melampsora larici populina* sont des mécanismes complexes qui requièrent plusieurs jours. Des analyses par microscopie, dans des conditions contrôlées, ont permis d'identifier les différents stades d'évolution du champignon à la surface des feuilles de peuplier (Figure 1.8) (Boyle et al., 2010; Hacquard et al., 2010; Hacquard et al., 2011; Laurans et Pilate, 1999; Rinaldi et al., 2007). L'infection débute lorsque les urediniospores s'hydratent et germent. Celles-ci produisent alors des tubes germinatifs qui s'immiscent dans les stomates de la face abaxiale des feuilles 6 h post inoculation (hpi). Après 12 hpi, des vésicules sous-stomatiques se forment dans le mésophylle et se différencient en premières structures haustoriales après 17 hpi. Si l'implantation est fructueuse, la biomasse fongique continue de s'accroître entre 48 hpi et 96 hpi et amplifie simultanément son réseau d'hyphes dans le mésophylle spongieux. Approximativement 168 hpi (7 jours) après le début de la colonisation, une forte pression provenant de la croissance du champignon provoque une brèche dans l'épiderme abaxial. Ceci conduit ensuite à la formation d'uredinia et provoque la libération d'urediniospores, qui s'accumulent à la surface des feuilles et attendent d'être propagés par le vent à nouveau.

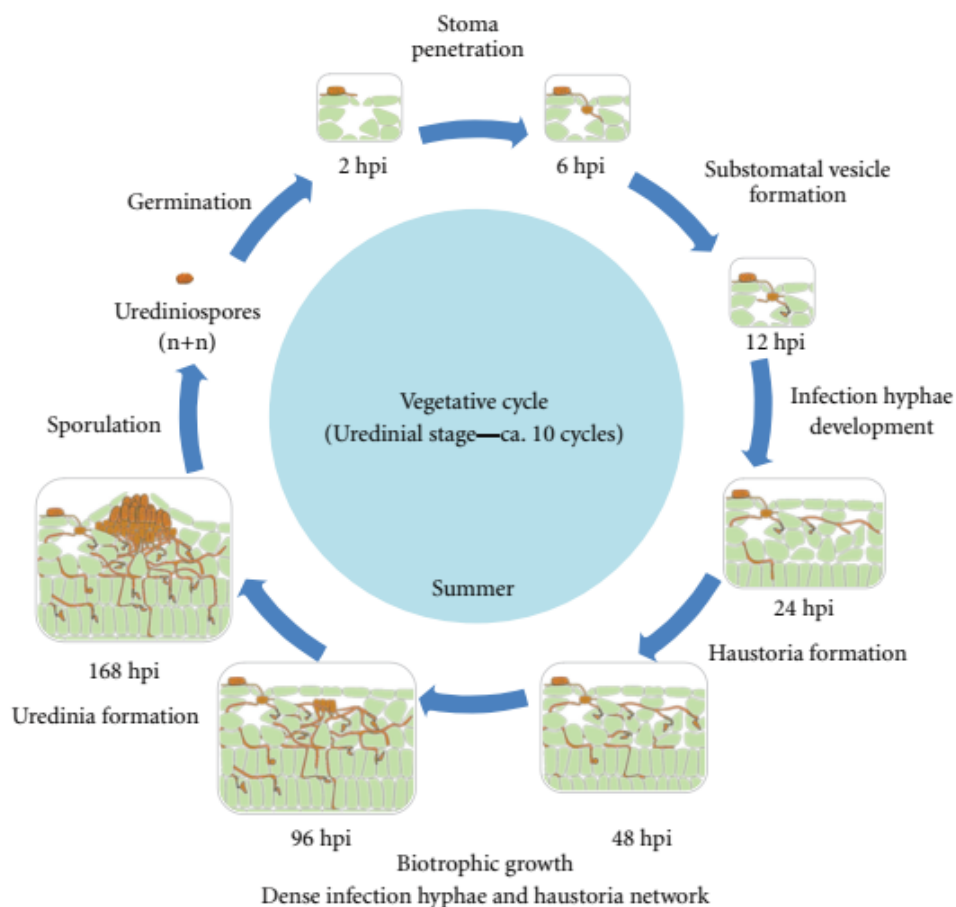


Figure 1.8 Représentation du cycle de vie végétatif et infectieux de *Melampsora larici-populina* (Hacquard et al., 2011).

Stades de développement selon les 7 premiers jours, passant du dépôt de l'urediniospore jusqu'à la formation de l'uredinia permettant d'infecter de nouveaux arbres à proximité.

Les hyphes fongiques sont les structures par lesquelles le pathogène peut établir un lien avec son hôte. Dans ce pathosystème, le champignon est biotrophe obligatoire, ce qui signifie qu'il doit détourner les ressources du peuplier pour arriver à croître et se multiplier. Pour y arriver, ce dernier interfère avec les défenses immunitaires de l'hôte en sécrétant des effecteurs grâce à cette structure spécialisée (Figure 1.9) (Catanzariti et al., 2006; Garnica et al., 2014; Mendgen et al., 2000; Voegelé et Mendgen, 2003; Voegelé et al., 2001).

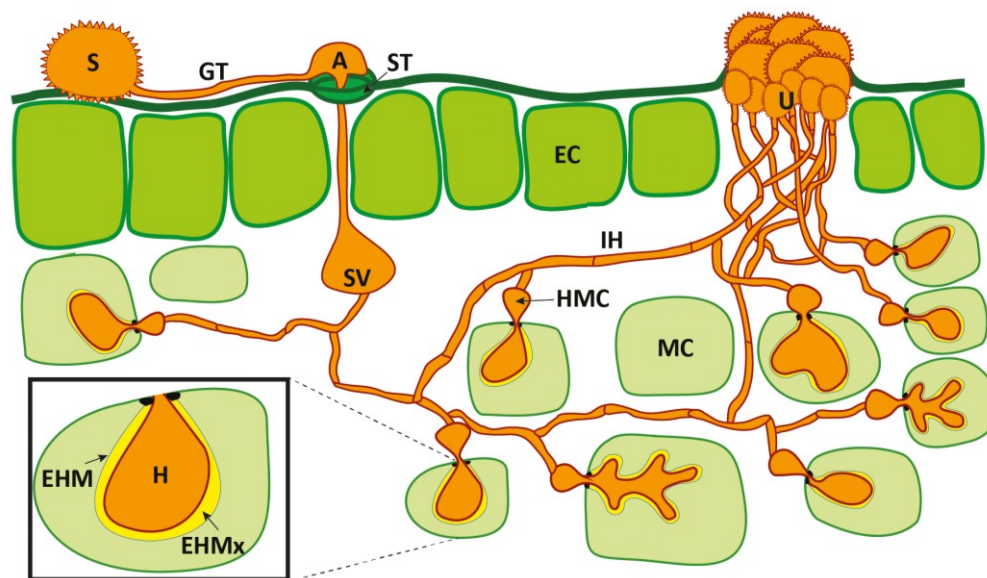


Figure 1.9 Formation détaillée de l'haustorium, structure spécialisée utilisée par *Mlp* lors de son cycle infectieux (Garnica et al., 2014).

Les structures représentées correspondent au spore (S), le tube germinatif (GT), l'apressorium (A), le stomate (ST), la vésicule stomatale (SV), l'hyphe primaire (IH), les cellules du mésophylle (MC), la cellule mère haustoriale (HMC), l'haustorium (H), la matrice haustoriale (EHM) et extrahaustoriale (EHMx) et finalement l'urediniospore (U).

Lorsque le tube germinatif (GT) atteint le stomate (ST), l'apressorium (A) s'installe à sa surface, entre dans la feuille et initie la formation d'une vésicule stomatale (SV). Lorsque cette structure est bien implantée, les hyphes primaires (IH) se propagent et entrent en contact avec celles du mésophylle (MC) en passant par la paroi cellulaire. La cellule mère haustoriale (HMC) peut alors se différencier et pénétrer dans les cellules du mésophylle pour former l'haustorium (H). Celui-ci est séparé du cytoplasme de l'hôte par la matrice extrahaustoriale (EHMx) et la membrane extrahaustoriale dérivée de l'hôte (EHM) (Garnica et al., 2014). C'est par le biais de l'haustorium que les échanges entre le champignon et le peuplier ont lieu, mais encore peu d'études ont mis l'accent sur l'étude des mécanismes du détournement de ressources par le pathogène (Lorrain et al., 2019). Cependant, plusieurs gènes impliqués dans le transport de sucres, d'acides aminés et d'oligopeptides sont fortement surexprimés, démontrant l'importance de la réorientation des métabolites pour la croissance du champignon. Les deux transporteurs les plus exprimés sont respectivement le transporteur d'hexoses HXT1 et la perméase d'acide aminé AAT2, qui sont fortement exprimés dans l'haustorium et qui sont des homologues

provenant de *Uromyces fabae* (Hahn et al., 1997; Voegelé et al., 2001). En plus de jouer un rôle dans la nutrition du champignon, l'haustorium est l'interface par lequel les effecteurs sont sécrétés afin de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte. Les mécanismes associés à l'envoi de ces effecteurs, quant à eux, ne sont pas encore bien compris et caractérisés (Petre et Kamoun, 2014).

1.4 Objectifs et hypothèse du projet de recherche

L'avancée des connaissances reliées aux mécanismes d'action des protéines effectrices est clé dans la compréhension du pouvoir infectieux des pathogènes. L'effectoromique est le domaine d'étude tentant de caractériser de manière fonctionnelle les molécules sécrétées par le pathogène afin de déjouer les défenses immunitaires de son hôte (Gaulin, 2017). L'identification des effecteurs candidats de protéines sécrétées (CSEPs) chez *Melampsora larici-populina* a été effectuée grâce à des analyses génomiques et transcriptomiques. Afin d'être considéré comme effecteur candidat, les protéines identifiées doivent répondre à plusieurs critères. Elles doivent contenir moins de 300 acides aminés, présenter un signal peptide, ne pas contenir de domaines transmembranaires et la présence d'EST (Expressed Sequence Tags) dans les cellules de l'hôte (Duplessis et al., 2011; Hacquard et al., 2010; Hacquard et al., 2012). Une fois cette première identification réalisée, d'autres critères de sélection ont été ajoutés, tel le profil d'expression et l'homologie avec des effecteurs orthologues afin de déterminer s'il était pertinent de les étudier en profondeur (Germain et al., 2018; Petre et al., 2016; Petre et al., 2015).

Lors de travaux antérieurs effectués dans le laboratoire du professeur Germain par l'étudiante au doctorat Claire Letanneur, les CSEPs de *Mlp* ont été classés selon des familles d'homologie de séquence et de spécificité d'hôte. Pour y arriver, des analyses bioinformatiques ont été réalisées à partir des 1 184 CSEPs de *Mlp* afin de valider si certains d'entre eux étaient spécifiques à un des deux hôtes du champignon. Cette première analyse a permis de classer les effecteurs en huit familles regroupant 60 CSEPs aux spécificités d'hôte mixte. Ensuite, ceux-ci ont subi une analyse

phylogénique afin de relever les familles possédant les plus hautes homologues de séquences. Ainsi, quatre familles composées de neuf effecteurs ont démontré des paires d'effecteurs candidats présentant des nœuds terminaux sur un arbre phylogénique, représentant des CSEPs homologues aux profils d'expression spécifiques à l'hôte (HSH). De ces neuf effecteurs candidats, deux d'entre eux, faisant partie de la famille d'homologie 33, sont au cœur de cette présente étude.

Ainsi, la caractérisation des effecteurs 51 690 et 53 845 sera explorée selon trois objectifs. Le premier sera de déterminer avec des outils de bioinformatique si les effecteurs homologues et spécifiques semblent se diriger vers le même compartiment cellulaire en fonction de leur séquence sans peptide signal. Ensuite, leur localisation *in silico* sera comparée avec celle *in planta* par le biais de leur expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana*. Finalement, la recherche de l'impact du peptide signal de l'effecteur 53 845 ainsi que sa localisation cellulaire *in planta* seront aussi étudiée. Ces informations pourront donc permettre d'obtenir une plus grande compréhension de ce couple d'effecteurs homologues aux profils d'expressions spécifiques à l'hôte.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Analyses bio-informatiques des effecteurs

Le processus d'analyses bioinformatiques a été initié avec le logiciel BLAST nucléotides et protéines (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) afin d'obtenir des renseignements généraux sur les effecteurs. Ils ont été implantés par la suite dans d'autres logiciels prédisant leurs localisations cellulaires, la présence de domaines protéiques conservés et la présence de domaines interagissant avec l'ADN et l'ARN.

LOCALIZER (<https://localizer.csiro.au/>) a été utilisé pour prédire la localisation de protéines végétales et d'effecteurs vers le noyau, la mitochondrie ou le chloroplaste. Les logiciels TargetP-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) et SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) ont servi à prédire et identifier la présence d'un signal de localisation peptidique au sein des deux effecteurs. InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) a été utilisé pour vérifier la fonction primaire des effecteurs en recherchant des familles de protéines, des domaines ou des sites protéiques conservés. Les logiciels GYM 2.0 (<http://users.cis.fiu.edu/~giri/bioinf/GYM2/welcome.html>), iDNA-Prot (<http://icpr.jci.edu.cn/bioinfo/iDNA-Prot>) et DNABIND (<https://dnabind.szilab.org/>) ont été consultés afin de rechercher des motifs hélice-coude-hélice se liant à l'ADN et l'ARN.

2.2 Croissance et entretien des plants de *Nicotiana benthamiana*

Des graines de *Nicotiana benthamiana*, ont été déposées sur un sol reconstitué (Fafard, Saint-Bonaventure, Québec, Canada). Après germination, elles ont été transplantées dans un plateau de semence. Les conditions d'incubation dans la chambre

de croissance étaient composées d'une température de 23 °C, un taux d'humidité relative (HR) de 60 % et une photopériode de 14 h de lumière à une intensité lumineuse de $135 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et 10 h d'obscurité. Elles ont été arrosées à raison de deux fois par semaine par capillarité, et avec un supplément d'engrais 20-20-20. Les plantes ont été utilisées après un minimum trois semaines après la transplantation, et ce jusqu'à un maximum de six semaines.

2.3 Vérification de la localisation cellulaire des effecteurs 51 690 et 53 845

Les deux effecteurs sans signal peptide ont été clonés en position N-terminal de la eGFP dans le plasmide pB7FWG2 par la méthode Gateway (Karimi et al., 2002) au cours de travaux antérieurs conduits dans le laboratoire. Elles ont été transformées dans *Escherichia coli* DH10B et l'intégrité des plasmides a été validée par séquençage Sanger (Nanuq, Génome Québec, Montréal, Canada). Les constructions ont ensuite été transformées dans *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 afin d'observer la localisation cellulaire des effecteurs par expression transitoire.

2.4 Agroinfiltration

L'agroinfiltration des effecteurs dans de jeunes plants de *N. benthamiana* a été réalisée selon la méthode de (Sparkes et al., 2006). Après une incubation minimale de 18 h à 28 °C, la suspension cellulaire a été centrifugée et les bactéries ont ensuite été resuspendues et diluées à une densité optique (D.O.) de 0,5 u.A. avec du MgCl_2 10 mM. 150 μM d'acétosyringone a été ajouté dans la solution et elle a été incubée 1 h à la température de la pièce avant l'agroinfiltration. Les bactéries ont ensuite été injectées sur la face abaxiale des plants de *N. benthamiana*. Les expériences de localisation cellulaire ont été conduites après une période post agroinfiltration de 24 h, 48 h et 72 h afin d'obtenir un signal optimal.

