



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Biosciences végétales*

---

Présentée et soutenue par *Nicolas AMELOT*  
Le 07/10/2010

**Titre :**

*COUPLAGE ENTRE SIGNALISATION CALCIQUE ET MODULATION DU TRANSCRIPTOME EN  
REPONSE A LA CRYPTOGEINE CHEZ DES CELLULES DE TABAC*

---

**JURY**

*Michel LEGRAND, Directeur de recherche CNRS, Strasbourg*  
*Alain VAVASSEUR, Directeur de recherche CEA, Cadarache*  
*Nathalie LEBORGNE-CASTEL, Maître de conférence, Université de Bourgogne, Dijon*  
*François DORLHAC DE BORNE, Directeur de recherche Imperial Tobacco Group, Bergerac*  
*Christophe ROUX, Professeur des Universités, Université Toulouse III, Toulouse*  
*Jacqueline GRIMA-PETTENATI, Directrice de recherche CNRS, Toulouse*  
*Christian BRIERE, Chargé de recherche CNRS, Toulouse*

---

**Ecole doctorale :** *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries  
(SEVAB)*

**Unité de recherche :** *UMR 5546 CNRS - UPS, Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les  
Végétaux*

**Directeur(s) de Thèse :** *Jacqueline GRIMA-PETTENATI et Christian BRIERE*

**Rapporteurs :** *Michel LEGRAND et Alain VAVASSEUR*



## RESUME

La cryptogéine est un éliciteur peptidique sécrété par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, capable de provoquer une mort cellulaire programmée localisée ou HR et d'induire la protection du tabac contre le pathogène *Phytophthora nicotianae*. Cet éliciteur induit une signature calcique biphasique caractéristique. Outre un grand nombre d'évènements de signalisation cellulaire bien connus, la cryptogéine induit l'expression  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante du gène codant la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), enzyme d'entrée dans la voie des phénylpropanoïdes. Mon travail de thèse visait à mieux comprendre le rôle du métabolisme des phénylpropanoïdes dans les voies de défense activées par la cryptogéine, à étudier le couplage entre signalisation calcique et régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans ce métabolisme, et à identifier de potentiels effecteurs des voies de signalisation induites par la cryptogéine. A cet effet, des suspensions cellulaires de tabac BY-2 exprimant la sonde calcique aequorine ont été utilisées. Nous avons ainsi montré qu'en réponse à la cryptogéine, la plupart des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes sont surexprimés et des composés phénoliques s'accumulent dans la paroi. L'augmentation du nombre de transcrits et l'accumulation de phénols liés à la paroi dépendent de l'influx calcique induit par la cryptogéine. La régulation transcriptionnelle des gènes étudiés est corrélée de manière non-linéaire avec l'intensité du stimulus et avec les différentes composantes de la signature calcique. Ces résultats nous ont conduit à proposer un modèle de couplage selon lequel le calcium interviendrait dans le contrôle de la transcription *via* l'action coordonnée de deux modules de décodage calcique ayant des effets opposés. Par ailleurs, une analyse transcriptomique a révélé que 10% du transcriptome de tabac était modulé en réponse à la cryptogéine. En particulier, nous avons mis en évidence des changements de niveaux de transcrits pour des gènes codant des protéines de défense ou de stress, des protéines de signalisation, des facteurs de transcription, ou encore des enzymes impliquées dans les modifications pariétales. Parmi les 3,819 gènes différentiellement exprimés, 3,476 (91%) sont sensibles et 343 (9%) insensibles à la suppression du signal calcique. Les transcrits induits par la cryptogéine de manière calcium-dépendante incluent deux classes remarquables : la première comprend des gènes de défense alors que la seconde comporte une proportion très élevée de gènes du métabolisme des oxylipines. Les résultats présentés dans cette thèse apportent des indications claires quant au rôle essentiel du calcium dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans les réponses induites par la cryptogéine.



## EDITORIAL

Enfin ! Il semblerait donc qu'après 5 années de travail, dont 4 en thèse, j'en sois enfin à rédiger mon ode aux gens qui ont compté depuis tout ce temps. Ca tombe bien car j'ai bien plus de facilités en tant qu'écrivain qu'en tant qu'orateur. Bien entendu, les anecdotes racontées dans ces quelques lignes ne suffisent pas à résumer la richesse des Hommes mais elles en illustrent quelques traits marquants.

Ce sera finalement la seule partie 100% personnelle de mon manuscrit de thèse et, à ce titre, je compte bien la soigner au moins autant que le reste. Surtout, je sais d'avance que certaines personnes (quelques unes se reconnaîtront) ne liront que ça de ce manuscrit, autant leur donner un minimum de boulot ! Hein *Aud*... ? ;)

Je me vois mal commencer ces lignes sans un hommage appuyé à mes « parents » scientifiques, *Jacqueline* et *Christian*.

*Jacqueline*, je ne te remercierai jamais assez pour avoir toujours privilégié mon épanouissement personnel à une quelconque logique productiviste. Je ne connais pas d'autre directeur d'équipe qui aurait pu non seulement accepter que je démarre un M2P de droit en même temps que démarrait ma dernière année de thèse mais carrément m'y encourager... Ceci n'est qu'une anecdote parmi d'autres. Elle représente parfaitement ce qui, à mon sens, est ta qualité première, à savoir ton incroyable don de penser à autrui longtemps, très longtemps, avant de penser à toi ! Je passe ici volontairement sous silence tes qualités scientifiques parce que mes mots sont ici comptés et qu'elles sont de toute façon connues de la communauté scientifique.

*Christian*, tu as été un pendant parfait à *Jacqueline*. Je ne te remercierai jamais assez pour la capacité que tu as eu de laisser tomber toute activité en cours à chaque fois que j'ai eu besoin de te solliciter. Très souvent, le temps que je fasse le trajet retour « ton bureau-le mien », le fichier ou l'info demandée était déjà dans ma boîte mail. Cela m'étonnera toujours ! Bien évidemment là encore, ceci n'est en aucun cas restrictif de tes qualités mais représente plutôt une des choses qui a pu me marquer le plus.

Ensembles tous les deux, dans votre complémentarité, vous avez donc été ce que j'aurais pu souhaiter de mieux avant le commencement de ce travail.

J'aimerais remercier également certaines des personnes qui ont su me donner goût à la recherche et sans qui je n'aurais peut-être pas pensé à faire une thèse.

Je pense notamment à *Junko* et *Ewa*, qui, par un froid polaire, m'ont donné envie d'aller plus loin et m'ont fourni une parfaite représentation de ce que pouvait être un travail de recherche. *Junko*, *measureman will be back, someday* !

*Christian M* fait également partie de ces personnes, lui qui m'a donné mon premier cours sur le calcium 6 années en arrière, et qui m'y a fait prendre goût, au grand dam de



*Jacqueline* :) !! Ce fut vraiment un plaisir de pouvoir échanger sur un sujet aussi fondamental, dans tous les sens du terme...

Je voudrais également avoir un mot pour des scientifiques éminents, *Raoul, Alain* et *Jacques*, qui m'ont interpellé par des questions pointues et déstabilisantes, et qui ont par là-même contribué à ma formation scientifique et intellectuelle. J'ajouterai que leur culture scientifique et générale constitue des modèles à suivre.

Je me dois aussi de remercier *François*, l'homme par qui le financement arriva... et qui a donc permis ce travail. Il l'a non seulement permis mais il l'a aussi suivi, avec ses hauts et ses bas, et toujours défendu lorsqu'il fallait justifier le projet devant de toujours nouveaux responsables. J'espère sincèrement que ces résultats trouveront un jour un aboutissement *in champ*.

J'en profite aussi pour remercier vigoureusement *Emilie* pour l'accueil et la formation dispensés à Bergerac, et pour son optimisme à toute épreuve, salutaire notamment dans certaines périodes de clonages douteux !

Merci également à *l'Association pour la Recherche sur les Nicotianées* pour avoir autorisé et financé le développement des thématiques présentées dans ce manuscrit. Je souhaite vraiment que vous puissiez continuer à financer de tels travaux, je n'en ai vu ressortir que du positif au cours des réunions annuelles auxquelles j'ai pu participer.

Concernant le suivi et l'évaluation de cette thèse, je voudrais remercier sincèrement mes rapporteurs, *Alain Vavasseur* et *Michel Legrand*, pour avoir accepté de juger ce travail, puis d'être venus en discuter en ce jour de grâce du 07/10/2010. Un grand merci à *Nathalie Leborgne-Castel* et à *Christophe Roux* de m'avoir également fait l'honneur de leur présence ce jour-là.

A un moment critique de ma thèse, un de ceux qui nécessitent certaines décisions importantes, *Didier Aldon*, *Claudine Balagué* et *Stéphane Bourque* ont su m'apporter conseils et recommandations, merci à eux.

Au-delà d'une collaboration enrichissante et fructueuse sur un projet de l'équipe à terminer, *Pierre* m'a offert l'opportunité inestimable d'enseigner pour quelques TPs de L2 à l'UPS. Ce fut une expérience inoubliable, un de mes meilleurs souvenirs de thésard ! Merci de m'avoir fait confiance pour cette mission.

Il est peut-être temps de se rapprocher du « terrain » et de remercier ici notre « maman à tous », alias *Nathalie*, elle que je n'ai jamais vu craquer malgré un défilé permanent d'étudiants (voire de permanents...) en quête de ci ou de ça ici ou là. Merci d'avoir été là, en particulier les premiers mois, pour me guider à travers la jungle laboratoiresque. Maintenant que je suis sur le départ, je t'ordonne d'apprendre à dire non !





*Audrey* (la danseuse), au-delà de ses capacités douteuses à faire grève une bière à la main sur un banc au soleil ;) aura été une partenaire de projet idéale, jusqu'à mimétiser mon heure d'arrivée au labo et ma tendance maugréante, par solidarité probablement! N'oublie pas : ne remet jamais à demain ce que tu peux faire faire aujourd'hui par un autre !!

Parmi les autres contributeurs importants, je citerai *Hélène*, qui a réussi à construire une base de données cohérente à partir d'une base hétéroclite de séquences à l'origine plus ou moins douteuse ; *Yves* et *Alain*, qui ont façonné ma (maigre) expérience de la microscopie ; et *Saïda* qui a permis une percée décisive quant à l'étude de composés terminaux, laquelle n'avait pu être jusqu'alors réalisée par des « spécialistes ».

J'aimerais également dire ma reconnaissance à toutes les personnes qui se sont succédées dans les équipes RT et Ca (la liste serait trop longue pour être développée ici) et qui m'ont fait avancé grâce à leur expériences, leurs questions, leurs remarques et leurs doutes.

J'aurai bien sûr une pensée pour les personnels de l'ombre, les milieux de terrain défensifs du labo, *Michèle*, *Nicole*, *Patricia*, *Jean-Louis*, *Catherine*, *Annabelle* et tous les autres grâce à qui nous avançons tous plus facilement.

Au-delà des aspects techniques et scientifiques, ces années de thèse furent un formidable laboratoire des relations humaines, soumises à des aléas depuis une rencontre jusqu'à des au-revoir, en passant par différents stades de coévolution... :) Je dois dire que j'ai véritablement connu deux « âges d'or » au cours de cette thèse, des périodes où il était facile de venir travailler en sachant que l'on allait côtoyer des gens que l'on apprécie et avec qui l'on partage des expériences, scientifiques ou non.

La première période a coïncidé avec mon DEA et le début de ma thèse et a plutôt été, je dois l'avouer, intra-équipe RT. J'y associerai un certain nombre de personnes, y compris :

*Sylvain*, merci pour ces parties d'Unreal endiablées, je repense avec bonheur à une période où l'on arrivait en retard chez Jacqueline à un repas en ton honneur, tout ça pour quelques frags supplémentaires !

*Eric*, toi qui doit bientôt soutenir, repense à la boulothèque et à l'herpétologie, il va falloir qu'on retravaille tout ça, on a du faire des progrès dans l'animation des émoticônes depuis le temps... :)

*David*, merci d'avoir joué le garde-fou de nos éclats de voix et d'avoir supporté le mur de nos exploits.

*Laura*, *Sophie*, *Franck*, ..., votre participation active (ou pas) aux tournois de Zuma et aux discussions de bureau furent particulièrement appréciées.



La seconde période, toujours en cours d'ailleurs, est plus récente et, signe d'évolution, englobe des personnes d'horizons divers...

Je devrais peut-être commencer par remercier **DD** pour m'avoir sorti de la grotte dans laquelle je m'étais réfugié. Tiens, je n'aurais jamais cru pouvoir dire merci à la technologie Gateway ! En tout cas, et alors que je constate un ralentissement dans la fréquence à laquelle tu fournis tes potins, je te charge d'extorquer l'info ultime, celle que **Sabine** ne veut pas lâcher. Tu l'auras un jour, tu l'auras !

**Christophe**, grâce à toi et ta soutenance, j'ai pris la plus grosse montée de stress de ma thèse, à tel point que pour mon jour J à moi, j'étais quasi-détendu... J'aurais presque pu mettre « allez l'OL », pour te faire plaisir, mais non, leur dernier maillot est trop moche !

**Mathieu**, c'est magique ! Je suis passé de 12cm à 14cm en tour de biceps. Pas une truffe le gars ! Tiens, c'est l'heure de s'y filer non ? Allez hop, pas d'échappés et on met 90. :) T'inquiète, on l'aura à l'usure cette barre.

**Sophie**, toi qui doit avoir froid à l'heure où j'écris ces lignes :), ne t'inquiète pas, je reviendrai, les bras chargés de cadeaux cholestérolés. Et méfie toi, je t'attaque en justice si tu m'as fait de la publicité mensongère pour ton bled, là-haut, loin au Nord...

**Thomas**, sans toi, je ne me serai jamais replongé dans les biographies complètes de Nicolas Paviot et Ruben Rossi, et rien que ça, ça aurait été dommage ! Il faudrait rajouter la rando, la gastro et la photo de notre ami l'électricien des bowlings pour faire bon compte ! :)

**Audrey**, toi qui est chargée de la lourde tâche consistant à me succéder chez RT (ceci dit en toute modestie...), j'ai été très content de partager ce bureau avec toi dans une période où tu as réussi à toujours garder le sourire malgré mes soupirs constitutifs !

**Catherine**, j'ai été très gentil avec toi. Presque pas de commandes, et en plus, je préfère le Bourgogne ! Alors, s'il te plaît, tiens moi au courant de tes destinations de vacances, on sait jamais, ça pourrait me servir pour planifier les miennes...

**Sabine**, je suis très heureux de pouvoir t'évoquer dans ce paragraphe, alors que ce n'était pas forcément gagné au départ, si tu te rappelles... :) Je ne citerai pas Stallone à la fin de Rocky IV, m'enfin l'esprit est là !

**Yves**, tu es mon idole au ski. Un jour viendra où j'aurai ta technique (ou pas) ! Oublie pas le spécial Cuvée de Bollinger et le stichelton et tout ira bien !!

Une mention pour le team poker, **Bioboule**, **Coudu**, le **Gitan**, **Blackman** et les autres, va falloir qu'on s'y refille, j'ai un titre à défendre et des portefeuilles à délester !

De façon plus générale, je remercie tous les non-perms de ce labo et d'ailleurs, nos discussions, lorsqu'elles existaient ;), ont toujours été synonymes d'échanges et de progression.



Je peux difficilement passer sous silence les différentes équipes sportives avec lesquelles j'ai pu évoluer au cours de ces années, avec des passages dans deux équipes de foot, deux équipes de rugby, une équipe de volley et une équipe de badminton.

En particulier, merci à *Régis* et à *Moutous* pour m'avoir permis de découvrir le rugby-flag puis le rugby loisir. J'en profite pour souhaiter un maximum de boue et de neige cet hiver à tous ceux que j'ai pu côtoyer dans ces activités ovales.

Quant aux footeux, rassurez-vous, j'ai résigné jusqu'à la fin de l'année ! Y a toutefois des conditions contractuelles : que *Laurent* et *JP* arrêtent de tricher à la belote, *qu'Ed* soit mis en condition pour mettre son but annuel, *qu'Oliv* batte son record de nombre de buts, que *Nico* ne prenne pas de buts casquettes, bien aidés par ses défenseurs et que *Ben* soit capable de jouer à 100% plus de 10 minutes...

Merci aussi à la New Pie, autre équipe venue jouer les sparring-partners sur le terrain de l'ADAS INRA. On la voit la diff selon l'équipe avec laquelle je joue, hein *Dangoon* et *Eric* ?! :)

*Julien, Damien, Henry, Laurent*, vos parcours professionnels rectilignes me font rêver !! :) Ca fait vraiment plaisir de voir vos cabines régulièrement, en se souvenant de celles que l'on se coltinait au collège ou au lycée ! Je lève mon verre de spécial captain à Biscarosse !!

*Claire*, je crois que tu étais en CDD quand je suis rentré en thèse, je vois que tu l'es encore ! ;) La magie de notre IUP opère, ça fait plaisir ! Le jour où on signe un CDI, je pense qu'on peut payer le voyage à l'autre pour boire un coup au nom de l'espoir !

Une petite mention spéciale à *Henry*, à *Seb* et au *frérot*, nos repas de travail du lundi furent de formidables bouées de dégust... d'oxygène ! A nous les Romanée-Conti !

Une pensée pour mes *parents*, qui ont soutenu tous mes choix sans s'effrayer alors qu'ils auraient facilement pu m'imaginer en futur Tanguy !

Bien qu'étant l'aîné et donc un modèle « naturel », mes frères, *Guillaume* et *Mickaël*, et ma sœur, *Océane*, sont chacun à leur manière des modèles à suivre.

Enfin, *Steph*, ma moitié, merci d'avoir été toujours là avec ton amour, dans les hauts comme dans les bas. Tu es une source d'inspiration quotidienne !! Confidentiel.

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de très loin à ce travail, les mains dans le cambouis ou à des années lumière de la biologie, cités ici ou pas, vous savez toute ma reconnaissance !*

*Nico*



## SOMMAIRE

Chapitre I. INTRODUCTION GENERALE.....	1
I.1 LE CALCIUM, SECOND MESSENGER .....	2
I.1.1 Le Calcium, 2 <sup>nd</sup> messenger universel.....	2
I.1.2 Le signal calcique .....	3
I.1.2.1 Méthodes de mesure du signal calcique .....	3
I.1.2.1.1 Sondes bioluminescentes.....	3
I.1.2.1.2 Sondes fluorescentes organiques.....	3
I.1.2.1.3 Sondes fluorescentes protéiques .....	4
I.1.2.1.4 Sondes hybrides et « Bioluminescence Resonance Energy Transfert ».....	4
I.1.2.2 Spécificité du signal généré : notion de signature calcique .....	4
I.1.2.2.1 Amplitude, durée et fréquence des élévations calciques .....	5
I.1.2.2.2 Spatialisation du signal calcique.....	6
I.1.2.2.3 Amplification de la réponse : le priming .....	10
I.1.2.2.4 Action concertée du Ca <sup>2+</sup> avec les autres seconds messagers .....	11
I.1.2.2.5 Le Ca <sup>2+</sup> « toolkit » .....	11
I.1.3 Génération du message calcique .....	11
I.1.3.1 Influx d'ion Ca <sup>2+</sup> <i>via</i> l'activation de canaux calciques .....	12
I.1.3.1.1 Canaux voltage-dépendants.....	12
I.1.3.1.2 Canaux ligand-dépendants.....	13
I.1.3.1.3 Canaux mécano-sensibles .....	14
I.1.3.2 Efflux d'ion Ca <sup>2+</sup> par transport actif .....	15
I.1.3.2.1 Transporteurs à haute affinité pour le Ca <sup>2+</sup> : Ca <sup>2+</sup> -ATPases.....	15
I.1.3.2.2 Transporteurs de basse affinité pour le Ca <sup>2+</sup> : échangeurs H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> .....	16
I.1.3.3 Pouvoir tampon à l'égard du Ca <sup>2+</sup> dans la cellule.....	17
I.1.4 Décodage du signal.....	18
I.1.4.1 Système CaM-CML/Effecteur .....	18
I.1.4.2 Système CBL/CBL-interacting protein kinases.....	20
I.1.4.3 Système de signalisation <i>via</i> les CDPKs .....	21
I.1.4.4 Autres kinases Ca <sup>2+</sup> -dépendantes.....	22
I.1.5 Ca <sup>2+</sup> et activité transcriptionnelle.....	23
I.2 REACTIONS DE DEFENSE CHEZ LES PLANTES.....	25
I.2.1 Barrières pré-existantes .....	25
I.2.1.1 Barrières physiques .....	25