2.5 Microscopie confocale

Un microscope Leica TCS SP8 a été utilisé au cours des analyses d'expression transitoire chez *N. benthamiana*. Le tissu était excisé avant d'être déposé face abaxiale vers le haut sur une lame contenant 100 µL d'eau distillée. Une lamelle était ensuite apposée sur le spécimen avant d'être recouverte d'une goutte d'huile à immersion et observée par les objectifs HC PL APO CS2 40X ou 63X. Le laser de 488 nm a été utilisé pour l'excitation de la eGFP selon un intervalle de détection entre 499 nm et 524 nm. Le laser de 552 nm a été utilisé pour l'excitation de la RFP son intervalle de détection était entre 571 nm et 605 nm. Les lasers étaient réglés à un maximum de 4 % de la puissance totale pour l'acquisition des images. Le détecteur hybride (HyD) était réglé entre 676 nm et 722 nm pour le signal associé à la chlorophylle. Les données recueillies ont été traitées avec les logiciels LAS AF et LAS X core offline (Leica, Wetzlar, Allemagne).

2.6 Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845

2.6.1 Clonages de l'effecteur 53 845

L'impact du signal peptide sur la localisation de l'effecteur 53 845 a été vérifié en le clonant en fusion N-terminale de la eGFP dans le plasmide pB7FWG2 par la méthode Gateway (Karimi et al., 2002). Le signal peptide partiel (SPP ; moitié du SP) et le signal peptide complet (SPC) ont été amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques (Annexe A). Les fragments ont été extraits et purifiés avec la trousse commerciale Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan). Ceux-ci ont été recombinaisonnés en proportions égales avec le plasmide d'entrée pDONR221 avec le mélange commercial BP Clonase II pendant 18 h à température pièce. Les recombinaisons dans le plasmide de destination pB7FWG2 ont été effectuées selon la même méthode avec la trousse commerciale LR Clonase II (Invitrogen, Massachusetts, États-Unis) (Annexe C). Les constructions ont été clonées dans *E. coli* DH10B et les vecteurs générés ont été séquencés en duplicata par la méthode Sanger (Nanuq, Génome Québec, Montréal, Canada). Les constructions ont été transformées dans la souche *A. tumefaciens* GV3101

pMP90 afin d'être exprimé transitoirement chez *N. benthamiana*. Les analyses de microscopie confocale ont été réalisées 24 h, 48 h, et 72 h post-agroinfiltration.

L'effecteur a subi un deuxième clonage selon la méthode Gateway décrite précédemment, mais cette fois en fusion avec un tag FLAG (Einhauer et Jungbauer, 2001). Une construction comprenait le signal peptide complet (SPC) alors que la deuxième était sans signal peptide, donc sous sa forme mature (MAT) (Annexe A). La réaction de recombinaison finale a été effectuée dans le plasmide de destination pB7WG2 au lieu de pB7FWG2 (Annexe C). Les constructions ont été agroinfiltrées telles que décrites précédemment dans *N. benthamiana*. Des échantillons des feuilles ont été prélevés après 48 h post agroinfiltration pour des analyses immédiates ainsi qu'à des fins de conservation à -80 °C pour des expériences ultérieures.

2.6.2 Recherche de la localisation de l'effecteur 53 845 par centrifugation différentielle et Western Blot

Des feuilles transformées de *N. benthamiana* avec les constructions comportant le signal peptide complet ainsi que sa version mature en fusion avec le tag FLAG ont été lysées 48 h post agroinfiltration. Un tampon physiologique d'extraction protéique a été utilisé en combinaison avec un homogénéisateur de verre tous deux préalablement refroidis pour broyer le tissu récolté selon la méthode de J. Klinkenberg (Klinkenberg, 2014).

Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé à 10 000 RPM pendant 10 minutes à 4 °C afin d'obtenir une phase soluble et non soluble (Alberts et al., 2002). Un volume de 40 µL de tampon de chargement avec SDS 5X (PSB) a été combiné à 160 µL d'extrait soluble alors que 200 µL de PSB a été combiné aux fractions solubles récoltées pour les resuspendre. Les fractions excédentaires ont été préservées à -80 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) de 10 % a été chargée avec différents volumes des extraits solubles et non solubles ayant été chauffés

préalablement à 95 °C pendant 5 minutes. Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF avec le Trans-Blot Turbo (Bio Rad, Hercules, Californie, États-Unis) et elle a été bloquée pendant une heure avec du TBST + 2,5 % de lait écrémé. L'anticorps primaire Rabbit α -DYKDDDDK tag (Bio Rad, Hercules, Californie, États-Unis) était dilué à 1 : 1000 dans du TBST + 2,5 % de lait écrémé et incubé pendant 18 h à 4 °C sur un agitateur orbital. Quatre rinçages de 5 minutes ont été effectués avec du TBST avant l'hybridation de 1 h avec l'anticorps secondaire Goat α -Rabbit-HRP IgG polyclonal (Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, États-Unis) dilué à 1 : 10 000 dans du TBST + 2,5 % de lait écrémé.

Les membranes ont été brièvement incubées dans le substrat Clarity™ Western ECL avant d'être révélées avec le ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio Rad, Hercules, Californie, États-Unis).

2.7 Recherche de la localisation de 51 690 et de ses interactants potentiels

2.7.1 Colocalisation de l'effecteur 51 690 avec des marqueurs de référence du nucléoïde chloroplastique

La colocalisation de l'effecteur 51 690 par microscopie confocale a été réalisée avec trois marqueurs du nucléoïde chloroplastique, soit respectivement pEND, SWIB et WHIRLY en fusion avec la RFP (Krupinska et al., 2014; Melonek et al., 2012; Terasawa et Sato, 2005). Les plasmides de référence et l'effecteur ont été transformés dans des souches distinctes, car les deux plasmides conféraient une résistance bactérienne à la spectinomycine. Les agroinfiltrations ont été fait dans trois plants distincts de *N. benthamiana* matures. Chacun était transformé avec une combinaison d'une souche avec l'effecteur 51 690 en fusion GFP et d'une souche avec une protéine de localisation du nucléoïde chloroplastique en fusion avec la RFP. Elles ont ensuite été combinés selon une densité optique finale de 0.5 u.a. à 600 nm avant l'ajout d'acétosyringone. Les analyses par microscopie confocale ont été réalisées 24 h, 48 h et 72 h post agroinfiltration.

2.7.2 Extraction et purification de chloroplastes à partir de *N. benthamiana*

L'extraction et la purification de chloroplastes intacts a été optimisé à partir de la méthode de Joern Klinkenberg avec des plants de *N. benthamiana* non transformés (Klinkenberg, 2014) (Figure 2.1). Les quantités de tampons et de matériel biologique de départ ont été triplés et le volume total de l'extrait cellulaire brut a été passé au travers d'une membrane de 30 μ M. Une séparation des chloroplastes intacts et brisés a été effectuée en mélangeant 132 μ L de Percoll avec 198 μ L de tampon d'isolation pour une quantité initiale de 100 mg de tissu. Des portions de 400 μ L d'extrait cellulaire ont été déposées délicatement sur la solution de séparation dans des tubes distincts jusqu'à ce que l'entièreté de la solution soit séparée par centrifugation à 7 000 xg pendant 5 minutes à 4 °C.

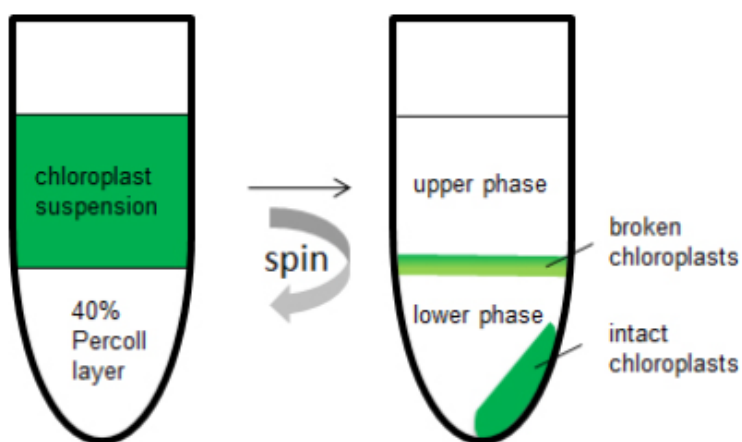


Figure 2.1 Schéma de la séparation au Percoll après l'extraction chloroplastique (Klinkenberg, 2014).

La fraction de chloroplastes intacts est celle devant être récupérée et isolée afin de poursuivre les expériences subséquentes.

Le surnageant, contenant les débris de chloroplastes brisés, a été retiré et les chloroplastes intacts ont été resuspendus dans 50 μ L de tampon d'isolement avant d'être conservés à -80 °C pour des expériences ultérieures.

2.7.3 Clonage d'un marqueur RFP et détection de la protéine WHIRLY-RFP par Western Blot

Un marqueur de référence de la RFP a été cloné à partir de la construction SWIB en fusion avec la RFP contenue dans le plasmide de destination pB7RWG2 selon la méthode Gateway décrite précédemment (Karimi et al., 2002). La RFP a été amplifiée par PCR avec des amorces spécifiques (Annexe A). Le plasmide de destination utilisé pour la recombinaison LR était le pB7WG2. Une confirmation de l'expression par microscopie confocale a été effectuée après 48 h post agroinfiltration chez *N. benthamiana*.

Une extraction de chloroplastes provenant de feuilles de *N. benthamiana* transformé avec WHIRLY en fusion avec la RFP a été réalisée après confirmation de l'expression par microscopie confocale 48 h post agroinfiltration. Les lysats chloroplastiques ont migré dans une SDS-PAGE de 10 % avant d'être transférés sur une membrane de PVDF selon le même protocole que décrit précédemment (sous-section 2.6.2). L'anticorps primaire α -RFP monoclonal de souris (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, États-Unis) était dilué à 1 : 1000 et l'anticorps secondaire polyclonal goat α -mouse-HRP (Bio Rad, Hercules, Californie, États-Unis) était dilué à 1 : 10 000. Les membranes ont été brièvement incubées dans le substrat ClarityTM Western ECL avant d'être révélées avec le ChemiDocTM Touch Imaging System (Bio Rad, Hercules, Californie, États-Unis).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Analyses bio-informatiques des effecteurs.

Afin de caractériser les deux effecteurs, une première analyse recensant l'homologie entre leurs séquences protéiques a été mise de l'avant (Figure 3.1). Les séquences en acides aminés ont été choisies afin de montrer concrètement les différences au niveau protéique, et non au niveau des polymorphismes pouvant être retrouvés dans la séquence d'acides nucléiques.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
257 bits(657)	6e-94	Compositional matrix adjust.	130/171(76%)	147/171(85%)	1/171(0%)
Query 1	MLTINHLPTFTFVCAIALLLVNSSIATHFVHSRPYGISHVCNGSIACSLINPNWPTKKKF				60
Sbjct 1	MLT+N LPTF FVCAIALLLVNS+IA + SR +GIS VCNGSIACSLIN NWPT K F				60
Query 61	MLTMNRLPTFPFVCAIALLLVNSAIAANLAQSRAFGISRVCNGSIACSLINSNWPTNKDF				60
Query 61	TCGNKTVSSTSFASAYPYMMLGQGVSMVN-SSSWPSSVTPECKNTKAGDRYQYRNGVWTA				119
Sbjct 61	TCGN+T+SS SFASAYPYMM+G+GVSMVN SSSWPSSV +C+N+ DRYQY+NGVW A				120
Query 120	TCGNETISSISFASAYPYMMMGEVSMVNSSSWPSSVASDCQNSTTADRYQYKNGVWNA				120
Sbjct 121	TCGNETISSISFASAYPYMMMGEVSMVNSSSWPSSVASDCQNSTTADRYQYKNGVWNA				120
Query 120	YYSIVATCGCTGTGPRALPNCTAATSQSTRACNVAMFTFCAMKMKDVVCTH				170
Sbjct 121	YYSIVA CGCTGTG ALPNCTAATSQS+ ACNVAMFTFCA++M DV+CT+				171
Query 170	YYSIVANCGCTGTGESALPNCTAATSQSSGACNVAMFTFCAIEMNDVLCTY				171
Sbjct 171	YYSIVANCGCTGTGESALPNCTAATSQSSGACNVAMFTFCAIEMNDVLCTY				171

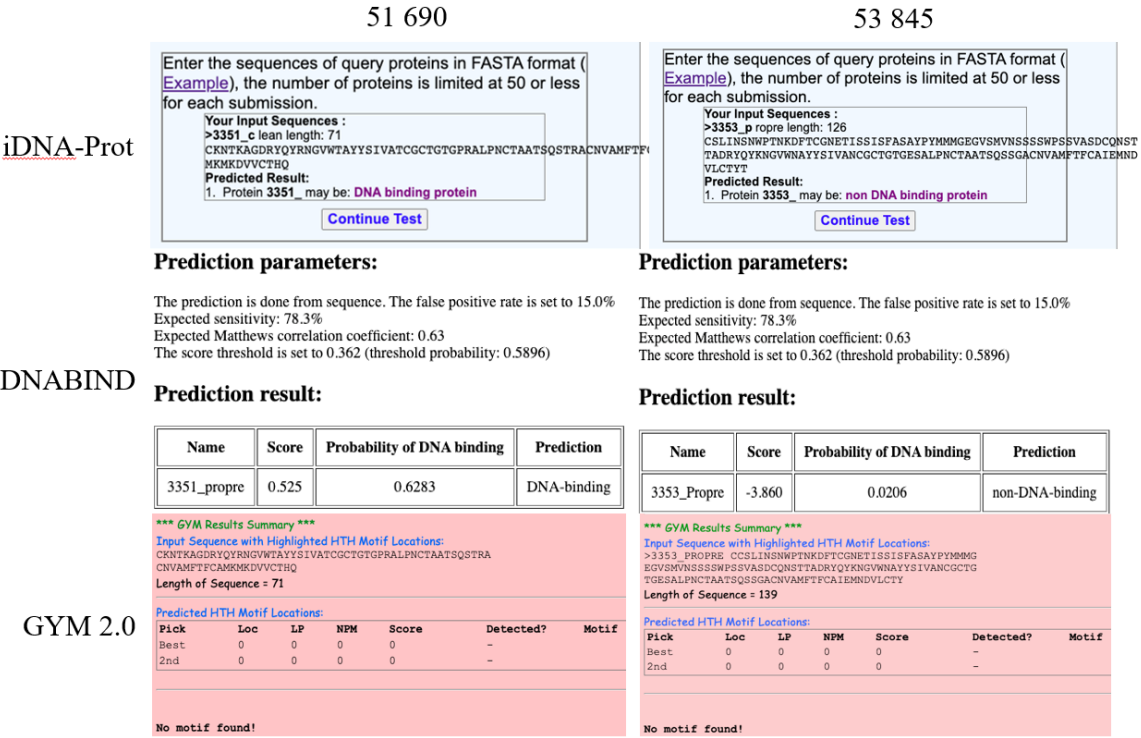
Figure 3.1 Alignement local des effecteurs 51 690 (Query) et 53 845 (Subject) effectuée avec le logiciel BLASTp.

Cette première analyse a permis de démontrer que les séquences des deux effecteurs ont un haut taux d'identité entre elles de 76 % contre 85 % d'homologie. La plus grande région de variabilité semble être retrouvée au sein des 60 premiers acides aminés et le reste des séquences semble relativement similaire. L'homologie et la conservation des séquences peuvent être indicateurs de localisation et de fonction cellulaire d'une protéine donnée. Donc, des analyses de prédiction de la localisation des effecteurs ont été conduites grâce au logiciel LOCALIZER 1.0.4 (Figure 3.2).