I.2.1.2 Barrières chimiques.....	26
I.2.2 Immunité végétale : « Pathogene-Associated Molecular Patterns-Triggered Immunity »...	26
I.2.2.1 Microbe-Associated Molecular Patterns.....	26
I.2.2.2 Damage-Associated Molecular Patterns .....	28
I.2.3 Immunité végétale : Effector-Triggered Immunity.....	28
I.2.3.1 Effecteurs pathogènes.....	29
I.2.3.2 Produits de gènes de résistance.....	30
I.2.4 Réponses de défense.....	31
I.2.4.1 Evènements précoces de signalisation.....	31
I.2.4.2 Gènes marqueurs de défense .....	32
I.2.4.3 « Hypersensitive Response » et « Programmed Cell Death » .....	33
I.2.4.4 « Systemic Acquired Resistance » .....	34
I.2.4.5 Renforcement de la paroi.....	35
I.2.5 Le modèle cryptogéine/tabac.....	36
I.2.5.1 Liaison cryptogéine-récepteur .....	36
I.2.5.2 Evènements de dé/phosphorylation.....	37
I.2.5.3 Flux ioniques.....	37
I.2.5.4 Production de ROS et de NO, inhibition du prélèvement du glucose .....	38
I.2.5.5 Dynamique membranaire .....	39
I.2.5.6 Réponses de défense : gènes marqueurs, « Hypersensitive Response », « Systemic Acquired Resistance » et renforcements pariétaux.....	40
I.3 LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES PHENYLPROPANOIDES, ROLE DANS LA DEFENSE.....	42
I.3.1 Métabolisme général des phénylpropanoïdes.....	42
I.3.1.1 Voie du shikimate .....	43
I.3.1.2 Synthèse du <i>p</i> -coumaroyl CoA .....	43
I.3.1.2.1 Phényalanine Ammonia-Lyase (PAL).....	43
I.3.1.2.2 Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) .....	44
I.3.1.2.3 4-Coumarate CoA Ligase (4CL) .....	45
I.3.2 Métabolismes dérivés du <i>p</i> -coumaroyl CoA .....	45
I.3.2.1 Biosynthèse des monolignols et lignines.....	45
I.3.2.1.1 Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinatate hydroxy Cinnamoyl Transférase (HCT) et Coumarate-3-Hydroxylase (C3H).....	46
I.3.2.1.2 Caféoyl-CoA 3-O-MéthylTransférase (CCoAOMT).....	47
I.3.2.1.3 acide Caféique/acide 5-hydroxyférulique 3-O-MéthylTransférase (COMT) .....	48
I.3.2.1.4 Férulate 5-Hydroxylase (F5H).....	48



I.3.2.1.5 Cinnamoyl CoA Réductase (CCR).....	49
I.3.2.1.6 Alcool Cinnamylique Déshydrogénase (CAD) et CAD-like .....	50
I.3.2.2 Dérivés d'acides hydroxycinnamiques .....	51
I.3.2.2.1 Les dérivés solubles .....	51
I.3.2.2.2 Les acides hydroxycinnamiques estérifiés aux parois .....	52
I.3.2.3 Biosynthèse des phénolamines .....	52
I.3.2.4 Biosynthèse de composés phénoliques volatils .....	53
I.3.2.5 Biosynthèse des flavonoïdes et des stilbènes .....	53
I.3.2.6 Biosynthèse des coumarines.....	54
I.4 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE ET PRESENTATION.....	55
I.4.1 Hypothèses et objectifs des travaux de thèse.....	55
I.4.2 Présentation des travaux de thèse.....	56
Chapitre II. REPONSES INDUITES PAR LA CRYPTOGEINE : ROLE DU METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES VIA DES MECANISMES DEPENDANTS DU SIGNAL CALCIQUE.....	58
Partie 1. Article 1. CRYPTOGEIN, A FUNGAL ELICITOR, REMODELS THE PHENYLPROPANOID METABOLISM OF TOBACCO CELL SUSPENSION CULTURES IN A CALCIUM-DEPENDENT MANNER..	59
II.1.1 Avant-propos .....	59
II.1.2 Résumé .....	59
Partie 2. CRYPTOGEINE ET METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES : RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	73
II.2.1 Avant-propos .....	73
II.2.2 Matériel et méthodes.....	74
II.2.2.1 Traitements au cycloheximide .....	74
II.2.2.2 Immunodétection de la CCoAOMT .....	74
II.2.2.3 Extraction et analyse des composés phénoliques totaux solubles. ....	75
II.2.2.4 Etude et mesure de la formation de composés volatils.....	75
II.2.2.5 Analyses microscopiques.....	76
II.2.2.6 Mesure du taux de mort cellulaire dans des cellules de tabac BY2. ....	77
II.2.3 Résultats .....	78
II.2.3.1 Analyse des niveaux de transcrits des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes : résultats complémentaires.....	78
II.2.3.2 La protéine CCoAOMT s'accumule en réponse à la cryptogéine. ....	79
II.2.3.3 La cryptogéine n'induit pas l'accumulation de phénylpropanoïdes solubles de type phénolamines. ....	79
II.2.3.4 La cryptogéine induit-elle la synthèse de phénylpropanoïdes volatils ?.....	80



II.2.3.5 La cryptogéine induit des modifications morphologiques dans des cellules de tabac BY2.....	81
II.2.3.6 La cryptogéine induit la mort cellulaire dans des cellules de tabac BY-2. ....	82
II.2.3.7 Analyse comparative cryptogéine/oligogalacturonates .....	83
II.2.3.7.1 Contexte bibliographique.....	83
II.2.3.7.2 Les oligogalacturonates induisent une réponse calcique biphasique dans des cellules de tabac BY2. ....	84
II.2.3.7.3 Les oligogalacturonates induisent une faible accumulation des transcrits de quelques gènes de la voie des phénylpropanoïdes.....	84
II.2.3.7.3 Les activités enzymatiques de la PAL et de la CCoAOMT sont très légèrement modifiées par les OGs.....	85
II.2.3.7.4 Les OGs induisent une très faible accumulation de composés phénoliques solubles.....	85
II.2.4 Discussion générale et perspectives sur le modèle cryptogéine-phénylpropanoïdes.....	87
Chapitre III. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TOBACCO BY-2 CELLS ELICITED BY CRYPTOGEIN .....	103
Article 2. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TOBACCO BY-2 CELLS ELICITED BY CRYPTOGEIN REVEALS NEW POTENTIAL ACTORS OF CALCIUM-DEPENDENT AND CALCIUM-INDEPENDENT PLANT DEFENCE PATHWAYS. ....	95
III.1 Avant-propos.....	95
III.2 Résumé.....	96
III.3 Abstract .....	97
III.4 Introduction.....	98
III.5 Material and methods.....	100
III.6 Results & Discussion .....	102
III-7 Conclusion .....	112
III-8 References.....	113
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	118
LE REMODELAGE DU METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES EST UN EVENEMENT IMPORTANT DE REPONSE A LA CRYPTOGEINE.....	119
LE DECODAGE DE LA SIGNATURE CALCIQUE INDUITE PAR LA CRYPTOGEINE PERMET L'ACTIVATION SELECTIVE DE GENES DE LA VOIE DES PHENYLPROPANOÏDES.....	120
LA PERCEPTION DE LA CRYPTOGEINE INDUIT LE REMODELAGE DE 10% DU TRANSCRIPTOME.....	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	122



## LISTE DES ABBREVIATIONS

**4CL** : 4-coumarate CoA Ligase  
**AADC** : Aromatic Amino acid DeCarboxylase  
**Aaglucan** :  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6-glucan oligosaccharides  
**ABA** : Abscissic Acid  
**ABRE** : ABscissic acid-Responsive Element  
**ACAs** : Autoinhibited Ca<sup>2+</sup>-ATPases  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ADPRc** : ADP Ribose cyclique  
**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**BAPTA** : 1,2-Bis(AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-TetraAcetic acid  
**BRET** : Bioluminescence Resonance Energy Transfert  
**C3H** : Coumarate-3-Hydroxylase  
**C4H** : Cinnamate 4- Hydroxylase  
**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>** : concentration calcique cytosolique  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext</sub>** : concentration de calcium extérieure  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub>** : concentration calcique mitochondriale  
**Ca<sup>2+</sup>-BP** : Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins  
**CAD** : Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase  
**CaM** : CalModulin  
**CaMBD** : CaM Binding Domain  
**CaMKs** : CaM-dependent protein Kinases  
**CAMTAs** : CalModulin binding Transcriptionnal Activators  
**CAX** : Calcium eXchangers  
**CCaMKs** : Ca<sup>2+</sup>/CaM regulated Kinases  
**CCE** : Capacitative Calcium Entry  
**CCoAOMT** : Caffeoyl-CoA 3-O-MethylTransferase  
**CCR** : Cinnamoyl CoA Reductase  
**CDPKs** : CaM-like Domain Protein Kinases  
**CHS** : CHalcone Synthase  
**CHX** : CycloHeXimide  
**CICI** : Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup>-Influx  
**CICR** : Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup>-Release  
**CLD** : CaM-Like Domain  
**CMLs** : CalModuline-Like





**CNGCs** : Cyclic Nucleotide-Gated Channels  
**COMT** : Caffeic acid 3-O-MethylTransferase  
**CP** : CaffeoylPutrescine  
**CRKs** : CDPK-Related Kinases  
**CXIPs** : CAX-Interacting Proteins  
**DACCs** : Depolarization-Activated Ca<sup>2+</sup>-permeable Channels  
**DAMPs** : Damage-Associated Molecular Patterns  
**dNTP** : désoxyribonucléotides  
**ECA** : ER-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
**EGTA** : Ethylene Glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-TetraAcetic acid  
**ETI** : Effector-Triggered Immunity  
**ETS** : Elicitor-Triggered Susceptibility  
**F5H** : Ferulate-5-Hydroxylase  
**FP** : FeruloylPutrescine  
**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfert  
**GA** : Acide Gibbérellique  
**Gd<sup>3+</sup>** : ion gadolinium  
**GLRs** : GLutamate Receptors  
**GMPc** : Guanosine MonoPhosphate cyclique  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène  
**HACCs** : Hyperpolarization-Activated Ca<sup>2+</sup>-permeable Channels  
**HCPro** : Helper Component Protease  
**HCT** : Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinat hydroxyCinnamoylTransferase  
**HR** : Hypersensitive Response  
**hsr** : hypersensitivity-related  
**iCRAC** : Calcium-Release Activated Calcium Current  
**iGLRs** : ionotropic GLutamate Receptors  
**IP<sub>3</sub>** : Inositol-1,4,5-triPhosphate  
**ISR** : Induced Systemic Resistance  
**JA** : Acide Jasmonique  
**La<sup>3+</sup>** : ion lanthane  
**LRR** : Leucine-Rich Repet  
**MAPKs** : Mitogen-Activated Protein Kinases  
**MAMPs** : Microbe-Associated Molecular Patterns  
**MJ** : MéthylJasmonate  
**NADP** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
**NB-LRR** : Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repet  
**NO** : Oxyde Nitrique  
**OGs** : OligoGalacturonates



**PAL** : Phenylalanine Ammonia-Lyase  
**PAMPs** : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
**PCD** : Programmed Cell Death  
**PGIPs** : PolyGalacturonase-Inhibiting Proteins  
**Pi** : Phosphate inorganique  
**PPR** : Pattern Recognition Receptor  
**PR** : Pathogenesis-Related proteins  
**PTI** : PAMP-Triggered Immunity  
**RALF** : Rapid Alkalisation Factor  
**RE** : Réticulum Endoplasmique  
**rgs** : Regulator of Gene Silencing  
**RLKs** : Receptor-Like Kinases  
**RLPs** : Receptor-Like Proteins  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**SA** : Acide Salicylique  
**SAR** : Systemic Acquired Resistance  
**SIPK** : Salicylic acid-Induced Protein Kinase  
**STS** : STilbene Synthase  
**TEV** : Tobacco Etch Virus  
**TMV** : Tobacco Mozaïc Virus  
**TPC1** : Two-Pore Channel 1  
**TTSS** : Type-Three Secretion System  
**VIGS** : Virus-Induced Gene Silencing  
**WIPK** : Wound-Induced Protein Kinase



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### FIGURES :

#### Chapitre I.

- Figure I-1 : Les quatre modules de la signalisation calcique.
- Figure I-2 : Dynamique temporelle des oscillations calciques.
- Figure I-3 : La compétence tissulaire : une composante de la spécificité du signal calcique.
- Figure I-4 : Spécificité du signal calcique, gradients calciques.
- Figure I-5 : Spécificité du signal calcique, compartimentation intracellulaire.
- Figure I-6 : Structure d'un CNGC.
- Figure I-7 : Diversité des Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins (CBP) chez les plantes.
- Figure I-8 : Diversité de structures des CBP chez les plantes.
- Figure I-9 : Diversité des processus cellulaires impliquant des CAMs/CMLs.
- Figure I-10 : Structure générale des CBLs et CIPKs.
- Figure I-11 : Vue générale des systèmes de signalisation CBL/CIPK caractérisés chez *Arabidopsis*.
- Figure I-12 : Mécanismes de régulation des CDPKs.
- Figure I-13 : Conversion de signaux calciques en réponses transcriptionnelles.
- Figure I-14 : Mécanismes de perception du danger chez les plantes.
- Figure I-15 : Mécanismes d'activation et de suppression de la PTI.
- Figure I-16 : Structures des protéines R de type NB-LRR.
- Figure I-17 : Le puzzle de la Réponse Hypersensible.
- Figure I-18 : Mécanismes de défense liés à des modifications de la paroi des plantes.
- Figure I-19 : Représentation des voies de signalisation et de transduction des signaux en réponse à la cryptogéine chez le tabac.
- Figure I-20. Signature calcique cytosolique caractéristique de la cryptogéine dans des cultures cellulaires de *Nicotiana plumbaginifolia*.
- Figure I-21 : Principales voies de biosynthèse issues du métabolisme général des phénylpropanoïdes.
- Figure I-22 : Voie du shikimate conduisant à la biosynthèse des acides aminés aromatiques.
- Figure I-23 : Réaction enzymatique catalysée par la Phénylalanine Ammonia-Lyase.
- Figure I-24 : Réaction enzymatique catalysée par la Cinnamate 4-Hydroxylase.
- Figure I-25 : Réaction enzymatique catalysée par la 4-Coumarate CoA Ligase.
- Figure I-26 : Vue générale du métabolisme des monolignols et lignines.
- Figure I-27 : Réaction enzymatique catalysée par la *p*-Coumarate 3-Hydroxylase.
- Figure I-28 : Réaction enzymatique catalysée par l'Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxyCinnamoylTransférase.
- Figure I-29 : Réaction enzymatique catalysée par la CaféoylCoA -O-MéthylTransférase.



Figure I-30 : Réaction enzymatique catalysée par l'acide caféique/acide 5-Hydroxyfêrulique 3-O-MêthylTransfêrase.

Figure I-31 : Réaction enzymatique catalysêe par la Fêrulate 5-Hydroxylase.

Figure I-32 : Réaction enzymatique catalysêe par la Cinnamoyl-CoA Reductase.

Figure I-33 : Réaction enzymatique catalysêe par l'Alcool Cinnamylique Dêshydrogênase.

Figure I-34 : Exemples de phênolamines.

Figure I-35 : Voie de biosynthêse de la fêruloyltyramine.

Figure I-36 : Voie de biosynthêse putative des phênylpropanoïdes volatils chez la tomate.

Figure I-37 : Voie de biosynthêse des coumarines par *ortho*-hydroxylation, *trans/cis*-isomêrisation de la chaîne latêrale et lactonisation.

## Chapitre II. Partie 1. Article 1.

Figure 1. Biosynthetic routes for phenolic compounds adapted from the model proposed by Nair *et al.* (2004) for *A. thaliana*.

Figure 2. Cryptogein-induced calcium signatures in tobacco BY-2 cells.

Figure 3. Effects of cryptogein on transcript accumulation of phenylpropanoid genes in tobacco BY-2 cells.

Figure 4. Principal Component Analysis.

Figure 5 Time course of relative enzymatic activities of PAL and CCoAOMT.

Figure 6. Distribution of radioactivity in tobacco BY-2 cell suspensions incubated for 4 hours with [<sup>14</sup>C(U)]-cinnamic acid.

Figure 7. Effect of inhibiting calcium influx on cryptogein-induced calcium variations (a) and transcript accumulation (b) in tobacco BY-2 cells.

Figure 8. Effects of calmodulin inhibitors W12 and W13 on the cryptogein-response.

Figure 9. Proposed model for regulation of cryptogein-induced transcriptional response by calcium.

Figure 10. Fits of the two-component model described in Fig. 9 to experimental data.

Figure S1. Comparison between lanthanum chloride and EGTA pre-treatments on cryptogein-induced phenylpropanoid genes expression in tobacco BY-2 cells.

Figure S2. Effect of a cycloheximide pre-treatment on the cryptogein-induced accumulation of phenylpropanoid gene transcripts.

Figure S3. Relative transcript levels of genes coding for PAL, 4CL and CCoAOMT isoforms.

Figure S4. Cytosolic calcium variations induced in tobacco BY-2 cells by calmodulin interactors.

Figure S5. Role of the different components of the calcium signature in the cryptogein induced cell death.

Figure S6. Mathematical formulation of the model described Fig 9.





## Chapitre II. Partie 2.

Figure II-1. Immunodétection de la CCoAOMT par Western Blot.

Figure II-2. Dosage des composés phénoliques solubles totaux dans des cellules de tabac BY2.

Figure II-3. Cinétique d'accumulation de transcrits du gène *ODC* dans des cellules de tabac BY-2 élicitées par 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine.

Figure II-4. Profil HPLC des phénols solubles totaux extraits de cellules de tabac BY-2 traitées par de l' $\text{H}_2\text{O}$  ou 0,5  $\mu\text{M}$  de cryptogéine.

Figure II-5. Accumulation de transcrits des gènes *AADC1A* et *AADC2* dans des cellules de tabac BY-2 élicitées par 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine.

Figure II-6. Distribution de la radioactivité dans des cellules de tabac BY2 incubées pendant 4 heures avec (A) de la [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-L-Phénylalanine ou (B) de l'acide [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Cinnamique (0.2  $\mu\text{Ci} / \text{ml}$ ).

Figure II-7. Détection de composés autofluorescents dans des cellules de tabac BY-2 *in vivo*.

Figure II-8. Détection de composés auto fluorescents dans des cellules de tabac BY-2.

Figure II-9. Coloration au bleu de toluidine de cellules de tabac BY-2.

Figure II-10. Effets de la cryptogéine sur la viabilité cellulaire.

Figure II-11. Cinétique de la variation calcique cytosolique induite dans des cellules de tabac BY-2 par les OGs.

Figure II-12. Etude de la dose-dépendance des variations calciques cytosoliques induites par les OGs dans des cellules de tabac BY2.