51 690				53 845			
# -----				# -----			
# LOCALIZER 1.0.4 Predictions				# LOCALIZER 1.0.4 Predictions			
# -----				# -----			
Identifieur	Chloroplast	Mitochondria	Nucleus	Identifieur	Chloroplast	Mitochondria	Nucleus
default	Y (0.936 35-59)	-	-	default	Y (0.997 38-98)	-	-
# Proteins analyzed: 1				# Proteins analyzed: 1			
# Number of proteins with cTP: 1 (100.0%)				# Number of proteins with cTP: 1 (100.0%)			
# Number of proteins with cTP & possible mTP: 0 (0.0%)				# Number of proteins with cTP & possible mTP: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with cTP & NLS: 0 (0.0%)				# Number of proteins with cTP & NLS: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with cTP & possible mTP & NLS: 0 (0.0%)				# Number of proteins with cTP & possible mTP & NLS: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with mTP: 0 (0.0%)				# Number of proteins with mTP: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with mTP & possible cTP: 0 (0.0%)				# Number of proteins with mTP & possible cTP: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with mTP & NLS: 0 (0.0%)				# Number of proteins with mTP & NLS: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with mTP & possible cTP & NLS: 0 (0.0%)				# Number of proteins with mTP & possible cTP & NLS: 0 (0.0%)			
# Number of proteins with NLS and no transit peptides: 0 (0.0%)				# Number of proteins with NLS and no transit peptides: 0 (0.0%)			

Figure 3.2 Prédiction de la localisation cellulaire des effecteurs 51 690 et 53 845 par le biais du logiciel LOCALIZER 1.0.4.

Ces deux analyses supplémentaires semblaient prédire que les deux effecteurs se dirigeraient vers le chloroplaste, car ceux-ci contiendraient, selon une prédiction de 100 %, un signal de localisation au chloroplastique, ou un peptide transit (*Number of proteins with cTP*). Les autres signaux de localisation analysés par le logiciel, soit nucléaire et mitochondrial, ont montré des probabilités nulles indiquant qu'ils ne semblent pas se diriger au niveau de ces organelles. En se basant sur le fait que les effecteurs semblent se diriger vers le chloroplaste, des analyses bio-informatiques supplémentaires ont été mises de l'avant. Des analyses avec le logiciel InterPro, servant à identifier des domaines conservés, n'ont montré aucun résultat significatif pour les deux protéines. Des logiciels de prédiction de fonctions individuelles ont été utilisés afin de tenter d'établir la fonction des effecteurs. Les programmes iDNA-Prot, DNABind et GYM 2,0 ont été utilisés afin d'évaluer la présence de motifs de liaison à l'ADN basé sur la structure tridimensionnelle des effecteurs (Figure 3.3).



lors de travaux conduits antérieurement au sein du laboratoire. Ces premières constructions ont été transformées dans *A. tumefaciens* GV3010 pMP90 et agroinfiltrées dans *N. benthamiana* avant d'être observées par microscopie confocale 48 h post-agroinfiltration (hpi) (Figure 3.4).

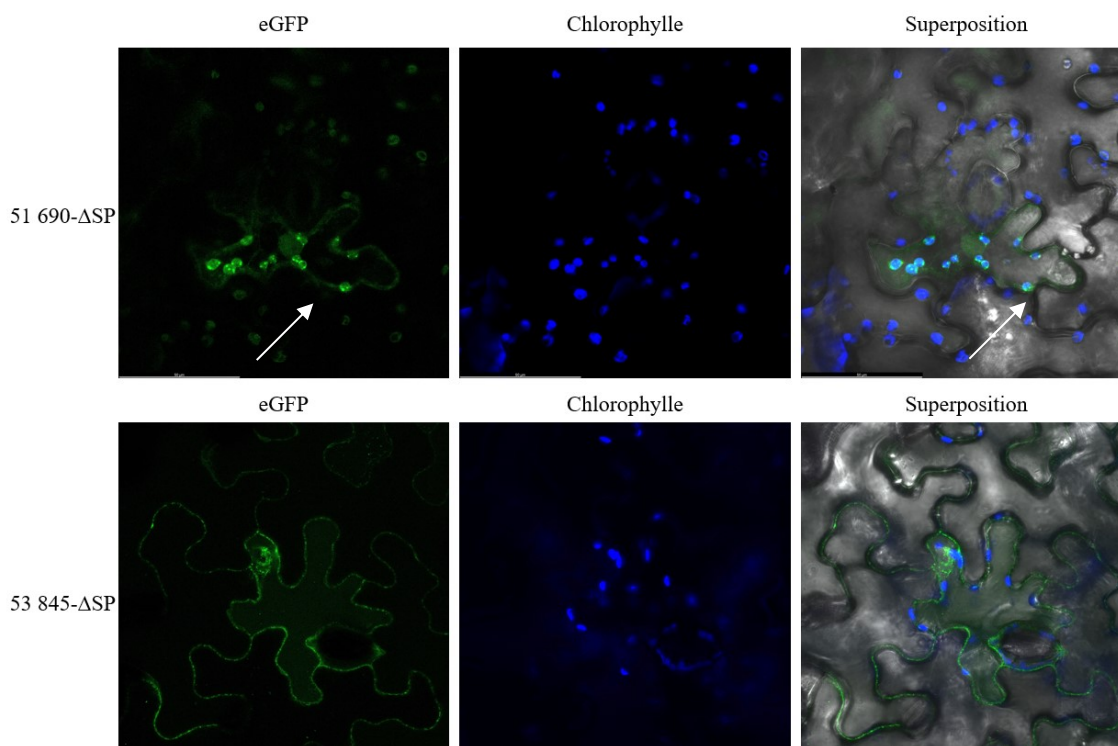


Figure 3.4 Localisation des effecteurs 51 690 et 53 845 sans signal peptide chez *N. benthamiana* 48 h post-agroinfiltration.

Le canal vert représente les effecteurs 51 690 et 53 845 fusionnés en C-terminal avec la GFP. Le canal bleu démontre l'auto fluorescence de la chlorophylle. La flèche blanche indique la localisation de l'effecteur 51 690.

Ces premières observations ont permis de constater que l'effecteur 51 690 semble être retrouvé dans une petite structure définie sous la forme de petits points compacts, indiqués par les flèches blanches dans la figure 3.4. Lorsque le canal de GFP est superposé au canal de la chlorophylle, l'effecteur est observé au sein d'une structure bleue, correspondant au chloroplaste. Pour ce qui est de 53 845, sa localisation semble diffuse, mais elle se retrouve majoritairement dans le noyau et le cytosol. Même lorsque le signal

de la chlorophylle est ajouté à celui de la GFP, l'effecteur ne semble pas se retrouver dans l'organelle photosynthétique.

En fonction de ces résultats préliminaires, des stratégies différentes ont été élaborées pour chacun des deux effecteurs. Comme la localisation cellulaire de 53 845 ne semble pas être au chloroplaste malgré les prédictions initiales, de nouvelles constructions ont été effectuées afin de vérifier si l'intégrité de son signal de localisation chloroplastique avait un impact sur sa localisation cellulaire. En contrepartie, puisqu'une localisation plus précise pour l'effecteur 51 690 a été remarquée, une recherche de sa localisation cellulaire par microscopie confocale en utilisant des protéines de référence chloroplastiques a été mise de l'avant.

3.3 Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845

3.3.1 Clonages de l'effecteur 53 845 et recherche de sa localisation par microscopie confocale

Les localisations des effecteurs, présentées à la figure 3.4, étaient celles des effecteurs en version matures, donc sans peptide signal et comprenant le peptide transit. Afin de valider si le signal peptide avait un impact sur le clivage *in vivo* entre le peptide signal et le peptide transit de l'effecteur 53 845, deux nouvelles constructions ont été mises de l'avant. Deux versions de l'effecteur, contenant le signal peptide complet (SPC) et partiel (SPP), ont été amplifiées par PCR à partir du vecteur pGEX-4T1. Les amorces utilisées étaient spécifiques à l'effecteur en plus de comporter les séquences phagiques requises pour la recombinaison des fragments d'intérêt par Gateway. Le produit final a été séquencé afin de valider que l'ensemble des manipulations n'ont pas affecté l'intégrité de la séquence de l'effecteur et que celui-ci était dans le bon cadre de lecture et que la GFP allait bien y être fusionnée. Lorsque les constructions ont été validées par séquençage, elles ont été transformées dans la souche *A. tumefaciens* GV3101 pMP90 afin d'être agroinfiltrée chez *N. benthamiana* pour vérifier la localisation cellulaire des effecteurs par microscopie confocale (Figure 3.5).

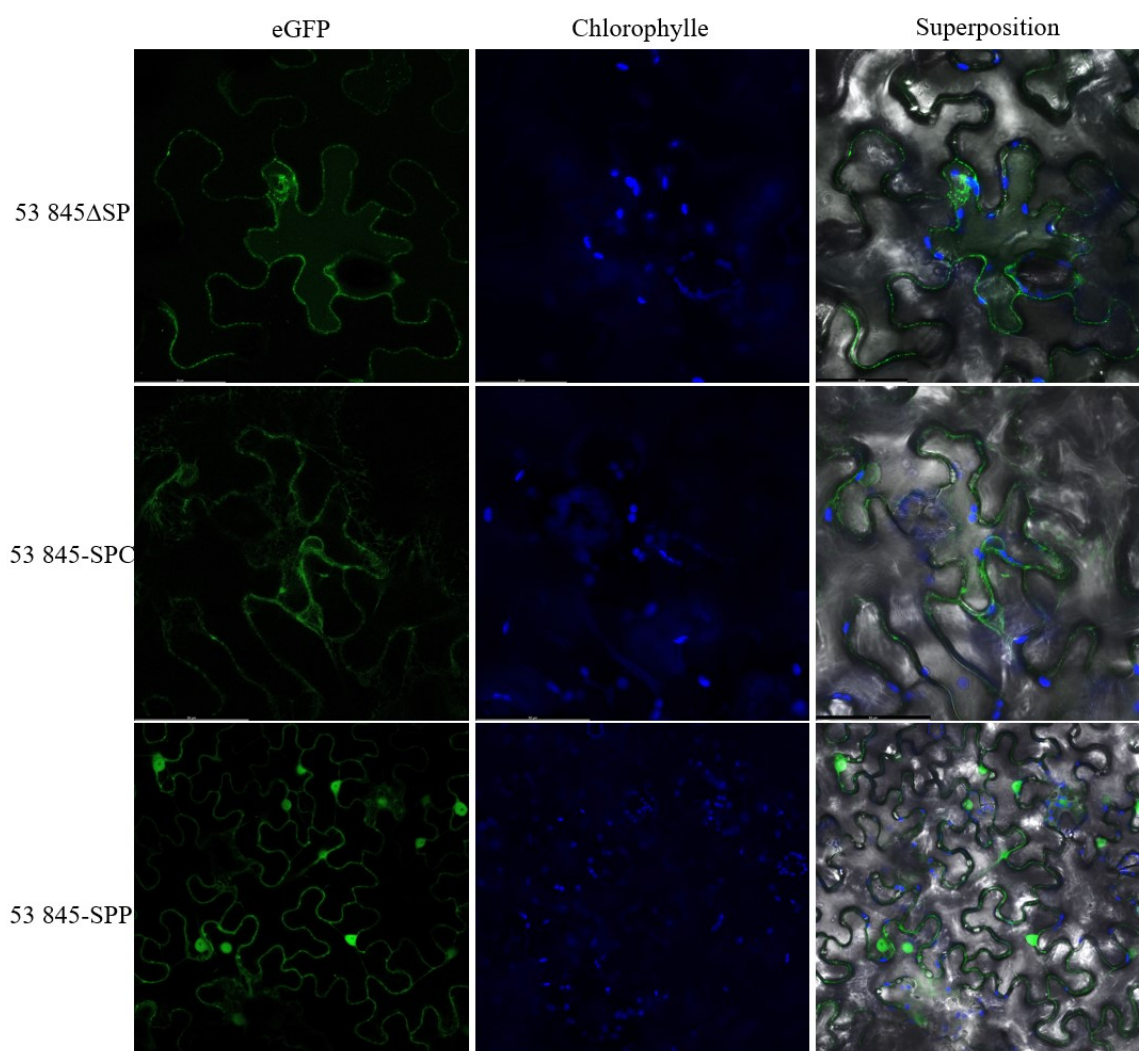


Figure 3.5 Localisation de l'effecteur 53 845 avec un signal peptide complet, partiel et absent chez *N. benthamiana* 48 h post-agroinfiltration.
Le canal vert représente l'effecteur fusionnés en C-terminal avec la GFP et le canal bleu démontre l'autofluorescence de la chlorophylle.

La figure 3.5 illustre que l'effecteur 53 845, indépendamment de la présence, absence ou présence partielle de son peptide signal, semble se diriger au niveau du noyau et du cytosol. Cette localisation est similaire à celle de la protéine de fluorescence rouge exprimée individuellement (voir Figure 3.8, démontrant l'expression d'un témoin RFP exprimé seul). Ainsi, la présence de cette protéine de fluorescence qui lui est fusionnée pourrait potentiellement masquer la localisation de l'effecteur et avoir un effet sur son repliement. La taille de 53 845, se situant aux alentours de 18 kDa est plus petite que celle de la GFP, se situant environ à 27 kDa. Donc, une nouvelle stratégie a été entreprise afin

de changer la méthode de détection associée à l'effecteur, afin de réduire l'impact potentiel de la GFP sur son repliement.

La nouvelle stratégie fut de remplacer la GFP par l'étiquette de détection FLAG, qui fait approximativement 1 kDa, réduisant l'importance de la molécule de détection lui étant fusionnée. Pour ce faire, un nouveau clonage par la méthode Gateway a été réalisé avec deux versions de l'effecteur. Une première était sous sa forme native et comportait le peptide signal complet (SPC) et la seconde était sous sa forme mature (MAT), ou en l'absence complète du signal d'adressage.

Les constructions, après la première et la seconde recombinaison, ont été envoyées à un service de séquençage pour valider l'intégrité de l'effecteur et que l'étiquette FLAG était bien dans le bon cadre de lecture. Le tout a ensuite été transformé dans *A. tumefaciens* afin de poursuivre vers la détection de la localisation de l'effecteur par le biais de *N. benthamiana*.

L'étiquette FLAG n'est pas une molécule pouvant être détectée en utilisant la fluorescence, l'effecteur devait être détecté par le biais d'un anticorps spécifique. En bref, une lyse des feuilles de *N. benthamiana* a été réalisée 48 h après l'agroinfiltration des constructions de l'effecteur avec le signal peptide complet et sous sa forme mature. Ensuite, une centrifugation a été effectuée pour séparer le contenu soluble, se traduisant par le cytosol, et le contenu insoluble, se traduisant par les grosses organelles tels le noyau, les mitochondries et les chloroplastes. Les échantillons solubles et insolubles des deux versions du même effecteur ont été chargés sur une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) et ensuite transférés sur une membrane de PVDF afin de détecter la protéine d'intérêt par Western Bot (Figure 3.6).