Figure II-13. Dose-dépendance de l'accumulation de transcrits de gènes de la voie des phénylpropanoïdes en réponse aux OGs.

Figure II-14. Effet du lanthane sur l'accumulation de transcrits des gènes CCoAOMT et CAD induite par les OGs.

Figure II-15. Cinétique d'activation des gènes *PAL*, *HCT* et *CCoAOMT* en réponse aux OGs.

Figure II-16. Activités enzymatiques de la PAL et de la CCoAOMT.

Figure II-17. Dosage des composés phénoliques solubles totaux dans des cellules de tabac BY-2.

## Chapitre III. Article 2.

Figure III-1. Venn diagram of genes regulated by 'cryptogein' and 'cryptogein +  $\text{LaCl}_3$ ' treatments.

Figure III-S1. Cryptogein-induced calcium signatures in tobacco BY-2 cells.



## **TABLEAUX :**

### **Chapitre I.**

Tableau I-1 : Exemples de signatures calciques cytosoliques mesurées dans des cellules de plantes en réponse à des stimuli biotiques ou abiotiques.

Tableau I-2 : Canaux et transporteurs de Ca<sup>2+</sup> responsables des flux calciques dans une cellule de plante.

Tableau I-3 : Diversité des protéines de type Pathogenesis-Related (PR).

### **Chapitre II. Partie 1. Article 1.**

Tableau 1. Cryptogéine effect on the accumulation of insoluble phenolic compounds in tobacco BY-2 cells.

Tableau S1. Paires d'amorces utilisées pour la RT-qPCR et tailles d'amplicons.

### **Chapitre III. Article 2.**

Tableau III-1. Comparison of results obtained with microarrays and qRT-PCR.

Tableau III-2. Signal transduction-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-3. Oxilipin pathway-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-4. Transcription factors genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-5. Defense-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-6. Cell wall-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-7. Secondary metabolism-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogéine.

Tableau III-8. Functional categories that show a significant deviation from the background binomial distribution for inhibitor sensitivity.



# **Chapitre I. INTRODUCTION GENERALE**

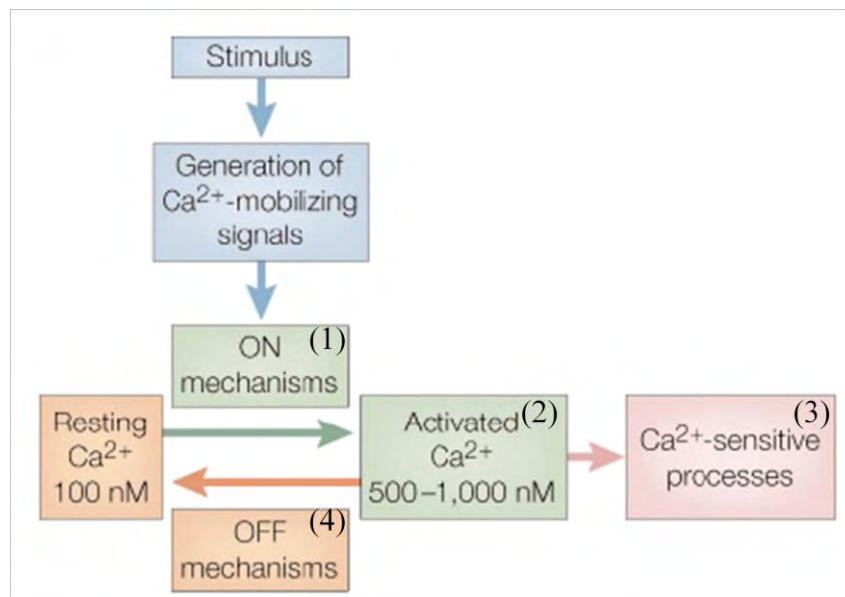


Figure I-1 : **Les quatre modules de la signalisation calcique.**

Un stimulus va activer, *via* la génération de signaux de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$ , des mécanismes « on » (1) susceptibles d'induire des augmentations de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracellulaire (2). Ces augmentations induisent des processus  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants (3) qui vont conduire à une réponse adaptative. La variation de  $\text{Ca}^{2+}$  est arrêtée par des mécanismes « off » (4) permettant de restaurer une  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracellulaire basale. (Berridge 2000).

## I.1 LE CALCIUM, SECOND MESSENGER

### I.1.1 Le Calcium, 2<sup>nd</sup> messenger universel.

L'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est un constituant absolument ubiquitaire et essentiel des cellules eucaryotes. Sydney Ringer, un célèbre clinicien anglais, l'a montré dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle ; de petites quantités d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  ajoutées à une perfusion de chlorure de sodium permettent le maintien d'un rythme cardiaque normal. Ses travaux ont permis la mise au point de la solution isotonique de Ringer, laquelle contient 1,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . De même, chez les végétaux, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un nutriment essentiel, suffisant pour protéger les plantes d'un stress salin majeur si sa concentration dans une solution nutritive est égale ou supérieure à 1mM (Lahaye et Epstein 1969).

Au niveau du cytosol des cellules eucaryotes végétales, une concentration basse en  $\text{Ca}^{2+}$  libre est maintenue, de l'ordre de  $10^{-7}\text{M}$ , de sorte que celui-ci ne risque pas de précipiter le phosphate inorganique (Pi), composant essentiel pour le métabolisme cellulaire. C'est pourquoi, au cours de leur évolution, les eucaryotes ont développé des mécanismes leur permettant de réguler finement l'homéostasie du calcium en maintenant la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytosolique ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) à un niveau de repos d'environ  $10^{-7}\text{M}$ . En revanche, dans la plupart des autres compartiments cellulaires, la concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$  est bien supérieure et varie entre  $10^{-4}$  et  $10^{-2}\text{M}$ , de telle sorte qu'un gradient de concentration important existe entre les compartiments jouant un rôle de réserve (Bush, 1995) et le cytosol. Lorsque la cellule perçoit un stimulus interne ou externe, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  peut croître au-delà de  $10^{-6}\text{M}$  et constituer ainsi l'un des tous premiers événements de signalisation cellulaire conduisant à une réponse appropriée (Berridge 2000 ; figure I-1). Les forts gradients de concentration calcique et des modifications du potentiel transmembranaire (dépolariation ou hyperpolarisation) permettent d'expliquer la rapidité des réponses calciques induites par la perception d'un stimulus interne ou externe. En effet, les gradients de concentration autorisent la diffusion rapide et passive des ions calcium à travers ces membranes *via* des canaux perméants au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces ions calcium sont ensuite excrétés de façon active dans les organites ou dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme actif de restauration d'une  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  normale qui contribue à l'homéostasie du calcium comprend notamment des canaux calciques, des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases et des antiports  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , capables de recharger les organites en ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Sanders 2002). La vacuole, la mitochondrie, le Réticulum Endoplasmique (RE), les chloroplastes et le noyau sont tous capables d'accumuler des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et participent ainsi au maintien de l'homéostasie calcique (Allen *et al.* 1995 ; Bush 1995 ; Logan et Knight 2003 ; Xiong *et al.* 2006 ; Mazars *et al.* 2008). Par ailleurs, la paroi des cellules végétales, à l'extérieur de la membrane plasmique, est également capable d'accumuler une grande quantité d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Sentenac et Grignon 1981), grâce aux pectines de la lamelle moyenne, servant ainsi de pouvoir tampon, mais également de réserve mobilisable par la cellule.





## I.1.2 Le signal calcique

### I.1.2.1 Méthodes de mesure du signal calcique

L'intérêt grandissant pour les variations calciques intracellulaires a conduit dès les années 1920 à la recherche d'outils pour la mesure et la visualisation de ces variations calciques. Par chélation du calcium avec l'alizarine, Pollack (1928) a pour la première fois montré les mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  lors des déplacements de l'amibe (Pollack 1928). Toutefois, il a fallu attendre 1967 pour disposer d'une sonde bioluminescente suffisamment sensible pour mesurer le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire : l'aequorine (Shimomura *et al.* 1962 ; Ridgway et Ashley 1967). L'imagerie proprement dite n'a démarré qu'avec l'apparition des sondes fluorescentes. Il existe aujourd'hui quatre types majeurs de sondes capables de mesurer un signal calcique : les sondes fluorescentes organiques type fluo/fura, les sondes fluorescentes adressables basées sur la technique du « Fluorescence Resonance Energy Transfert » (FRET) type caméléon, les sondes bioluminescentes type aequorine et les sondes hybrides aequorine/ Green Fluorescent Protein (GFP)

#### I.1.2.1.1 Sondes bioluminescentes

L'évolution des connaissances sur la signalisation calcique doit beaucoup à la découverte d'une protéine luminescente de méduse (*Aequorea victoria*), l'aequorine (Shimomura *et al.* 1962). L'aequorine est un complexe moléculaire formé d'une protéine, l'apo-aequorine, et d'un chromophore, la coelentarazine. L'aequorine possède 3 sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de type EF-hand. Quand trois ions  $\text{Ca}^{2+}$  se lient à la protéine, un changement conformationnel se produit et induit une oxydation intramoléculaire du chromophore faisant passer ce dernier dans un état excité. Le retour à l'état normal est accompagné d'une émission de lumière à 469 nm. L'intensité de la bioluminescence émise est proportionnelle à la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu environnant (Allen *et al.* 1977). La transformation et l'expression de cette protéine dans les plantes a permis la description de nombreuses signatures calciques en réponse à différents stress (Knight *et al.* 1991). Il est par ailleurs possible d'adresser l'aequorine à un organite spécifique (*via* une fusion entre l'aequorine et une protéine disposant d'un signal d'adressage spécifique), permettant ainsi de visualiser des variations calciques dans le chloroplaste (Jonhson *et al.* 1995), dans le noyau (Van der Luit *et al.* 1999), dans la mitochondrie (Logan et Knight 2003) ou encore sur la face cytoplasmique du tonoplaste (Knight *et al.* 1996).

#### I.1.2.1.2 Sondes fluorescentes organiques

Les premières sondes de ce type ont été synthétisées dans le groupe de Tsien ; la première sonde, le Quin-2, était constituée d'un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$ , le BAPTA (1,2-Bis(AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-TetraAcetic acid) ou l'EGTA (Ethylene Glycol-



bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-TetraAcetic acid), et d'un fluorophore (Tsien *et al.* 1982). Cette sonde a rapidement été abandonnée au profit de sondes plus performantes en termes de spécificité vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$ , de rapidité de réponse, de rendement quantique et de dynamique. Il existe désormais un grand nombre de sondes fluorescentes organiques (Minta *et al.* 1989 ; Paredes *et al.* 2008) dont certaines ont été rendues perméables par acétométhyl-estérification.

#### I.1.2.1.3 Sondes fluorescentes protéiques

Ces sondes, aussi appelées sondes caméléon, ont été développées pour pallier les inconvénients des sondes bioluminescentes (faible lumière émise et localisation spatiale difficile). Ces sondes adressables sont constituées de deux dérivés de la GFP associés à une structure capable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$ . (Miyawaki *et al.* 1997 ; Palmer et Tsien 2006). Le fonctionnement de ces sondes est basé sur le FRET, un phénomène quantique qui met en jeu un transfert d'énergie entre un donneur fluorescent et un accepteur fluorescent. Les fluorescences du donneur et de l'accepteur sont enregistrées, et le ratio de ces intensités varie proportionnellement à la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces sondes allient les avantages des sondes de type aequorine (adressage facilité) avec ceux de la fluorescence (localisation spatiale possible). De telles sondes ont rapidement été mises en œuvre avec succès chez les végétaux et devraient contribuer à apporter de nouveaux éclairages sur la signalisation calcique chez les plantes (Allen *et al.* 1999 ; Sieberer *et al.* 2009).

#### I.1.2.1.4 Sondes hybrides et « Bioluminescence Resonance Energy Transfert »

*In vivo*, la bioluminescence de certaines cellules de la méduse produit une lumière verte à 509nm, résultant d'un transfert d'énergie de l'aequorine vers une protéine fluorescente en vert : la GFP. Récemment, on a pu reconstituer dans des cellules animales un complexe GFP-aequorine capable de reproduire le transfert d'énergie intramoléculaire qui se produit dans la méduse (Baubet *et al.* 2000). Cette protéine chimère fonctionne *via* le « Bioluminescence Resonance Energy Transfert » (BRET), un phénomène semblable au FRET. Cette technique permet de combiner les avantages de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de l'aequorine et le meilleur rendement lumineux de la fluorescence de type GFP.

#### I.1.2.2 Spécificité du signal généré : notion de signature calcique

La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  est maintenue à un niveau de  $10^{-7}\text{M}$  alors que la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les organites environnants est plutôt de l'ordre de  $10^{-6}/10^{-4}\text{M}$ , et de  $10^{-3}\text{M}$  à l'extérieur de la cellule. Les membranes de ces organites hébergent divers types de canaux calciques régulés par le voltage, un ligand ou encore un stress mécanique. Les événements de signalisation

Stimulus	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> response	References
Pathogens	Biphasic (1) Slow spike (min)  (2) Sustained elevation (h) (3) Oscillations in [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Knight <i>et al.</i> (1991); Mithöfer <i>et al.</i> (1999) Blume <i>et al.</i> (2000); Grant <i>et al.</i> (2000); Fellbrich <i>et al.</i> (2000); Klüsener <i>et al.</i> (2002) Lecourieux <i>et al.</i> (2002); Poinssot <i>et al.</i> (2003)
Oxidative stress	(1) Brief [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> spike (2) Sustained [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> elevation (3) Oscillations in [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Price <i>et al.</i> (1994); Levine <i>et al.</i> (1996); Clayton <i>et al.</i> (1999); Allen <i>et al.</i> (2000); Kawano & Muto (2000); Klüsener <i>et al.</i> (2002); Lecourieux <i>et al.</i> (2002)
Heat shock	Elevated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> sustained for 15–30 min	Gong <i>et al.</i> (1998); Mahló <i>et al.</i> (1998)
Cold shock	(1) Single brief [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> spike (s) (2) Oscillations in [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Knight <i>et al.</i> (1991); Mahló <i>et al.</i> (1998); Knight (2000)
Red light	Elevated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Shacklock <i>et al.</i> (1992); Mahló <i>et al.</i> (1998)
Blue light	Brief spike in [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> (s)	Mahló <i>et al.</i> (1998); Baum <i>et al.</i> (1999)
UV-B	Slow [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> rise, elevated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> sustained for several minutes	Frohmeyer <i>et al.</i> (1999)
Anoxia	Biphasic (1) Slow [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> spike (min) (2) Sustained [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> elevation (h)	Subbaiah <i>et al.</i> (1994); Sedbrook <i>et al.</i> (1996)
Hypo-osmotic stress	Biphasic (1) Small [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> elevation (2) Large [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> elevation	Takahashi <i>et al.</i> (1997); Mahló <i>et al.</i> (1998); Knight (2000); Pauly <i>et al.</i> (2001)
Drought-hyper-osmotic	Biphasic stress (1) Slow [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> spike (min) (2) Sustained [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> elevations (h)	Knight <i>et al.</i> (1997); Klegle <i>et al.</i> (2000) Mahló <i>et al.</i> (1998); Cessna & Low (2001); Pauly <i>et al.</i> (2001)
Mechanical stimulation	Brief [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> spike (s) Tissue [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> wave	Knight <i>et al.</i> (1991); Haley <i>et al.</i> (1995); Legue <i>et al.</i> (1997); Plieth (2001)
Absciscic acid	Oscillation in [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> Elevated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> at cell periphery Elevated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> around vacuole	McAinsh <i>et al.</i> (1992); Allen <i>et al.</i> (2000); Schroeder <i>et al.</i> (2001)

Tableau I-1 : **Exemples de signatures calciques cytosoliques mesurées dans des cellules de plantes en réponse à des stimuli biotiques ou abiotiques.** (Lecourieux *et al.* 2006).

cellulaire démarrent lorsqu'un ou plusieurs de ces canaux s'ouvrent et laissent passer le  $\text{Ca}^{2+}$  selon le gradient électrochimique préétabli (Ward et Schroeder 1994 ; Trewavas et Malho 1997). Un simple canal peut conduire  $10^6$  ions  $\text{Ca}^{2+}$  par seconde, ouvrant la voie à une augmentation très rapide de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Par la suite, l'activation de pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases ou échangeurs  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  situés sur la membrane plasmique, les membranes du RE, du chloroplaste ou du Golgi, conjuguée à l'activité des canaux, permet de moduler la durée et l'intensité du signal calcique.

Le spectre des stimuli internes ou externes perçus par la plante et capables d'induire des variations de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  est absolument considérable. La lumière rouge (Shacklock *et al.* 1992), les hormones telles que l'Acide Abscissique (ABA ; McAinsh *et al.* 1990) et l'Acide Gibbérellique (GA ; Bush et Jones 1988), la sécheresse (Knight *et al.* 1997), le stress hypo-osmotique (Taylor *et al.* 1996), les stress mécaniques et le froid (Knight *et al.* 1991 et 1996), les stress oxydatifs et la chaleur (Price *et al.* 1994 ; Gong *et al.* 1998), la carence en bore (Koshiha *et al.* 2010), les facteurs Nod (Ehrhardt *et al.* 1996), les sphingolipides (Ng *et al.* 2001 ; Lachaud *et al.* 2010a) et les éliciteurs fongiques (Knight *et al.* 1991 ; Lecourieux *et al.* 2002 ; Lecourieux *et al.* 2005), sont tous capables d'induire la génération d'un signal calcique (tableau I-1). L'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la signalisation cellulaire en réponse à tous ces stimuli pose la question du codage de la spécificité de réponse par le calcium. Celle-ci peut, en fait, être codée *via* un certain nombre de mécanismes associés à la combinatoire des caractéristiques de la signature calcique, à savoir l'amplitude, la durée et la fréquence des élévations calciques qui se manifestent sous forme de pics transitoires, plateaux, vagues ou oscillations calciques spécifiques à un stimulus perçu (Evans *et al.* 2001 ; Berridge *et al.* 2003). La localisation fine des variations calciques, uniquement dans certains organites ou *via* des microdomaines calciques membranaires permet une compartimentation des réponses (Oldroyd et Downie 2008) qui code aussi une information de spécificité. Par ailleurs, le  $\text{Ca}^{2+}$ -priming, mécanisme par lequel la cellule va amplifier la sensibilité de réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  afin d'établir une réponse adaptative appropriée (Young *et al.* 2006) ainsi que le déclenchement d'événements de signalisation supplémentaires sont également des processus par lesquels une spécificité de réponse peut être apportée.

#### I.1.2.2.1 Amplitude, durée et fréquence des élévations calciques

Les dynamiques temporelles des signatures calciques de plantes varient de façon très marquée et incluent notamment des pics, des vagues et des oscillations. Chaque signature se caractérise notamment par le temps de latence s'écoulant entre la perception du stimulus et le début de l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , par le temps nécessaire pour atteindre l'élévation maximale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , et par la durée totale de la variation calcique. Dans les cellules animales, l'amplitude et la durée de la signature calcique peuvent influencer l'expression des gènes nécessaires à la réponse adaptative ; NFkB et JNK (des régulateurs transcriptionnels) sont sélectivement activés par une importante élévation transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  alors que

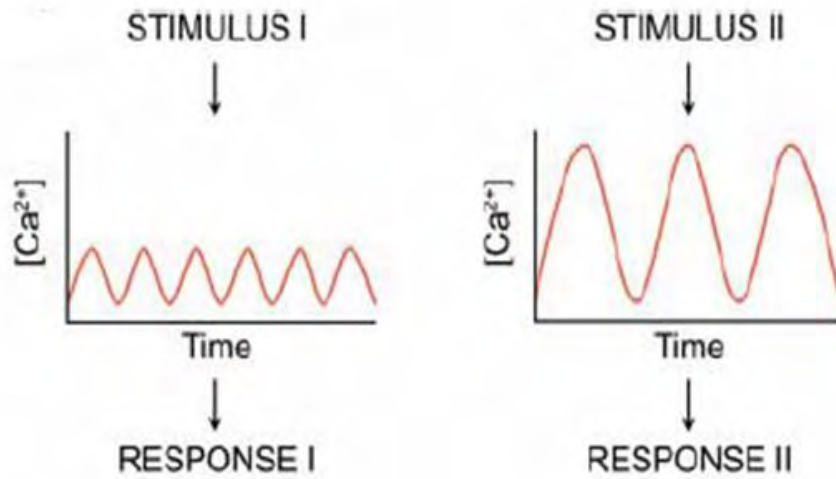


Figure I-2 : **Dynamique temporelle des oscillations calciques.**

Selon l'amplitude, la durée et la fréquence des oscillations calciques, des réponses différentes sont observées, illustrant la spécificité du signal calcique liée à la dynamique temporelle. (McAinsh et Pittman 2009).

l'activation de l'expression de NFAT requiert un plateau calcique peu élevé mais prolongé dans le temps (Dolmetsch *et al.* 1997).