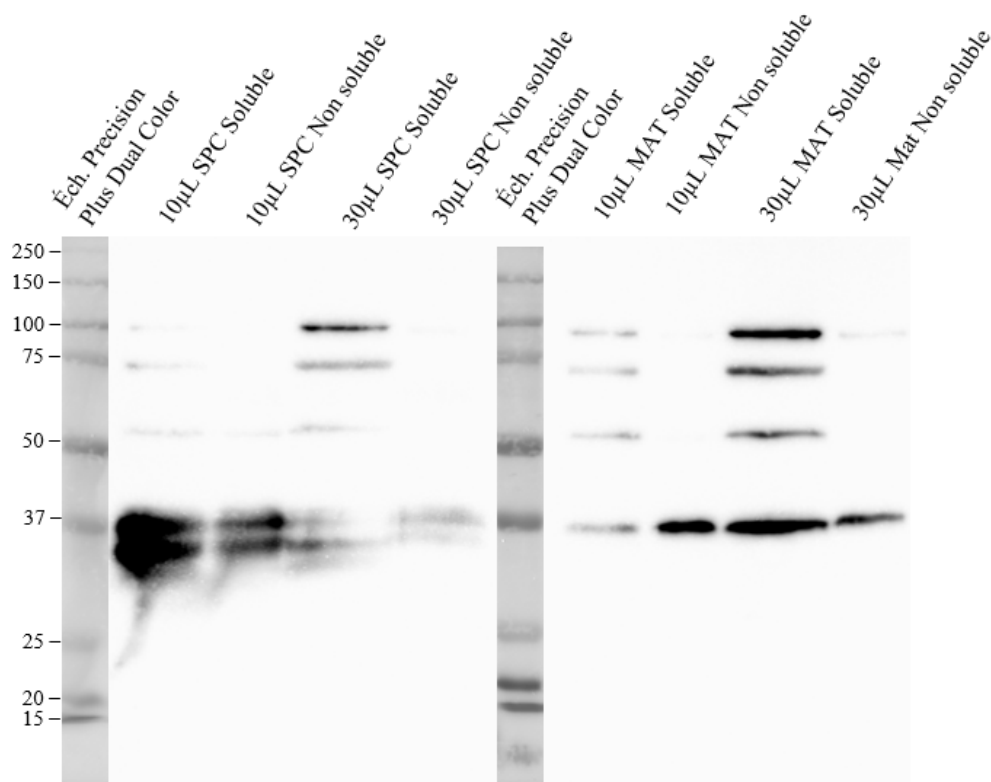


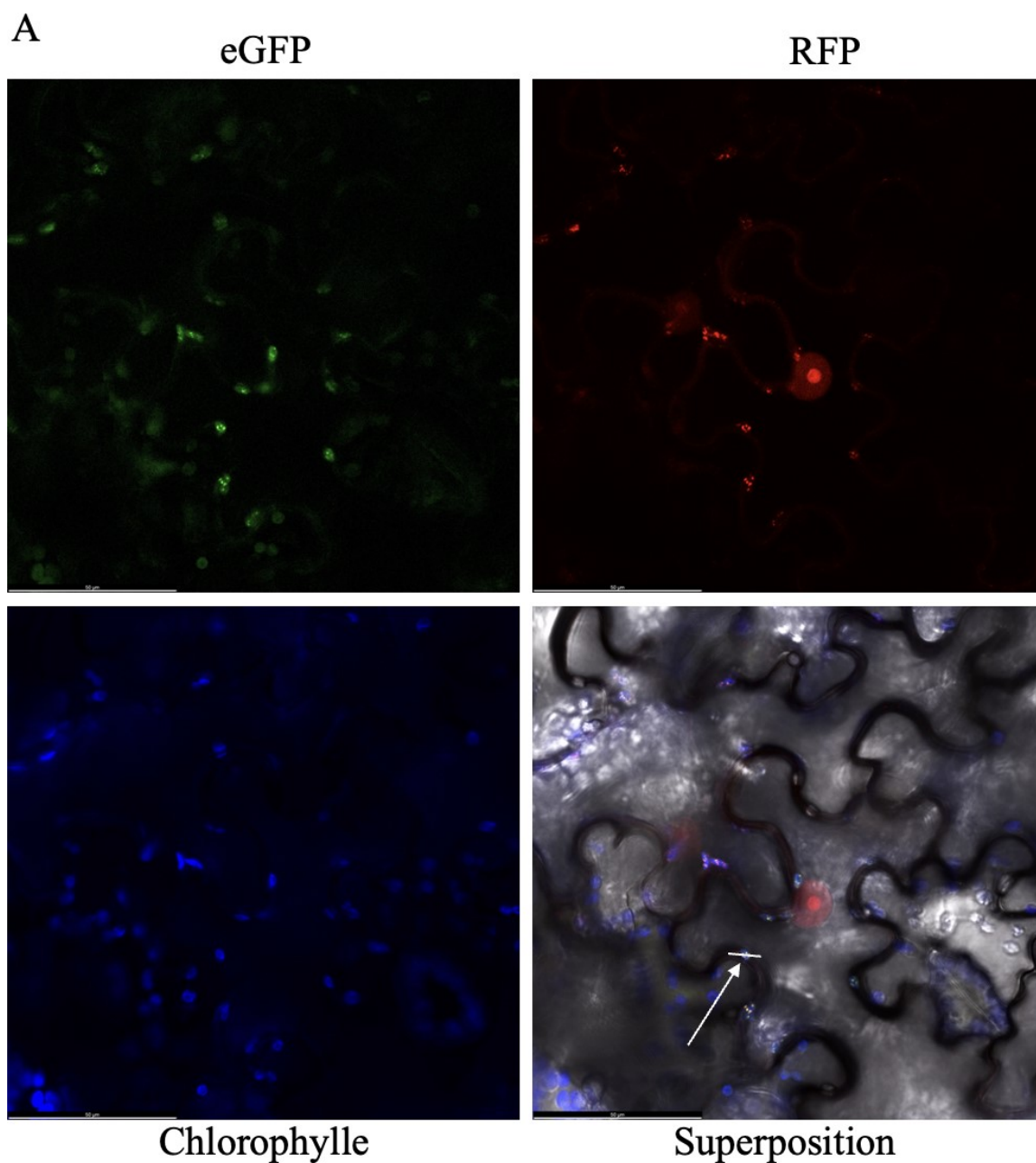
Figure 3.6 Détection de l'effecteur 53 845 sous sa forme mature (MAT) et avec le signal peptide complet (SPC) par immunobuvardage de type Western. La détection s'est fait par le biais de l'anticorps α -FLAG de lapin et de l' α -lapin-HRP polyclonal de chèvre.

Il est possible de constater la présence de plusieurs bandes sur la figure 3.8. Cependant, celles-ci ne correspondent pas au poids moléculaire attendu entre 18 et 20 kDa, indiquant qu'elles sont non spécifiques. Donc, cette analyse par Western Blot n'a pas permis de déterminer dans quelle fraction l'effecteur 53 845 semblait se retrouver.

En bref, la présence, l'absence ou la présence partielle du peptide signal n'a pas semblé avoir d'impact sur la localisation cellulaire finale de l'effecteur 53 845. Que le signal peptide soit complet ou partiel, les observations par microscopie confocale semblent indiquer une localisation nucléocytoplasmique. Les résultats préliminaires d'immunobuvardage Western n'ont pas permis de détecter l'effecteur.

3.4 Recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 51 690

Tel qu'observé précédemment, à la figure 3.4, l'effecteur 51 690 semble se retrouver dans les chloroplastes, et ce, sous la forme de petits points compacts. Afin d'obtenir plus de renseignements au sujet de sa localisation chloroplastique, un essai de colocalisation cellulaire avec le marqueur chloroplastique SWIB-6, a été réalisé et est présenté à la figure 3.7.



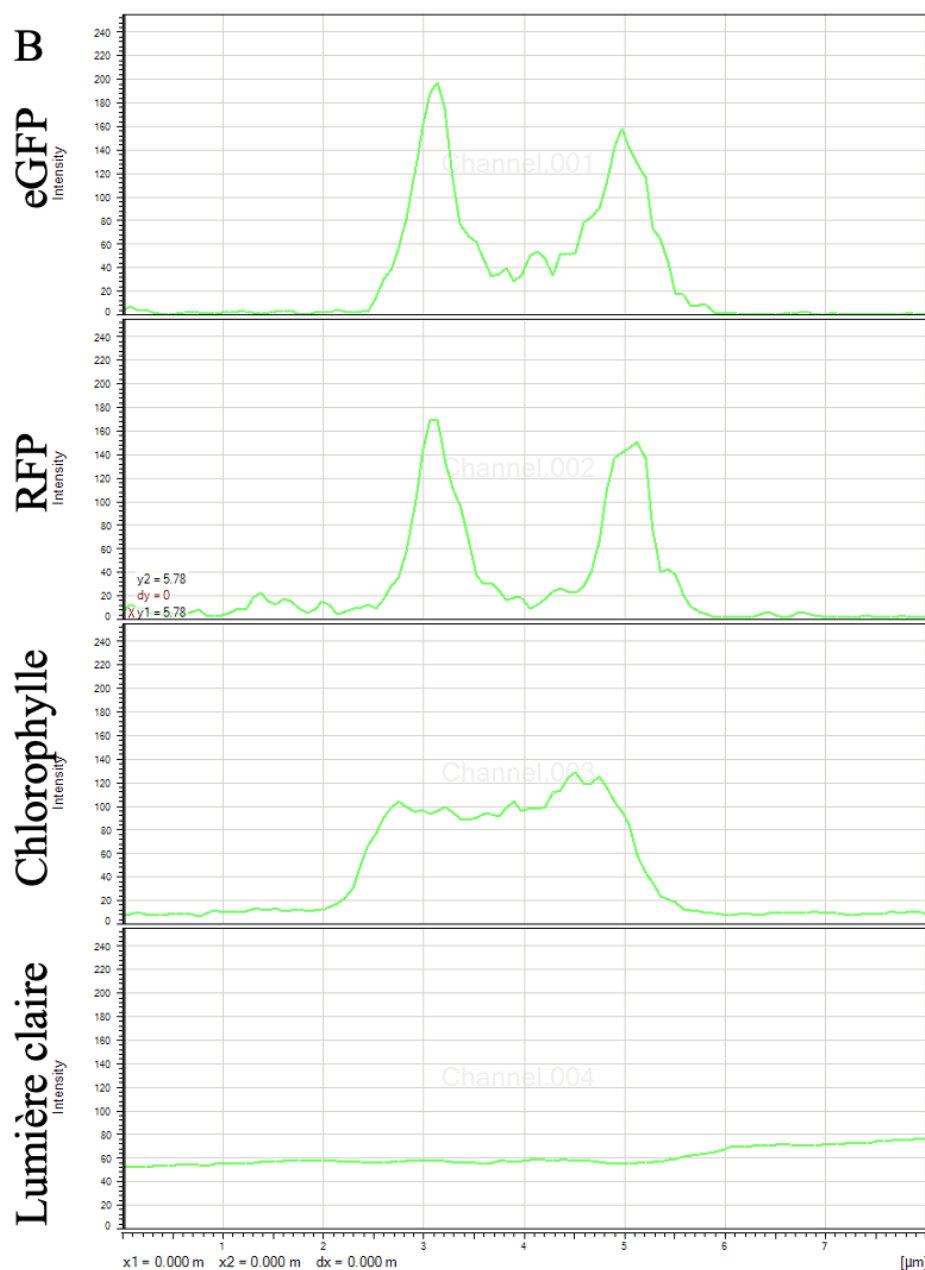


Figure 3.7 Localisation de l'effecteur 51 690-eGFP et de la protéine de référence SWIB-6-RFP chez *N. benthamiana* 48 h post-agroinfiltration.

A) Le canal vert représente l'effecteur fusionné en C-terminal avec la GFP. Le canal rouge représente la protéine de localisation au nucléoïde chloroplastique et au noyau fusionné en C-terminal avec la RFP. Le canal bleu démontre l'autofluorescence de la chlorophylle et la superposition montre l'ensemble des signaux des trois canaux acquis. B) Graphique de l'intensité lumineuse en fonction du trait tracé sur le chloroplaste pointé par la flèche blanche dans le canal de superposition. L'ordonnée représente l'intensité lumineuse observée en unités arbitraires en fonction de la distance parcourue par le trait, qui est illustrée par l'abscisse.

Dans le panneau supérieur gauche, il est possible de constater que l'effecteur en fusion avec la GFP est toujours retrouvé sous la forme de points compacts dans le chloroplaste. La localisation cellulaire de SWIB-RFP, retrouvée dans le cadran supérieur droite, semble être similaire à celle de l'effecteur qui est retrouvé dans les chloroplastes. De plus, SWIB est aussi observée sous la forme d'une masse importante dans le noyau. Lorsque l'autofluorescence des chloroplastes ainsi que les canaux de la GFP et de la RFP sont combinés, le signal de 51 690 et de SWIB se superpose. En effet, les points observés dans les chloroplastes sont jaunes, contrairement au signal observé dans le noyau qui est demeuré rouge. Ceci indique une colocalisation entre les deux protéines de fluorescence. Donc, l'effecteur 51 690 semble se diriger au niveau des nucléoïdes chloroplastiques, comme indiqué par la colocalisation avec la protéine de référence SWIB. Le panneau B de la figure 3.7 montre un graphique, mettant en relation l'intensité des longueurs d'onde en fonction des trois canaux analysés, illustrant que la GFP et la RFP sont bien exprimées individuellement et selon un niveau d'expression similaire dans les chloroplastes. Une colocalisation supplémentaire a été réalisée avec 51 690 et avec un autre marqueur de référence des nucléoïdes chloroplastiques, WHIRLY-RFP, et démontre un résultat similaire à celle effectuée avec le marqueur SWIB-RFP (Annexe B). Ces premières analyses ont permis de déterminer un sous-compartiment cible où l'effecteur semble se diriger. L'objectif suivant de la caractérisation était de tenter d'établir un partenaire d'interaction avec l'effecteur et ce dernier s'est décliné en plusieurs étapes.

3.4.1 Optimisation de l'extraction et la purification de chloroplastes

Une fois après avoir trouvé le compartiment où se dirige l'effecteur 51 690, la recherche de partenaire d'interaction protéique par co-immunoprécipitation (Co-IP) était l'étape suivante pour sa caractérisation. L'objectif était de vérifier si l'effecteur pouvait interagir avec les marqueurs disponibles au laboratoire, soit SWIB, WHIRLY et pEND en fusion avec la RFP. La première étape de ce processus a été de réaliser et d'optimiser une extraction de chloroplastes afin de maximiser le rendement protéique pour des expériences éventuelles de Co-IP. Le matériel utilisé pour cette première expérience provenait de feuilles de *N. benthamiana* transformées avec WHIRLY-RFP (Figure 3.8).

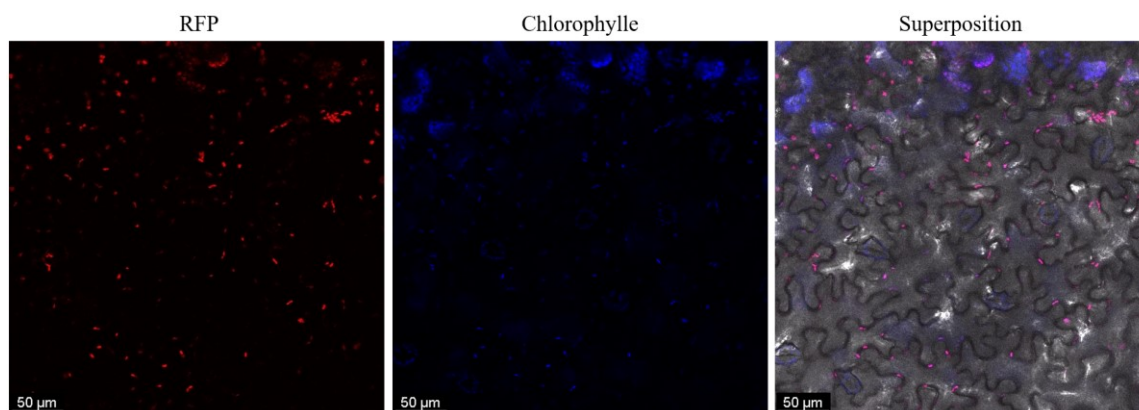


Figure 3.8 Visualisation de l'expression de la protéine WHIRLY chez *N. benthamiana* avant l'extraction de chloroplastes.

Le canal rouge représente WHIRLY en fusion C-terminal avec la RFP et le canal bleu représente l'autofluorescence de la chlorophylle.

La figure 3.8 montre l'expression de la protéine de référence du nucléoïde chloroplastique 48 hpi. Lorsque le canal de la RFP est superposé à celui de l'autofluorescence chloroplastique, il est possible de constater que WHIRLY est bien retrouvé dans les chloroplastes. L'optimisation de l'extraction des chloroplastes aurait pu se faire avec du matériel végétal ne contenant pas de marqueur de référence. Cependant, cette stratégie a été mise de l'avant afin de vérifier si l'extraction du compartiment cellulaire venait jouer sur l'intégrité de WHIRLY en fusion avec la RFP ainsi que sa détection par l'anticorps α -RFP. En faisant cette première extraction, l'objectif était d'arriver à déterminer le volume idéal à déposer sur gel SDS-PAGE et ainsi optimiser la méthode de Western Blot et obtenir une bonne détection des protéines de référence en fusion avec la RFP (Figure 3.9).

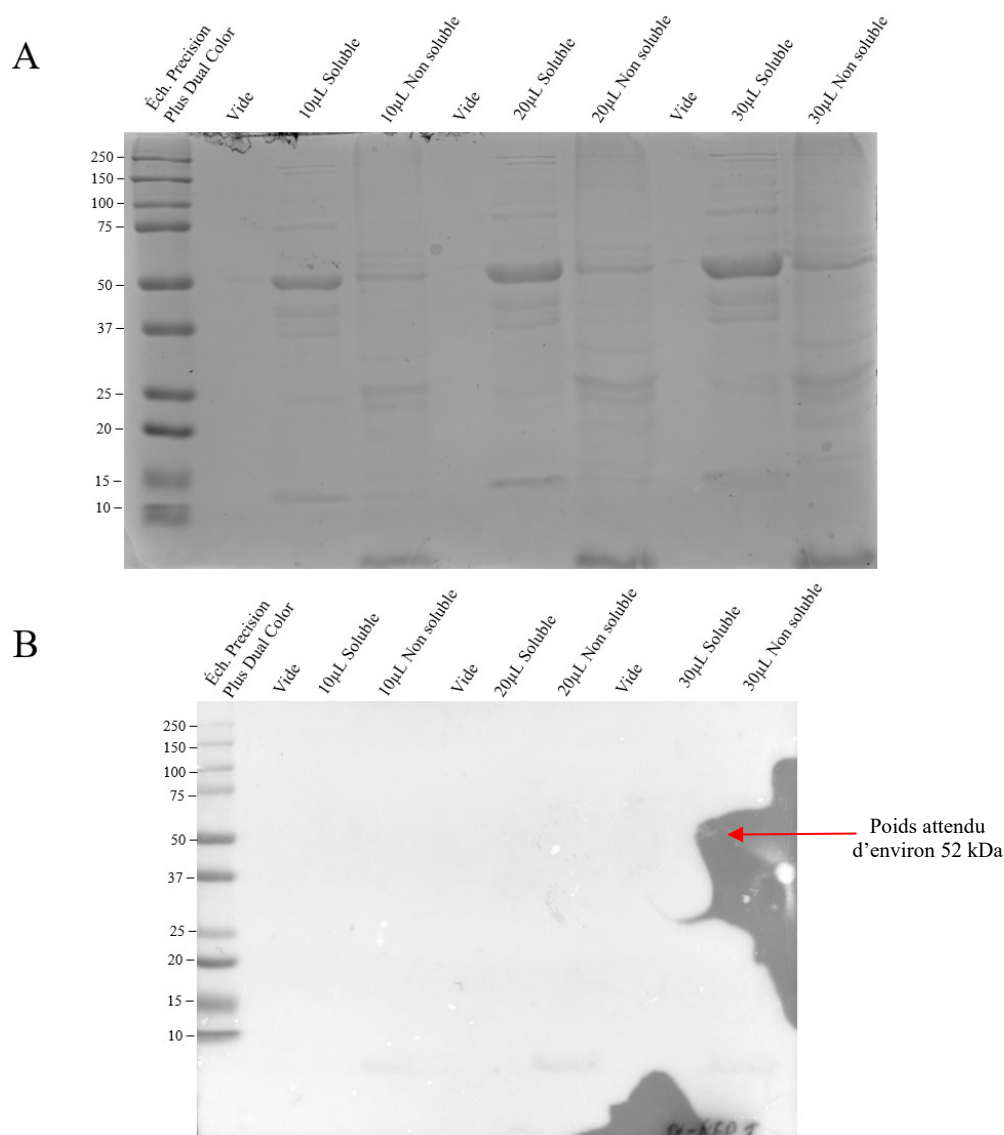


Figure 3.9 Évaluation de la présence de la protéine recombinante WHIRLY-RFP dans des fractions de chloroplastes solubles et insolubles par le biais d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide et par immunobuvardage à la Western.

A) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de différents volumes de chargement des extraits de chloroplastes solubles et non solubles.
B) Détection de WHIRLY-RFP par immunobuvardage de type Western.

La détection s'est fait par le biais de l'anticorps α -RFP de souris et de l' α -souris-HRP polyclonal de chèvre.

Une fois l'extraction de chloroplaste terminée, ceux-ci ont été lysés et centrifugés avant d'être chargés sur l'électrophorèse protéique. Cette manipulation a permis de libérer les protéines solubles retrouvées dans le stroma ainsi que de concentrer les protéines

chloroplastiques ancrées à la membrane. L'évaluation du contenu protéique des fractions solubles et non solubles en plus du volume idéal à charger a été réalisée, ce qui est illustré par le panneau A de la figure 3.9. Un duplicata de ce gel a été utilisé pour faire un transfert sur membrane de PVDF afin tenter de détecter la protéine WHIRLY fusionné à la RFP par immunobuvardage de type Western (Panneau B, Figure 3.9). Cependant, aucune bande n'a été détectée sur la membrane et devant l'absence de bandes spécifiques, des essais et optimisations supplémentaires ont été conduits. Ceux-ci n'ont toujours pas permis d'observer des bandes spécifiques et un marqueur RFP a été cloné par la méthode Gateway afin de vérifier l'intégrité des anticorps anti-RFP disponibles.

3.4.2 Clonage d'un marqueur RFP

L'amplification du marqueur de référence RFP a été réalisée à partir du vecteur de référence contenant la protéine SWIB-RFP. Des amorces, spécifiques au gène et contenant les séquences flanquantes de recombinaison phagique, ont été conçues et utilisées pour amplifier la RFP. Le vecteur final a été transformé dans *A. tumefaciens* sans envoyer les constructions au séquençage, car la présence d'erreur dans le clonage aurait été traduite par une absence de fluorescence en microscopie confocale (Figure 3.10).

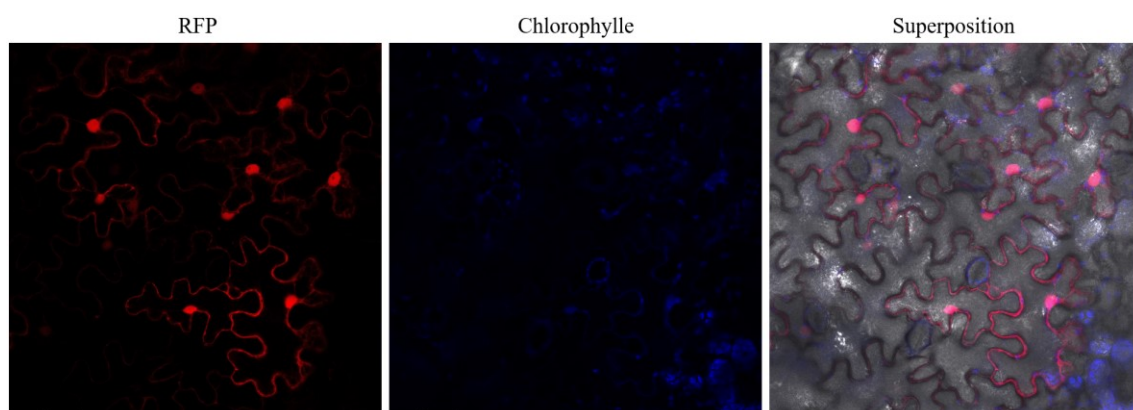


Figure 3.10 Visualisation de l'expression du marqueur RFP chez *N. benthamiana* avant son extraction pour la détecter par immunobuvardage de type Western.

Le canal rouge représente WHIRLY en fusion C-terminal avec la RFP et le canal bleu représente l'autofluorescence de la chlorophylle.

Tel qu'observé à la figure 3.10, le marqueur RFP 48 hpi démontre une localisation nucléocytoplasmique attendue pour ce marqueur de fluorescence. Ces feuilles transformées ont servi à faire des extractions de protéines totales afin de détecter le marqueur grâce à de nouveaux anticorps et par le fait même, optimiser la méthode de détection des protéines en fusion avec la RFP. Les extraits cellulaires ont été chargés sur une SDS-PAGE avant d'être transférés sur une membrane de PVDF et détectés par un nouveau lot d'anticorps anti-RFP (Figure 3.11).

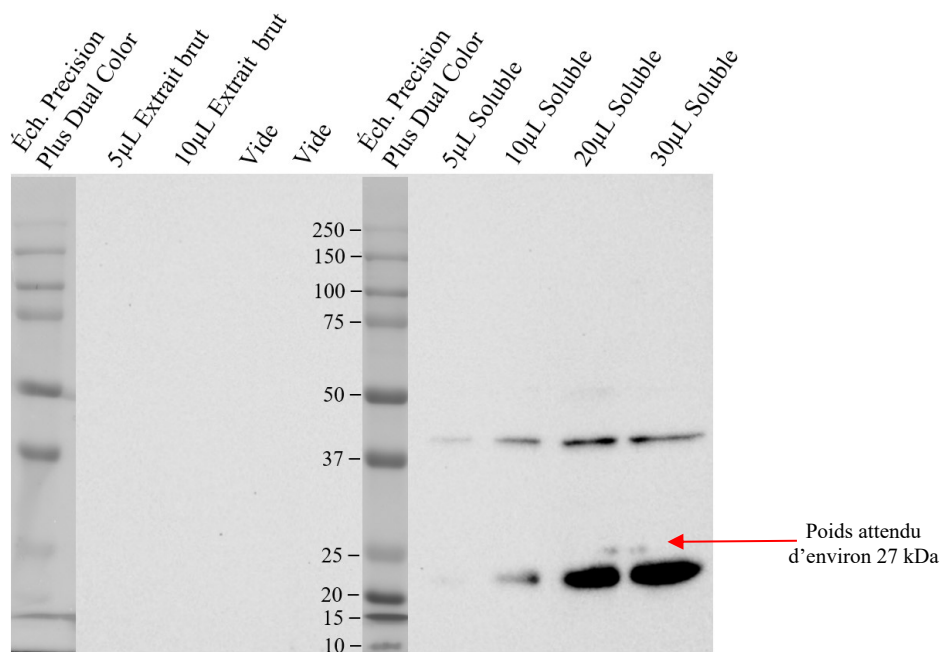


Figure 3.11 Détection du marqueur 1x-RFP par immunobuvardage de type Western.

La détection s'est fait grâce à l'anticorps primaire α -RFP de souris et de l'anticorps secondaire α -souris-HRP polyclonal de chèvre.

La membrane, illustrée à la figure 3.11, comprend deux types d'échantillons. L'extrait brut se compose de l'homogénat des feuilles de *N. benthamiana* alors que le soluble, correspond au surnageant de l'extrait brut centrifugé à 16 000 g pendant 10 minutes. Après avoir fait la révélation avec les anticorps, les différents volumes d'extraits bruts chargés ne semblent pas contenir la bande d'intérêt, ayant un poids moléculaire de 27 kDa. Or, il est possible d'observer plusieurs bandes lorsque l'échantillon chargé était soluble. En effet, des bandes de forte intensité sont présentes à

une hauteur d'environ 25 kDa, ce qui semble se rapprocher du poids moléculaire de la RFP. La taille moléculaire n'a pu être confirmée, car les bandes protéiques semblent avoir migré à retardement lors de l'électrophorèse. Il est possible que le poids moléculaire des bandes, autant pour l'échelle de poids moléculaire que les échantillons, ne soit pas exacte et précise. Une deuxième série de bandes a pu être observée à une taille d'approximativement 40 kDa. L'identité de cette bande n'a pas pu être révélée avec certitude, mais il est possible qu'il puisse s'agir d'une forme de dimère de la RFP tout comme il peut aussi s'agir d'une bande non spécifique. La détection par anticorps est relativement précise, mais il est possible que l'épitope reconnu par l'anticorps soit retrouvé sur une autre protéine générée par *N. benthamiana*. Cet immunobuvardage Western semble démontrer en revanche qu'il est possible de détecter la RFP et que l'optimisation de ces conditions pourrait être utilisée lors de la recherche hypothétique d'interactants avec ces effecteurs.

En bref, l'effecteur 53 845, indépendamment de l'intégrité du peptide signal et de son peptide transit, semble avoir une localisation nucléocytoplasmique. Les analyses, effectuées dans le cadre des présents travaux, n'ont pas permis d'obtenir des informations précises au sujet de la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 outre qu'une localisation nucléocytoplasmique. L'effecteur 51 690 quant à lui semble être retrouvé dans les nucléoïdes chloroplastiques, comme démontré avec la colocalisation avec la protéine de référence SWIB-RFP. Malgré l'optimisation de l'extraction de chloroplastes et de la détection du marqueur RFP, ceux-ci n'ont pas permis de se rendre jusqu'à l'identification d'interactants par co-immunoprécipitation.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Analyse bio-informatiques des effecteurs

La comparaison entre les séquences d'acides aminés des deux effecteurs semble montrer plusieurs différences clés (Figure 3.1, p. 31). Malgré une identité de 76 %, une variabilité plus importante est observée dans les 60 premiers acides aminés composant les deux effecteurs. Cette région, en position N-terminal des effecteurs, est susceptible de comprendre le signal peptide ainsi que le peptide transit, tel que prédit par le biais du programme LOCALIZER (Figure 3.2, p. 32). Ces polymorphismes sont peut-être à la base de leurs localisations cellulaires divergentes, car il a été démontré que les peptides transits des effecteurs de *M. larici-populina* sont fortement homologues à ceux des protéines retrouvées chez ses hôtes (Lorrain et al., 2019; Lorrain et al., 2018). Ainsi, la spécificité du peptide transit est peut-être à la base du mécanisme de translocation de l'effecteur chez son hôte spécifique. Il est important de mentionner que l'effecteur 51 690 est plus fortement exprimé chez le peuplier alors que 53 845 quant à lui est plus fortement exprimé chez le mélèze. Donc, ces polymorphismes ont peut-être un impact sur la localisation finale des effecteurs et les mécanismes de leur import cellulaire doivent être élucidés pour arriver à prédire leurs localisations finales (Petre et Kamoun, 2014).

Des analyses supplémentaires ont été réalisées afin de tenter d'identifier des domaines conservés par le logiciel InterPro (Zdobnov et Apweiler, 2001), mais devant l'absence de résultats, des analyses avec des logiciels se concentrant sur la détection de domaines précis ont été réalisées. Tel qu'observé à la figure 3.3 (p. 33), les logiciels ayant fournis des résultats pour un seul des effecteurs sont iDNA-Prot (Lin et al., 2011), DNABIND (Mrázek et Kypr, 1992) et GYM 2.0 (Gao et al., 1999; Narasimhan et al., 2002). Ces programmes ont permis d'évaluer selon plusieurs algorithmes différents que l'effecteur 51 690 aurait le potentiel d'interagir avec de l'ADN. Malgré l'homologie entre

les deux effecteurs, 51 845 n'a pas montré de résultats laissant entrevoir une possibilité qu'il contienne un domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, il est possible que leurs fonctions cellulaires dans le processus d'infection soient complètement différentes et que malgré leur grande homologie, 53 845 n'interagisse simplement pas avec l'ADN.

4.2 Localisation cellulaire de l'effecteur 53 845

La recherche de la localisation de l'effecteur 53 845 a été effectuée par plusieurs méthodes. La première analyse, impliquant l'effecteur 53 845 sans peptide signal et en fusion avec la GFP, a montré une localisation nucléocytoplasmique. Cette localisation, similaire à celle de protéine de fluorescence rouge (RFP) exprimée transitoirement dans *N. benthamiana*, pourrait ne pas être sa vraie localisation cellulaire, car la grosse protéine fluorescente qui lui est attachée pourrait interférer avec celle-ci (Figure 3.10, p. 44). La taille de l'effecteur étant inférieure à celle de la GFP, soit de 18 kDa contre 27 kDa, peut expliquer un biais au niveau de sa localisation *in planta*. En effet, la fusion d'une protéine de fluorescence à une protéine d'intérêt peut entraîner un mauvais repliement de la part des deux protéines. Ce phénomène peut même conduire jusqu'à la baisse notable de la fluorescence mesurée d'une construction donnée (Evanko, 2006). Avant de remettre en doute la performance de la GFP, des tests impliquant l'intégrité du peptide signal de l'effecteur ont été réalisés (Figure 3.5, p. 36). Ces nouvelles constructions n'ont une fois de plus pas conduit à la localisation chloroplastique prévue par le logiciel LOCALIZER et une fois ces essais complétés, un changement de la méthode de détection a été jugé pertinent afin de rechercher la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845.