Chez les plantes, le modèle de la cellule de garde du stomate a permis de mettre en évidence de tels mécanismes. L'ABA, le froid, la concentration de calcium extérieure ( $[Ca^{2+}]_{ext}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont tous des stimuli induisant des oscillations calciques cytosoliques dans la cellule de garde, qui conduisent à la fermeture des stomates (McAinsh *et al.* 1995 ; Allen *et al.* 2000 et 2001a). En revanche, dans le mutant *det3* qui a une activité  $H^+$ -ATPase vacuolaire réduite, les oscillations calciques cytosoliques de la cellule de garde ne se produisent plus qu'en réponse au froid et à l'ABA (Allen *et al.* 2000). L' $H_2O_2$  et la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  induisent des élévations prolongées de  $Ca^{2+}$  cytosolique insuffisantes pour la fermeture correcte du stomate. Au contraire, si l'on provoque de manière forcée des oscillations calciques chez le mutant *det3*, on restaure le phénotype de fermeture des stomates en réponse à l' $H_2O_2$  notamment (Allen *et al.* 2000). Ces résultats mettent en lumière l'importance de la forme et de la durée de la signature calcique intervenant dans la cellule de garde. En effet, seules les oscillations induites dans une certaine fenêtre de fréquence, avec une certaine durée et une certaine latence provoquent la fermeture classique du stomate (Allen *et al.* 2001 ; McAinsh et Schroeder 2010 ; figure I-2).

#### I.1.2.2.2 Spatialisation du signal calcique

La spatialisation du signal est aussi une composante très importante de la signature calcique. Elle résulte d'un certain nombre de mécanismes, basés sur la localisation du signal et de ses acteurs, permettant d'expliquer en partie la spécificité de réponse : (i) la compétence tissulaire ou cellulaire résulte de la capacité d'un tissu ou d'une cellule donnée à répondre à un stimulus et à un temps  $t$  précis lié à l'aptitude des cellules à exprimer les effecteurs liés à la signalisation; (ii) les vagues et les gradients calciques intra ou inter tissulaires permettent à la plante de localiser plus finement le signal calcique et ainsi d'induire des réponses spécifiques dans des zones très précises ; et (iii) la compartimentation intracellulaire explique bien des spécificités de réponse selon que le signal calcique est généré dans le cytosol ou bien dans tout autre organe.

##### ➤ Compétence tissulaire ou cellulaire

Il a été proposé que la spécificité dans les systèmes de signalisation calcique soit en premier lieu codée par le niveau de compétence d'une cellule à répondre à un stimulus donné (McAinsh et Hetherington 1998). Une cellule ne peut potentiellement répondre à un stimulus que si elle possède la batterie de protéines capables de générer, décoder et arrêter le signal calcique (voir aussi Chapitre I.1.2.2.5). La visualisation *in vivo* des variations de  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  induites par un choc froid dans les plantules de tabac indique que l'amplitude de la réponse est bien plus importante dans les cotylédons et les racines que dans les hypocotyles (Knight *et*

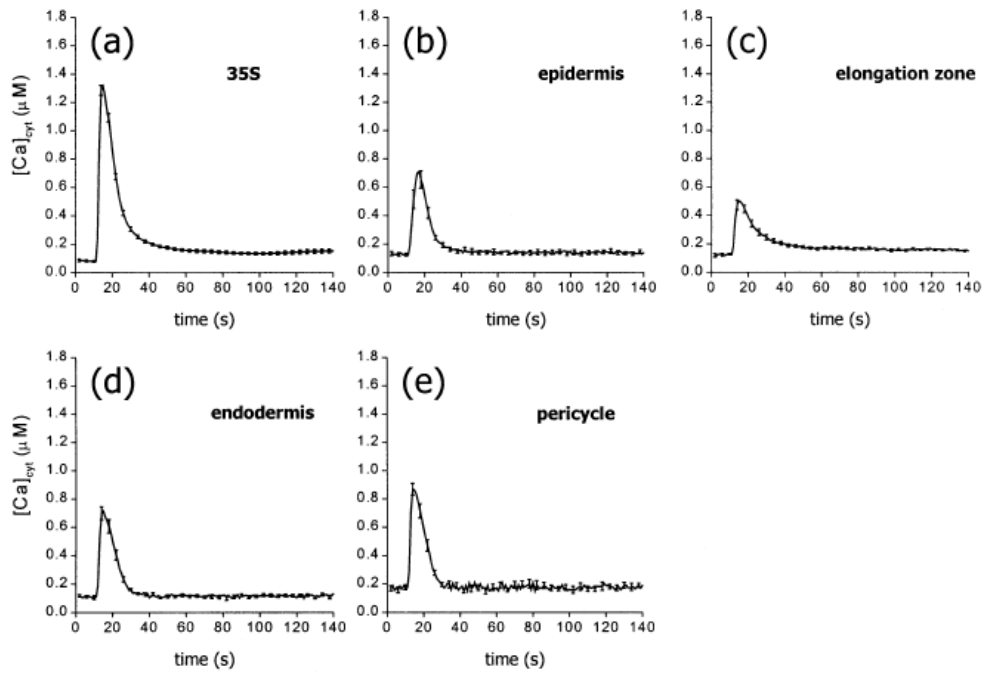


Figure I-3 : **La compétence tissulaire : une composante de la spécificité du signal calcique.**

Des réponses calciques différentes sont obtenues en réponse à un stress osmotique (440 mM de mannitol) dans différents tissus de la racine d'*Arabidopsis*. (Kiegle *et al.* 2000a). (a) Réponses de plantules exprimant constitutivement l'aéqurine. (b-e) Réponses de plantules exprimant l'aéqurine dans (b) l'épiderme, (c) la zone d'élongation, (d) l'endoderme et (e) le péricycle.

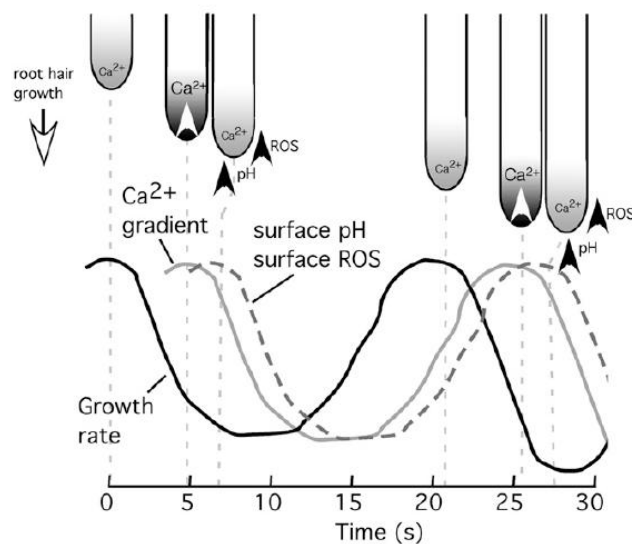


Figure I-4 : **Spécificité du signal calcique, gradients calciques.**

Cette figure illustre les relations temporelles et spatiales entre la croissance, le gradient calcique, le pH et la production de ROS dans des poils racinaires d'*Arabidopsis*. (Monshausen *et al.* 2008).



*al.* 1993). Par ailleurs, les types cellulaires qui cohabitent au sein d'un même tissu peuvent participer de manière différentielle au processus de signalisation calcique. Ainsi, alors qu'en réponse à un choc froid, tous les tissus de la racine (périderme, endoderme, péricycle et zone d'élongation) enregistrent une élévation de calcium cytosolique comparable, un choc osmotique induit des signatures calciques différentes dans ces mêmes tissus (Kiegle *et al.* 2000a). L'endoderme et le péricycle montrent une signature différente de celle observée dans le périderme et la zone d'élongation, suggérant une compétence cellulaire différentielle des tissus nécessaire à l'adaptation complète de l'organe (racine) au stress subi (figure I-3). Préfigurant le concept de gradient calcique, particulièrement étudié dans la croissance du tube pollinique, il a été montré dans les racines d'*Arabidopsis* que d'importants courants calciques dus à des « Hyperpolarization-Activated Ca<sup>2+</sup>-permeable Channels » (HACCs) n'étaient retrouvés que dans la zone d'élongation de la racine, contrairement à ce qui peut se passer dans les autres zones cellulaires de la racine (Kiegle *et al.* 2000b). Dans cette zone de la racine, il a été proposé que le prélèvement continu de Ca<sup>2+</sup>, nécessaire pour une division cellulaire rapide et une élongation optimale, soit permis par un fort courant calcique.

#### ➤ Gradients calciques

Les gradients de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> sont d'importants déterminants de la polarité à l'extrémité de tissus en élongation tels que les poils racinaires (Felle et Hepler 1997 ; Wymer *et al.* 1997 ; Kim *et al.* 2006), les rhizoïdes (Brownlee et Wood 1986 ; Taylor *et al.* 1996) et les tubes polliniques (Rathore *et al.* 1991 ; Franklin-Tong *et al.* 1996 ; Michard *et al.* 2009).