Malgré les essais de Western Blot avec l'effecteur en fusion avec l'étiquette FLAG, aucun résultat concret n'a pu être obtenu. Cependant, plusieurs optimisations pourraient être mises de l'avant afin d'en obtenir. Les premiers aspects à optimiser se trouvent au niveau de la détection des deux versions de l'effecteur par Western Blot. Comme les protéines recherchées avaient un faible poids moléculaire, une augmentation de la concentration d'acrylamide dans le gel de séparation, passant de 12 % à 18 %, pourrait accroître la résolution des protéines de faible poids moléculaire. Cette première

modification pourrait permettre d'améliorer la précision en lien avec la détermination du poids moléculaire expérimental des deux versions de l'effecteur. Ensuite, des optimisations supplémentaires pourraient être apportées au niveau de la détection par l'anticorps spécifique à l'étiquette FLAG. Lors de l'essai présenté, plusieurs bandes non spécifiques de poids moléculaire allant de 30 à 100 kDa ont été observées (Figure 3.6, p. 38). Ce phénomène pourrait être expliqué par une concentration trop grande de l'anticorps primaire, pouvant avoir un impact direct sur sa fixation sur bandes protéiques non spécifiques. Ainsi, une concentration plus faible de l'anticorps α -FLAG aurait pu avoir accroître sa sélectivité et lui permettre de se fixer spécifiquement sur les effecteurs (Mahmood et Yang, 2012). En effet, lors des essais réalisés, la concentration de l'anticorps primaire était de 1 : 1000 et des dilutions de cette solution auraient pu être réalisées. Ces optimisations pourraient être conduites avec des extraits protéiques contenant les deux versions de l'effecteur en plus d'un marqueur commercial FLAG afin de valider la bonne concentration d'anticorps à utiliser pour la suite des manipulations.

Après ces modifications, si des bandes non spécifiques avaient encore été observées, il serait possible de faire varier le temps d'incubation avec l'anticorps primaire. Dans l'essai présenté, l'incubation s'était déroulée pendant toute une nuit et les bandes détectées n'avaient pas le bon poids moléculaire, signifiant une liaison avec des protéines non spécifiques. La membrane pourrait être incubée pendant des périodes allant d'une à quatre heures et des rinçages supplémentaires pourraient être faits afin de s'assurer que les anticorps liés non spécifiquement soient délogés. Malgré ces modifications au protocole, si les effecteurs n'avaient toujours pas été observés, un test supplémentaire pourrait être exécuté. En effet, la région d'intérêt de la membrane pourrait être excisée et cette partie uniquement pourrait avoir pu être mise en contact avec l'anticorps primaire. Cette portion de membrane, comportant uniquement les protéines de faible poids moléculaire, aurait permis de déterminer avec certitude si l'effecteur était bien retrouvé dans les extraits protéiques obtenus.

La deuxième forme d'optimisation qui aurait pu être apportée pour la détection de l'effecteur par Western Blot est en lien avec l'expression protéique chez *N. benthamiana*.

En effet, une fois que le transfert de l'ADN-T a été médié par *A. tumefaciens*, les transcrits d'ARNm pourraient être rapidement dégradés par un système de silencing post transcriptionnel et peut donc avoir un impact sur le niveau d'expression de la protéine recherchée (Ahlquist, 2002; Norkunas et al., 2018). Lors de l'essai présenté, les protéines ont été extraites à partir de feuilles de *N. benthamiana* ayant été transformées 48 h plus tôt. Il est donc possible que l'expression des protéines recombinantes ne fût pas optimale. Donc, des extractions protéiques faites à partir de feuilles transformées 18 h, 24 h, 36 h et même 72 h post-agroinfiltration pourraient être utilisées. Comme ces versions des effecteurs n'étaient pas en fusion avec une protéine de fluorescence, il était impossible d'évaluer le niveau d'expression de ceux-ci. Ces modifications au protocole de détection de l'effecteur 53 845 sont celles immédiates qui pourraient être apportées afin de détecter l'effecteur dans des extraits cellulaires provenant de feuilles transformées de *N. benthamiana*.

4.3 Localisation cellulaire de l'effecteur 51 690

La recherche de la localisation cellulaire de l'effecteur 51 690 a été principalement réalisée par des expériences de microscopie confocale (Figure 3.7, p. 40; Figure B1, p. 76). Lors de celles-ci, il fut possible d'observer la présence de l'effecteur dans les nucléoïdes chloroplastiques confirmé par le biais des constructions de référence SWIB et WHIRLY en fusion avec la RFP. Le panneau B de la figure 3.7 (p. 40) illustre précisément la colocalisation entre l'effecteur et SWIB au moyen de l'intensité lumineuse relevée selon les trois canaux enregistrés. Il est possible de déterminer que l'organelle analysée correspond au chloroplaste, car l'intensité de la chlorophylle de la structure analysée est élevée. De plus, les canaux de la GFP et de la RFP sont contenus dans le chloroplaste, car ils sont retrouvés dans la même zone graphique que la chlorophylle. De plus, leurs pics individuels sont de force similaire au niveau de l'ordonnée et sont retrouvés à des emplacements similaires dans le chloroplaste, indiqué par l'abscisse des graphiques analysés. Cette première analyse ne permet pas cependant de déterminer que les protéines interagissent ensemble. Or, il est possible d'affirmer qu'elles sont retrouvées dans le même sous compartiment chloroplastique, soit au niveau des nucléoïdes. Une fois cette

information obtenue, l'objectif était de déterminer si l'effecteur interagissait avec une des trois protéines de référence du nucléoïde chloroplastique, soit SWIB, WHIRLY ou pEND.

La première étape de la recherche d'interaction de l'effecteur avec une protéine de référence a été de purifier des chloroplastes à partir de plants de *N. benthamiana* transformés avec la construction WHIRLY-RFP. Avant de commencer les extractions, une vérification de l'expression de la protéine d'intérêt a été faite par microscopie confocale (Figure 3.8, p. 42). Comme l'expression de WHIRLY a été jugée adéquate, les manipulations d'extraction, de purification des chloroplastes ainsi que la détection de la protéine d'intérêt ont été réalisées. Tel que présenté à la figure 3.9 (p. 43), il fut possible de charger les échantillons de chloroplastes solubles et non solubles sur deux SDS-PAGE identiques et de faire une coloration au bleu de Coomassie avec le premier et faire un transfert sur membrane avec le deuxième afin de détecter WHIRLY-RFP avec un anticorps α -RFP. Le gel SDS-PAGE a permis de déterminer que 20 μ L d'échantillon permettait d'avoir une bonne quantité de protéines autant au niveau de la fraction soluble que de la fraction insoluble. Cependant, peu importe le volume chargé au préalable, aucune bande n'a été observée sur la membrane, et ce, malgré les différents essais réalisés. L'absence de la bande recherchée correspondant au poids de la protéine WHIRLY-RFP et ainsi que l'absence d'un témoin positif de la RFP a fait en sorte qu'un nouveau clonage a été mis de l'avant.

Une fois que le clonage et l'observation de l'expression du marqueur RFP ont été réalisés (Figure 3.10, p. 44), des échantillons d'extrait cellulaire selon des volumes variables ont été analysés par Western Blot avec un nouveau lot d'anticorps primaires α -RFP (Figure 3.11, p. 45). Cette fois, des bandes ont été observées dans les différents volumes testés selon des poids moléculaires d'approximativement 25 kDa et 40 kDa. Comme l'échantillon comportait uniquement de la RFP, il est possible qu'un dimère ait été détecté, mais la présence d'une bande non spécifique pourrait être aussi probable. Tel que décrit précédemment, il est plausible qu'une concentration d'anticorps primaire trop élevée soit la cause de la révélation de ces bandes non spécifiques (Mahmood et Yang, 2012). Or, cette première analyse a permis de confirmer qu'un volume de 20 μ L

d'échantillon était optimal pour une détection robuste de la RFP. De plus, le marqueur étant fonctionnel aurait pu être intégré à raison de contrôle positif dans des essais subséquents de la détection des protéines de localisation du nucléoïde chloroplastique en fusion avec la RFP. Toutes ces informations et optimisations auraient pu servir à comparer si l'extraction de chloroplaste permettait d'accroître le rendement de protéine de référence comparativement à une extraction protéique à partir des cellules entières.

4.4 Perspectives de recherche et avancée du projet

Toutes les manipulations qui ont été réalisées sont des informations et des optimisations préalables à l'obtention de réponses permettant de caractériser les effecteurs de *M. larici-populina*. En effet, plusieurs perspectives de recherche peuvent découler du présent projet. Une fois la détection de l'effecteur 53 845, avec le signal peptide complet et sous sa forme mature en fusion avec l'étiquette FLAG, des réponses en lien avec sa localisation cellulaire *in planta* pourraient être obtenues. Si l'effecteur peut être détecté dans un extrait cellulaire brut de manière spécifique, des centrifugations différentielles pourraient être réalisées afin de tenter de déterminer si l'effecteur entre dans un compartiment cellulaire ou s'il reste dans le cytosol. De plus, des essais de colocalisation avec des marqueurs cytosoliques pourraient aussi être réalisés. Notamment, les protéines *Argaunaute-1* (AG-01) (Leung et al., 2006) et *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3* (SGS3) (Mourrain et al., 2000) en fusion avec la RFP sont disponibles au laboratoire. AG-01 est présente dans les granules de stress et dans les *processing bodies* (PBs) dans le cytosol, qui sont des organelles impliquées dans la réponse au stress oxydatifs, osmotiques, aux chocs de température et même lorsque la traduction est inhibée chez l'hôte (Anderson et Kedersha 2006; Leung et al., 2006). SGS3, quant à elle, est impliquée dans les mécanismes de *silencing* post transcriptionnel chez les plantes tel *Arabidopsis thaliana*. Ce *silencing* consiste en la dégradation des ARNm étrangers, affectant ainsi leur expression chez leurs hôtes et détient aussi un rôle dans la résistance aux virus chez les plantes (Mourrain et al., 2000). Ces hypothèses pourraient peut-être permettre d'obtenir plus d'informations au sujet de l'effecteur 53 845.

Les perspectives de recherche en lien avec l'effecteur 51 690 sont aussi multiples. Tel que déterminé précédemment, la localisation cellulaire de ce dernier est connue et il semble se diriger au niveau des nucléoïdes chloroplastiques. Comme il fut possible de détecter le marqueur RFP par le biais d'un Western Blot, des nouveaux essais de détection par Western Blot des protéines SWIB, WHIRLY et pEND en fusion avec la RFP pourraient être effectués. Si leur détection est possible, des essais de Co-IP entre eux et l'effecteur fusionné à la GFP pourraient être réalisés. Si toutefois aucune des trois protéines interagissent avec l'effecteur, un échantillon de la co-immunoprécipitation pourrait être envoyé à un service de séquençage protéique et cette méthode pourrait permettre d'établir une liste d'interactants candidats (Free et al., 2009). Ces expériences pourraient peut-être permettre d'obtenir plus d'informations en lien avec l'effecteur 51 690 et s'il possède un rôle dans l'infection causée par la rouille du peuplier.

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'effectoromique et la caractérisation biochimique classique des effecteurs sont des facteurs clés dans l'élucidation des maladies causées par de nombreux pathogènes. Le but visé par la présente étude était de caractériser les effecteurs 51 690 et 53 845 du champignon biotrophe *Melampsora larici-populina*. Le premier objectif, étant de déterminer si le couple d'effecteur se dirigeait vers le même compartiment cellulaire par le biais d'outils bio-informatique a été atteint. En effet, les prédictions semblaient indiquer que les deux protéines fongiques contenaient un signal de localisation au niveau du chloroplaste. De plus, les prédictions de motifs de liaison à l'ADN ont montré que 51 690 semblait contenir un domaine de liaison à l'ADN alors que l'effecteur 53 845, qui lui est fortement homologue, n'a montré aucune probabilité d'en contenir.

Le deuxième objectif de cette étude, qui fut de déterminer si la localisation *in planta* reflétait bien la prédiction *in silico*, a été atteint. Lors d'essais de microscopie confocale avec les effecteurs en fusion avec la GFP, il fut possible d'établir que l'effecteur 51 690 se dirigeait bien au niveau des chloroplastes et était retrouvé sous la forme de points compacts. Cependant, l'effecteur 53 845 a montré une localisation nucléocytoplasmique, ce qui différait des prédictions bio-informatiques et de la localisation cellulaire observée pour l'effecteur 51 690. Ainsi, un troisième objectif indépendant pour chacun des effecteurs a été établi. Pour ce qui était de 53 845, la vérification de l'impact de l'intégrité de son signal peptide a été mise de l'avant. Lorsque ce dernier a été cloné sous sa forme comprenant le signal peptide complet et sous une autre forme avec son signal peptide partiel, sa localisation *in planta* s'est avérée inchangée. Pour ce qui est de 51 690, des essais de colocalisation avec des marqueurs de référence au niveau des nucléoïdes chloroplastique ont été mis de l'avant. Ces expériences ont permis de déterminer que la protéine fongique semble se diriger au niveau de ce sous-compartiment. En revanche, ces analyses n'indiquent pas que l'effecteur interagit avec des protéines de cette structure

et des analyses supplémentaires pourraient être effectuées afin d'établir une liste d'interactants candidats. Toutes ces expériences ont permis de démontrer que la caractérisation d'effecteurs est importante afin de comprendre au niveau moléculaire comment ces petits peptides spécialisés arrivent à causer des maladies, et idéalement, arriver à les arrêter.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahlquist, P. (2002). RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science*, 296(5571), 1270-1273. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1069132>
- Aime, M. C., Matheny, P. B., Henk, D. A., Frieders, E. M., Nilsson, R. H., Piepenbring, M., McLaughlin, D. J., Szabo, L. J., Begerow, D., Sampaio, J. P., Bauer, R., Weiss, M., Oberwinkler, F., & Hibbett, D. (2006). An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, 98(6), 896-905. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.896>
- Akbudak, M. A., & Filiz, E. (2019). Whirly (Why) transcription factors in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): genome-wide identification and transcriptional profiling under drought and salt stresses. *Molecular Biology Reports*, 46(4), 4139-4150. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04863-y>
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.) [Book Chapter]. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26936/>
- Allen, J. F. (2003). The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1429), 19-37; discussion 37-18. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1191>
- Anderson , P., & Kedersha , N. (2006). RNA granules. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 803-808. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512082>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bettgenhaeuser, J., Gilbert, B., Ayliffe, M., & Moscou, M. J. (2014). Nonhost resistance to rust pathogens - a continuation of continua. *Front Plant Sci*, 5, 664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00664>
- Bhuiyan, N. H., Friso, G., Rowland, E., Majsec, K., & van Wijk, K. J. (2016). The Plastoglobule-Localized Metallopeptidase PGM48 Is a Positive Regulator of Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 28(12), 3020-3037. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00745>

- Bobik, K., & Burch-Smith, T. M. (2015). Chloroplast signaling within, between and beyond cells [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00781>
- Bogorad, L. (2008). Evolution of early eukaryotic cells: genomes, proteomes, and compartments. *Photosynth Res*, 95(1), 11-21. <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9236-3>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1), 48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Bose, J., Munns, R., Shabala, S., Gilliam, M., Pogson, B., & Tyerman, S. D. (2017). Chloroplast function and ion regulation in plants growing on saline soils: lessons from halophytes. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3129-3143. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx142>
- Bostock, R. M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 545-580. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095505>
- Boyle, B., Levée, V., Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., & Séguin, A. (2010). Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems. *Plant Biology*, 12(2), 364-376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00310.x>
- Büttner, D. (2016). Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, fuw026. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Caldo, R. A., Nettleton, D., & Wise, R. P. (2004). Interaction-Dependent Gene Expression in Mla-Specified Response to Barley Powdery Mildew[W]. *The Plant Cell*, 16(9), 2514-2528. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023382>
- Campos, M. L., Kang, J.-H., & Howe, G. A. (2014). Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 657-675. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3>
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., & Dinesh-Kumar, S. P. (2015). Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Dev Cell*, 34(1), 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.011>

- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A., & Ellis, J. G. (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell*, 18(1), 243-256. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035980>
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu Rev Plant Biol*, 67, 25-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>
- Chandran, D., Rickert, J., Huang, Y., Steinwand, M. A., Marr, S. K., & Wildermuth, M. C. (2014). Atypical E2F transcriptional repressor DEL1 acts at the intersection of plant growth and immunity by controlling the hormone salicylic acid. *Cell Host Microbe*, 15(4), 506-513. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.007>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Ciuffetti, L. M., Manning, V. A., Pandelova, I., Betts, M. F., & Martinez, J. P. (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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x>
- Cummins, G. B., & Hiratsuka, Y. (2003). *Illustrated genera of rust fungi* (3 ed.). American Phytopathological Society (APS).
- Czarnecki, O., Gläßer, C., Chen, J.-G., Mayer, K., & Grimm, B. (2012). Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00236>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- de Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bölter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnov, N., & Grant, M. (2015). Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants*, 1(6), 15074. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.74>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

- Dietz, K.-J., Turkan, I., & Krieger-Liszkay, A. (2016). Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast *Plant physiology*, 171(3), 1541-1550. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00375>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell*, 173(6), 1454-1467.e1415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Dogra, V., Li, M., Singh, S., Li, M., & Kim, C. (2019). Oxidative post-translational modification of EXECUTER1 is required for singlet oxygen sensing in plastids. *Nature Communications*, 10(1), 2834. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10760-6>
- Dou, D., & Zhou, J. M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*, 12(4), 484-495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., . . . Martin, F. (2011). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019315108>
- Duplessis, S., Major, I., Martin, F., & Séguin, A. (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 Sciences*, 28(5), 309-334. <https://doi.org/10.1080/07352680903241063>
- Durner, J., & Klessig, D. F. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24), 11312-11316. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11312>
- Einhauer, A., & Jungbauer, A. (2001). The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1), 455-465. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00213-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00213-5)
- Evanko, D. (2006). Training GFP to fold. *Nature Methods*, 3(2), 76-76. <https://doi.org/10.1038/nmeth0206-76>

- Feau, N., L. Joly, D., & Hamelinm, R. C. (2007). Poplar leaf rusts: model pathogens for a model tree. *Canadian Journal of Botany*, 85(12), 1127-1135. <https://doi.org/10.1139/b07-102>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Free, R. B., Hazelwood, L. A., & Sibley, D. R. (2009). Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 5, Unit-5.28. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0528s46>
- Gao, Y., Mathee, K., Narasimhan, G., & Wang, X. (1999). *Motif detection in protein sequences*. <https://doi.org/10.1109/SPIRE.1999.796579>
- Gao, Y., Wu, Y., Du, J., Zhan, Y., Sun, D., Zhao, J., Zhang, S., Li, J., & He, K. (2017). Both Light-Induced SA Accumulation and ETI Mediators Contribute to the Cell Death Regulated by BAK1 and BKK1 [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00622>
- Gaouar, O., Morency, M.-J., Letanneur, C., Séguin, A., & Germain, H. (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. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1153523>
- Garnica, D. P., Nemri, A., Upadhyaya, N. M., Rathjen, J. P., & Dodds, P. N. (2014). The Ins and Outs of Rust Haustoria. *PLOS Pathogens*, 10(9), e1004329. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004329>
- Gaude, N., Bréhélin, C., Tischendorf, G., Kessler, F., & Dörmann, P. (2007). Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J*, 49(4), 729-739. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02992.x>
- Gaulin, E. (2017). Chapter Seven - Effector-Mediated Communication of Filamentous Plant Pathogens With Their Hosts. In G. Becard (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 82, pp. 161-185). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.09.003>
- Gérard, P. R., Husson, C., Pinon, J., & Frey, P. (2006). Comparison of Genetic and Virulence Diversity of *Melampsora larici-populina* Populations on Wild and Cultivated Poplar and Influence of the Alternate Host. *Phytopathology*®, 96(9), 1027-1036. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-1027>

- Germain, H., Joly, D. L., Mireault, C., Plourde, M. B., Letanneur, C., Stewart, D., Morency, M.-J., Petre, B., Duplessis, S., & Séguin, A. (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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12514>
- Gimenez-Ibanez, S., & Solano, R. (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci*, 4, 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00072>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 205-227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Grabowski, E., Miao, Y., Mulisch, M., & Krupinska, K. (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. <https://doi.org/10.1104/pp.108.122796>
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 414-420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.013>
- Guest, D. I., & Brown, J. (2005). Contents 1 7 PLANT DEFENCES AGAINST PATHOGENS.
- Guttman, D. S., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2014). Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nat Rev Genet*, 15(12), 797-813. <https://doi.org/10.1038/nrg3748>
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Legué, V., Tisserant, E., Kohler, A., Frey, P., Martin, F., & Duplessis, S. (2010). Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 23(10), 1275-1286. <https://doi.org/10.1094/mpmi-05-10-0111>
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y. C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R. C., & Duplessis, S. (2012). A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol Plant Microbe Interact*, 25(3), 279-293. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-11-0238>

- Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N., & Duplessis, S. (2011). The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *J Pathog*, 2011, 716041. <https://doi.org/10.4061/2011/716041>
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Göttfert, M., & Mendgen, K. (1997). A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 10(4), 438-445. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.4.438>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1997). PLANT DISEASE RESISTANCE GENES. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 575-607. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.575>
- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., & Suzuki, A. (1981). Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, 94(2), 205-213. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80718-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80718-1)
- Isemer, R., Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H. U., & Krupinska, K. (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett*, 586(1), 85-88. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.029>
- Ishihara, T., Sekine, K. T., Hase, S., Kanayama, Y., Seo, S., Ohashi, Y., Kusano, T., Shibata, D., Shah, J., & Takahashi, H. (2008). Overexpression of the Arabidopsis thaliana EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biol (Stuttg)*, 10(4), 451-461. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00050.x>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169(12), 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B. A., Wright, C. M., Brodsky, J. L., & Greenberg, J. T. (2007). A J domain virulence effector of Pseudomonas syringae remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol*, 17(6), 499-508. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.028>

- Jeworutzki, E., Roelfsema, M. R. G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J. T. M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., & Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant Journal*, 62(3), 367-378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04155.x>
- Jh, D. (2015). An Overview of Plant Immunity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6, 1-11.
- Joly, D. L., Feau, N., Tanguay, P., & Hamelin, R. C. (2010). Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora* spp.). *BMC Genomics*, 11(1), 422. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-422>
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193-195. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kelvinsong. (2013). *The chloroplast*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Stroma_\(fluid\)#/media/File:Chloroplast_mini.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Stroma_(fluid)#/media/File:Chloroplast_mini.svg)
- Klinkenberg, J. (2014). Extraction of Chloroplast Proteins from Transiently Transformed *Nicotiana benthamiana* Leaves.
- Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., & Nishimura, Y. (2015). Eukaryotic Components Remodeled Chloroplast Nucleoid Organization during the Green Plant Evolution. *Genome Biol Evol*, 8(1), 1-16. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv233>
- Kretschmer, M., Damoo, D., Djamei, A., & Kronstad, J. (2019). Chloroplasts and Plant Immunity: Where Are the Fungal Effectors? *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010019>
- Krupinska, K., Oetke, S., Desel, C., Mulisch, M., Schäfer, A., Hollmann, J., Kumlehn, J., & Hensel, G. (2014). WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids. *Front Plant Sci*, 5, 432. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00432>
- Kunkel, B. N., & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, 5(4), 325-331. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00275-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00275-3)

- Kuroiwa, T. (1991). The Replication, Differentiation, and Inheritance of Plastids with Emphasis on the Concept of Organelle Nuclei. In K. W. Jeon & M. Friedlander (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 128, pp. 1-62). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60496-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60496-9)
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *Arabidopsis Book*, 8, e0136. <https://doi.org/10.1199/tab.0136>
- Larousse. (2022). *Dictionnaire Larousse en ligne*. Retrieved Avril 2022 from <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/immunité/41753>
- Laurans, F., & Pilate, G. (1999). Histological Aspects of a Hypersensitive Response in Poplar to *Melampsora larici-populina*. *Phytopathology*, 89(3), 233-238. <https://doi.org/10.1094/phyto.1999.89.3.233>
- Lee, B. R., Muneer, S., Avice, J. C., Jung, W. J., & Kim, T. H. (2012). Mycorrhizal colonisation and P-supplement effects on N uptake and N assimilation in perennial ryegrass under well-watered and drought-stressed conditions. *Mycorrhiza*, 22(7), 525-534. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0430-6>
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants [Mini Review]. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lepage,  ., Zampini,  ., & Brisson, N. (2013). Plastid genome instability leads to reactive oxygen species production and plastid-to-nucleus retrograde signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 163(2), 867-881. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223560>
- Leung, A. K. L., Calabrese, J. M., & Sharp, P. A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18125-18130. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0608845103>
- Lewis, L. A., Polanski, K., de Torres-Zabala, M., Jayaraman, S., Bowden, L., Moore, J., Penfold, C. A., Jenkins, D. J., Hill, C., Baxter, L., Kulasekaran, S., Truman, W., Littlejohn, G., Prusinska, J., Mead, A., Steinbrenner, J., Hickman, R., Rand, D., Wild, D. L., . . . Grant, M. (2015). Transcriptional Dynamics Driving MAMP-Triggered Immunity and Pathogen Effector-Mediated Immunosuppression in *Arabidopsis* Leaves Following Infection with *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *The Plant Cell*, 27(11), 3038-3064. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00471>

- Lin, W.-Z., Fang, J.-A., Xiao, X., & Chou, K.-C. (2011). iDNA-Prot: Identification of DNA Binding Proteins Using Random Forest with Grey Model. *PLoS One*, 6(9), e24756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024756>
- Liu, L., Sonbol, F.-M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., Yao, J., He, S. Y., & Dong, X. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature Communications*, 7(1), 13099. <https://doi.org/10.1038/ncomms13099>
- Lippold, F., vom Dorp, K., Abraham, M., Hölzl, G., Wewer, V., Yilmaz, J. L., Lager, I., Montandon, C., Besagni, C., Kessler, F., Stymne, S., & Dörmann, P. (2012). Fatty Acid Phytol Ester Synthesis in Chloroplasts of Arabidopsis *The Plant Cell*, 24(5), 2001-2014. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095588>
- Littlejohn, G. R., Breen, S., Smirnoff, N., & Grant, M. (2021). Chloroplast immunity illuminated. *New Phytologist*, 229(6), 3088-3107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.17076>
- López-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R., & Collmer, A. (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol*, 54(2), 353-365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04285.x>
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, 222(3), 1190-1206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.15641>
- Lorrain, C., Petre, B., & Duplessis, S. (2018). Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 19-25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.016>
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Manning, V. A., Chu, A. L., Scofield, S. R., & Ciuffetti, L. M. (2010). Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. *New Phytologist*, 187(4), 1034-1047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03363.x>

- Manning, V. A., Chu, A. L., Steeves, J. E., Wolpert, T. J., & Ciuffetti, L. M. (2009). A Host-Selective Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA, Induces Photosystem Changes and Reactive Oxygen Species Accumulation in Sensitive Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 22(6), 665-676. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-6-0665>
- Marondedze, C., Thomas, L., Gehring, C., & Lilley, K. S. (2019). Changes in the Arabidopsis RNA-binding proteome reveal novel stress response mechanisms. *BMC Plant Biology*, 19(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1750-x>
- McFadden, G., Gilson, P., Hofmann, C. J. B., Adcock, G., & Maier, U. (1994). Evidence that an Amoeba Acquired a Chloroplast by Retaining Part of an Engulfed Eukaryotic Alga. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 3690-3694. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3690>
- Melonek, J., Matros, A., Trösch, M., Mock, H.-P., & Krupinska, K. (2012). The Core of Chloroplast Nucleoids Contains Architectural SWIB Domain Proteins. *The Plant Cell*, 24(7), 3060-3073. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099721>
- Mendgen, K., Struck, C., Voegelé, R. T., & Hahn, M. (2000). Biotrophy and rust haustoria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(4), 141-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0264>
- Miranda, M., Ralph, S. G., Mellway, R., White, R., Heath, M. C., Bohlmann, J., & Constabel, C. P. (2007). The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(7), 816-831. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-7-0816>
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J*, 50(3), 500-513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 240-273, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/cmr.00046-08>
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Réjoué, K., Sanial, M., Vo, T. A., & Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101(5), 533-542. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80863-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80863-6)

- Mrázek, J., & Kypr, J. (1992). DNABIND: an interactive microcomputer program searching for nucleotide sequences that may code for conserved DNA-binding protein motifs. *Comput Appl Biosci*, 8(4), 401-404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.4.401>
- Mullineaux, P. M., Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., & Smirnoff, N. (2018). ROS-dependent signalling pathways in plants and algae exposed to high light: Comparisons with other eukaryotes. *Free Radic Biol Med*, 122, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.033>
- Nakano, M., & Mukaiharu, T. (2018). *Ralstonia solanacearum* Type III Effector RipAL Targets Chloroplasts and Induces Jasmonic Acid Production to Suppress Salicylic Acid-Mediated Defense Responses in Plants. *Plant Cell Physiol*, 59(12), 2576-2589. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy177>
- Narasimhan, G., Bu, C., Gao, Y., Wang, X., Xu, N., & Mathee, K. (2002). Mining protein sequences for motifs. *J Comput Biol*, 9(5), 707-720. <https://doi.org/10.1089/106652702761034145>
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592(7852), 110-115. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7>
- Nguyen, Q.-M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4709. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4709>
- Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I. N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y., & Shiina, T. (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3(1), 926. <https://doi.org/10.1038/ncomms1926>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>
- Padmanabhan, M. S., & Dinesh-Kumar, S. P. (2010). All hands on deck—the role of chloroplasts, endoplasmic reticulum, and the nucleus in driving plant innate immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 23(11), 1368-1380. <https://doi.org/10.1094/mpmi-05-10-0113>

- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C. L., Fonseca, J. P., & Dong, X. (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Curr Biol*, 22(2), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.015>
- Persoons, A. (2015). *Le contournement de résistance par Melampsora Larici-populina l'agent de la rouille du peuplier : impact démographique et déterminisme génétique.*
- Petre, B., & Kamoun, S. (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLOS Biology*, 12(2), e1001801. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001801>
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., & Kamoun, S. (2016). Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cellular Microbiology*, 18(4), 453-465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cmi.12530>
- Petre, B., Saunders, D. G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., & Kamoun, S. (2015). Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. *Mol Plant Microbe Interact*, 28(6), 689-700. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-15-0003-r>
- Pfalz, J., & Pfannschmidt, T. (2013). Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends in Plant Science*, 18(4), 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.003>
- Pfalz, J., & Pfannschmidt, T. (2015). Plastid nucleoids: evolutionary reconstruction of a DNA/protein structure with prokaryotic ancestry. *Front Plant Sci*, 6, 220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00220>
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 489-521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Piller, L. E., Besagni, C., Ksas, B., Rumeau, D., Bréhélin, C., Glauser, G., Kessler, F., & Havaux, M. (2011). Chloroplast lipid droplet type II NAD(P)H quinone oxidoreductase is essential for prenylquinone metabolism and vitamin K₁ accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14354-14359. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1104790108>
- Pokotylo, I., Hodges, M., Kravets, V., & Ruelland, E. (2022). A ménage à trois: salicylic acid, growth inhibition, and immunity. *Trends in Plant Science*, 27(5), 460-471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.008>

- Pospíšil, P. (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1817(1), 218-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.05.017>
- Powikrowska, M., Oetke, S., Jensen, P. E., & Krupinska, K. (2014). Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids. *Front Plant Sci*, 5, 424. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00424>
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci*, 6, 573. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00573>
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., & Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, 68(1), 100-113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04671.x>
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., Wiermer, M., Zhang, Y., & Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science*, 365(6452), 498-502. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1720>
- Reyes-Escogido, M. d. L., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(2), 1253-1270. <https://doi.org/10.3390/molecules16021253>
- Richard, M. M. S., Gratias, A., Meyers, B. C., & Geffroy, V. (2018). Molecular mechanisms that limit the costs of NLR-mediated resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 19(11), 2516-2523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12723>
- Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Le Thiec, D., Fluch, S., Martin, F., & Duplessis, S. (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. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094987>
- Rodríguez-Herva, J. J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., Del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P., & López-Solanilla, E. (2012). A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell Microbiol*, 14(5), 669-681. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01749.x>

- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841-845. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Sakai, A., Takano, H., & Kuroiwa, T. (2004). Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *Int Rev Cytol*, 238, 59-118. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(04\)38002-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(04)38002-2)
- Sally E. Smith, D. R. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (A. Press, Ed. Third Edition ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Sarma, J., & Ward, P. (2011). The Complement System. *Cell and tissue research*, 343, 227-235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R., & Kuroiwa, T. (1993). Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *The EMBO journal*, 12(2), 555-561. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05687.x>
- Sato, N., Nakayama, M., & Hase, T. (2001). The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett*, 487(3), 347-350. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02342-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02342-5)
- Sato, N., & Ohta, N. (2001). DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Research*, 29(11), 2244-2250. <https://doi.org/10.1093/nar/29.11.2244>
- Serrano, I., Audran, C., & Rivas, S. (2016). Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3845-3854. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw088>
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front Plant Sci*, 5, 274. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>
- Shi, L.-X., & Theg, S. M. (2013). The chloroplast protein import system: From algae to trees. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(2), 314-331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.002>
- Snieszko, R. A., Yanchuk, A. D., Kliejunas, J. T., Palmieri, K. M., Alexander, J. M., & Frankel, S. J. (2012). Proceedings of the fourth international workshop on the genetics of host-parasite interactions in forestry: Disease and insect resistance in forest trees. *Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-240*. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agriculture. 372 p, 240.

- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc*, 1(4), 2019-2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzeliuss, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., & Pieterse, C. M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15(3), 760-770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Stael, S., Kmiecik, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N. S., Teige, M., & Van Breusegem, F. (2015). Plant innate immunity--sunny side up? *Trends Plant Sci*, 20(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>
- Steenackers, J., Steenackers, M., Steenackers, V., & Stevens, M. (1996). Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass and Bioenergy*, 10(5), 267-274. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0961-9534\(95\)00121-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0961-9534(95)00121-2)
- Stern, D. B., Goldschmidt-Clermont, M., & Hanson, M. R. (2010). Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 125-155. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112242>
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., & Katagiri, F. (2003). Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae* [W]. *The Plant Cell*, 15(2), 317-330. <https://doi.org/10.1105/tpc.007591>
- Taylor, R. E., West, C. E., & Foyer, C. H. (2022). WHIRLY protein functions in plants. *Food and Energy Security*, n/a(n/a), e379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fes3.379>
- Terasawa, K., & Sato, N. (2005). Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol*, 46(4), 649-660. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci070>
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci*, 17(5), 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., & Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 5(2), 123-135. <https://doi.org/10.1038/nrg1271>

- Torrens-Spence, M. P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C. M., Pluskal, T., Shen, A., & Weng, J.-K. (2019). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(12), 1577-1586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.005>
- Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A. N., Mittler, R., & Shintani, D. (2009). Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant physiology*, 151(1), 421-432. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140046>
- van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41(4), 537-549. <https://doi.org/10.1023/A:1006319216982>
- Van Wersch, S., & Li, X. (2019). Stronger When Together: Clustering of Plant NLR Disease resistance Genes. *Trends in Plant Science*, 24(8), 688-699. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.005>
- Vandromme, C., Spriet, C., Dauvillée, D., Courseaux, A., Putaux, J. L., Wychowski, A., Krzewinski, F., Facon, M., D'Hulst, C., & Wattebled, F. (2019). PII1: a protein involved in starch initiation that determines granule number and size in Arabidopsis chloroplast. *New Phytol*, 221(1), 356-370. <https://doi.org/10.1111/nph.15356>
- Verhage, A., van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant physiology*, 154(2), 536-540. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161570>
- Vetoshkina, D. V., Ivanov, B. N., Khorobrykh, S. A., Proskuryakov, II, & Borisova-Mubarakshina, M. M. (2017). Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction. *Physiol Plant*, 161(1), 45-55. <https://doi.org/10.1111/ppl.12560>
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 177-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Voegele, R., & Mendgen, K. (2003). Rust haustoria: Nutrient uptake and beyond. *First publ. in: New Phytologist* 159 (2003), pp. 93-100, 159. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00761.x>

- Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M., & Mendgen, K. (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 8133-8138. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.131186798>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wang, Y., Pruitt, R. N., Nürnberger, T., & Wang, Y. (2022). Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 20(8), 449-464. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00710-3>
- Wang, Z., Li, X., Wang, X., Liu, N., Xu, B., Peng, Q., Guo, Z., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2019). Arabidopsis Endoplasmic Reticulum-Localized UBAC2 Proteins Interact with PAMP-INDUCED COILED-COIL to Regulate Pathogen-Induced Callose Deposition and Plant Immunity. *The Plant Cell*, 31(1), 153-171. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00334>
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
- Warren, R. F., Merritt, P. M., Holub, E., & Innes, R. W. (1999). Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in Arabidopsis. *Genetics*, 152(1), 401-412. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.1.401>
- Wen, L. (2013). Cell Death in Plant Immune Response to Necrotrophs. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 1. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e103>
- Yan, Y., Liu, W., Wei, Y., & Shi, H. (2020). MeCIPK23 interacts with Whirly transcription factors to activate abscisic acid biosynthesis and regulate drought resistance in cassava. *Plant Biotechnol J*, 18(7), 1504-1506. <https://doi.org/10.1111/pbi.13321>
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J.-M., He, S. Y., & Xin, X.-F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 592(7852), 105-109. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03316-6>
- Zavaliev, R., Mohan, R., Chen, T., & Dong, X. (2020). Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response. *Cell*, 182(5), 1093-1108.e1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.016>

ANNEXE A

AMORCES UTILISÉES AU COURS DES CLONAGES GATEWAY DE L'EFFECTEUR 53 845 ET DU MARQUEUR RFP

Nom des amorces	Séquence de nucléotides (5' → 3')	Tm (°C)	Taille (pb)
3353-SPC-Forward-ATTB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGC TCACAATGAATCGTCTGCCTACC	61	27
3353-SPP-Forward-ATTB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGT GCGCCATTGCACTTCTACTAGTC	61	27
3353-Reverse-ATTB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGT GTAGGTGCAGAGGACATCGTTCATC	62	28
3353-SPC-FLAG-F-ATTB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAT GCTCACAATGAATCGTCTGCCTACC	61	27
3353-MAT-FLAG-F-ATTB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAT GGCTAACCTTGCACAATCTCGCGCC	65	27
3353-FLAG-R-gène	CTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCGTG TAGGTGCAGAGGACATCGTTCATC	62	28
ATTB2-StopCodon-FLAG-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTA CTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATGAT CTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC	53	31
ATTB1-RFP-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAT GGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG	65	27
ATTB2-RFP-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTA GGCGCCGGTGGAGTGGC	65	21

Noir : portion spécifique au gène à amplifier

Rouge : portion de recombinaison du système Gateway

Vert : portion spécifique au tag FLAG

ANNEXE B

COLOCALISATION DE L'EFFECTEUR 51 690 AVEC LA PROTÉINE DE RÉFÉRENCE WHIRLY-RFP

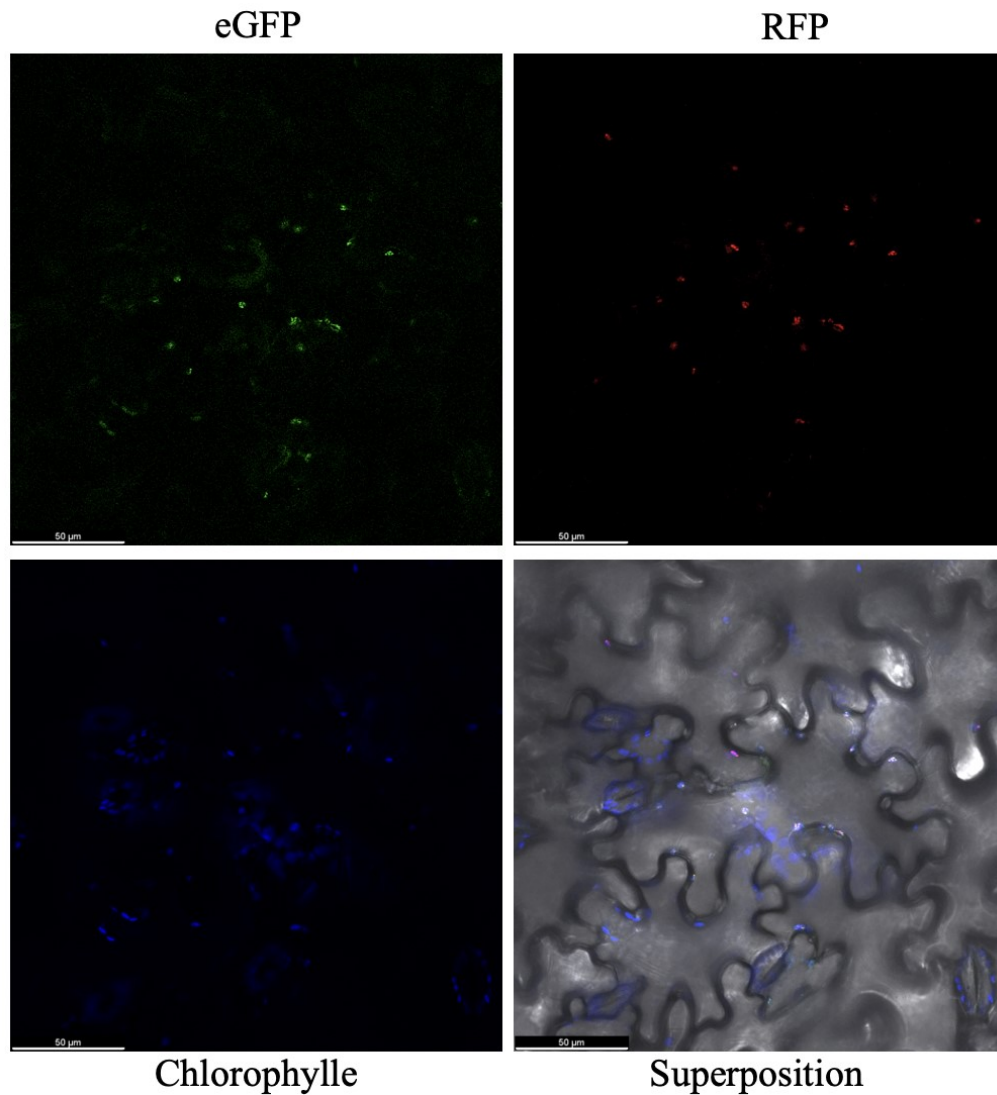


Figure B1 Localisation de l'effecteur 51 690 et de la protéine de référence WHIRLY chez *N. benthamiana* 48 h post-agroinfiltration. Le canal vert représente l'effecteur fusionné en C-terminal avec la GFP, le canal rouge représente la protéine de localisation au nucléoïde chloroplastique et au noyau fusionné en C-terminal avec la RFP et le canal bleu démontre l'autofluorescence de la chlorophylle.

ANNEXE C

CARTES DES PLASMIDES 3353-SPC/SPP-GFP ET 3353-SPC/MAT-FLAG UTILISÉS POUR LA RECHERCHE DE LA LOCALISATION DE L'EFFECTEUR 53 845

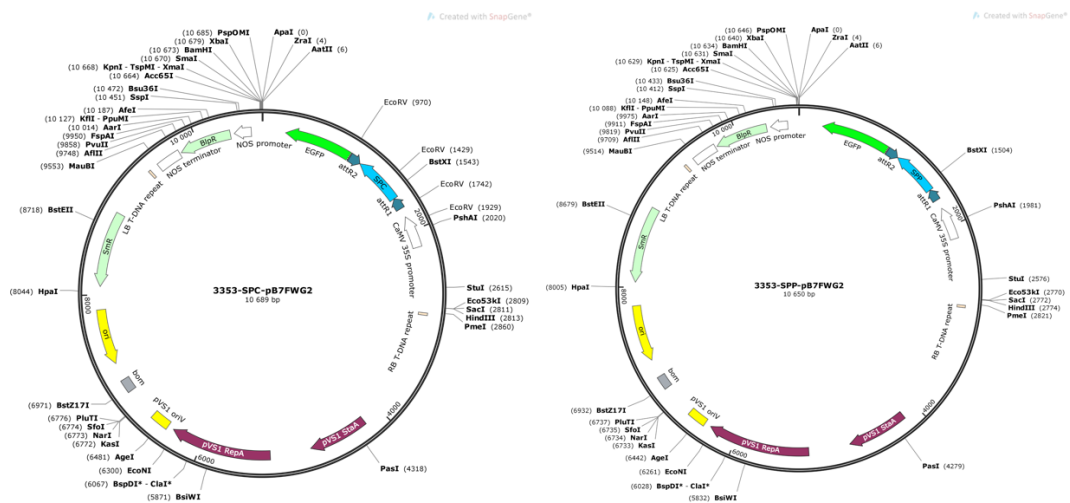


Figure C1 Cartes des constructions utilisées pour évaluer la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 avec son signal peptide complet (SPC) et son signal peptide partiel (SPP) en fusion avec la GFP.

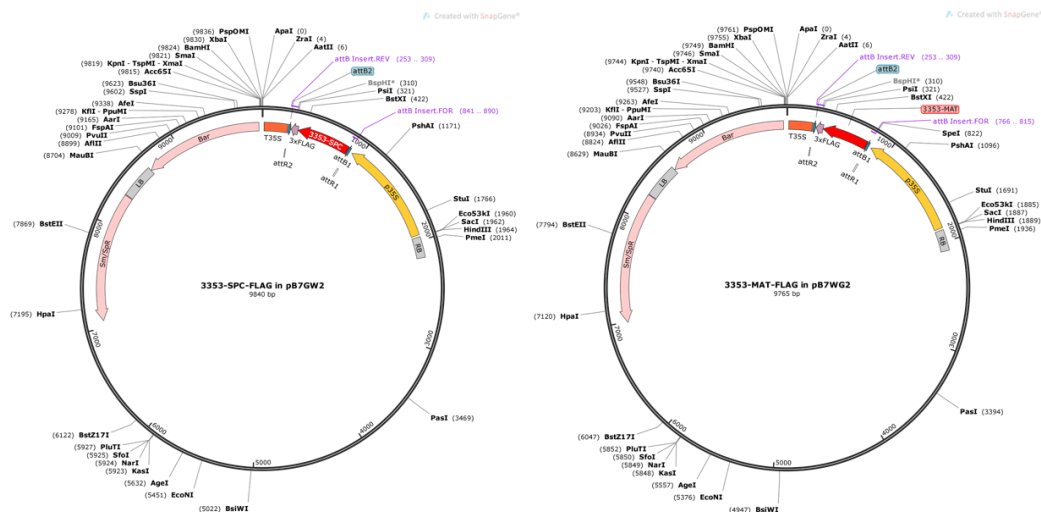


Figure C2 Cartes des constructions utilisées pour évaluer la localisation cellulaire de l'effecteur 53 845 avec son signal peptide complet (SPC) et sans son signal peptide (MAT) en fusion avec l'étiquette FLAG.