La croissance des tubes polliniques est étroitement liée à la présence de ce gradient qui chute de 3µM à 200nM sur 10-20µm depuis l'extrémité des tubes (Pierson *et al.* 1996 ; Hepler *et al.* 2001). Dans ce gradient de Ca<sup>2+</sup>, la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> oscille en phase décalée avec l'oscillation de croissance correspondante, laissant supposer que des canaux calciques mécano senseurs sont impliqués (Dutta et Robinson 2004).

Ainsi que l'illustre la figure I-4, la croissance des poils racinaires dépend aussi d'un gradient de Ca<sup>2+</sup> dans lequel les oscillations sont suivies d'une phase de latence permettant la croissance (Monshausen *et al.* 2008). Cette oscillation calcique est suivie d'une production de « Reactive Oxygen Species » (ROS), elle-même oscillatoire (Monshausen *et al.* 2007 et 2008). La Rhd2 NADPH oxydase localisée dans la membrane plasmique au site d'élongation du poil racinaire est nécessaire à la croissance appropriée du poil et semble dépendre d'une régulation par des protéines kinase Ca<sup>2+</sup>-dépendantes (Takeda *et al.* 2008). En conséquence, il semblerait que le Ca<sup>2+</sup> et les ROS forment une double boucle de rétrocontrôle permettant de maintenir le gradient calcique dans le poil racinaire et ainsi réguler sa croissance (figure I-4).

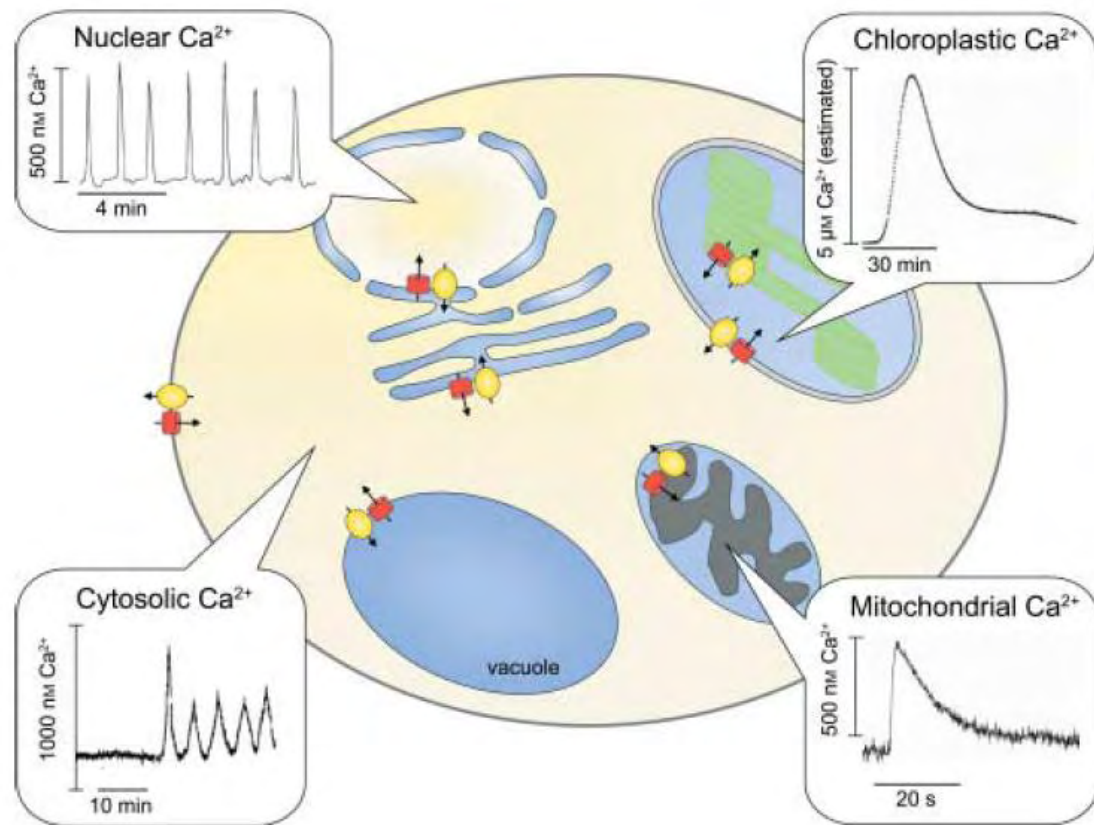


Figure I-5 : **Spécificité du signal calcique, compartimentation intracellulaire.**

Oscillations calciques induites par des stimuli dans le cytosol, le noyau, le chloroplaste et la mitochondrie. Les oscillations calciques sont générées par un oscillateur calcique intégré comprenant une voie d'influx calcique (canaux calciques, cylindres rouges), et une voie d'efflux calcique (Ca<sup>2+</sup>-ATPases et échangeurs à cations, ovals jaunes). Les signatures calciques cytosoliques peuvent être générées *via* un influx de Ca<sup>2+</sup> externe à la cellule ou le relargage de Ca<sup>2+</sup> depuis les compartiments internes et *via* le repompage de Ca<sup>2+</sup> par des pompes calciques membranaires. Les signatures calciques nucléaires, telles que les oscillations calciques générées en réponse au facteur Nod observées dans les poils racinaires de *Medicago truncatula* sont vraisemblablement dépendantes du relargage et/ou de l'accumulation de Ca<sup>2+</sup> dans des compartiments proches tel que l'enveloppe nucléaire. Les oscillations calciques chloroplastiques ont été observées dans le stroma de plantules de tabac après un stimulus obscurité. Des transporteurs de Ca<sup>2+</sup> identifiés dans l'enveloppe interne de la membrane du thylakoïde pourraient être requis pour la génération de ces oscillations. Les oscillations calciques mitochondriales, telles que générées par un stimulus mécanique dépendent de l'influx et de l'efflux calcique dans et depuis le lumen mitochondrial, bien que l'identité des protéines impliquées soient inconnue. (McAinsh et Pittman 2009).

➤ Vagues calciques

Dans les cellules animales, il a pu être montré que beaucoup de signaux calciques se propageaient tels des vagues à travers le cytoplasme de la cellule. La première observation date de 1978 quand Gilkey *et al.* ont décrit pour la première fois les vagues calciques tels des tsunamis à travers les cellules d'un poisson appelé medaka, *Oryzias latipes* (Gilkey *et al.* 1978). Ces vagues sont initiées à une localisation déterminée et se propagent sous l'effet d'influx calciques provenant de pools internes (Gilkey *et al.* 1978 ; Gilkey 1983 ; Jaffe *et al.* 1995 ; Trewavas 1999). Plusieurs modèles coexistent. L'un d'entre eux est lié au concept de CICR (pour « Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup>-Release ») qui décrit que des canaux IP<sub>3</sub>- (Inositol-1,4,5-triPhosphate) ou ADPRc-dépendants (ADP Ribose cyclique) peuvent être activés séquentiellement par une élévation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> et conduire ainsi à un relargage progressif et régénératif de Ca<sup>2+</sup> issu de pools intracellulaires (Gilkey *et al.* 1983). Plus récemment, un autre modèle a été proposé dans lequel la progression de la vague calcique est relayée par un courant calcique provenant de la membrane plasmique : c'est le CICI (pour « Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup>-Influx »). La vague se déplacerait environ dix fois plus vite qu'une vague CICR-dépendante (100-1000µm/s contre 3-30µm/s) et serait entretenue par des canaux mécano-senseurs (Jaffe *et al.* 2007). En revanche, chez les végétaux, de tels phénomènes restent assez peu étudiés en dehors du modèle de rhizoïde de Fucus. En effet dans le rhizoïde de Fucus, un choc hypoosmotique induit une variation calcique cytosolique qui est relayée par une vague calcique initiée à l'apex du rhizoïde et qui se propage à une vitesse de 5-10µm/s vers la base du rhizoïde *via* un relargage de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Taylor *et al.* 1996). Le même mécanisme se produit dans la cellule de garde de cellules de *Vicia faba* stimulées électriquement dans lesquelles une vague de Ca<sup>2+</sup> centripète s'étend à partir de la périphérie du cytoplasme (Grabov et Blatt 1998).

➤ Compartimentation intracellulaire

La compartimentation du signal calcique, à savoir la génération d'une variation de la [Ca<sup>2+</sup>] dans un organite spécifique ou dans des microdomaines au sein d'un même organite permet également l'encodage d'une spécificité de réponse. La vacuole, le RE, l'apoplaste sont d'importants pools de réserve de Ca<sup>2+</sup> alors que le noyau, la mitochondrie et le chloroplaste sont des organites capables de générer leurs propres signaux calciques (McAinsh et Pittman 2009 ; figure I-5). Chez les animaux, l'importance de la compartimentation calcique a été particulièrement bien décrite. Il a notamment été montré que l'activation Ca<sup>2+</sup>-dépendante de certaines voies transcriptionnelles était sélective, selon la localisation du signal (Hardingham *et al.* 1997). Les éléments SRE (pour « Sérum-Response Element ») et CRE (pour « Cyclic-AMP-Response Element ») sont activés différemment et respectivement par un signal calcique cytosolique et un signal calcique nucléaire (Hardingham *et al.* 1997).



L'étude de la voie de signalisation des facteurs Nod a permis de mettre en évidence l'établissement d'une voie de signalisation calcique nucléaire primordiale pour la mise en place des réponses adaptatives spécifiques (Oldroyd et Downie 2008). En effet, les facteurs Nod sont capables d'induire des oscillations calciques en périphérie du noyau (Ehrhardt *et al.* 1996 ; Walker *et al.* 2000 ; Sun *et al.* 2007) ou dans le noyau (Sieberer *et al.* 2009). Parmi les nombreux gènes activés par ces oscillations calciques, *DMII* code un canal potassique putatif, localisé à la périphérie nucléaire (Ané *et al.* 2004 ; Riely *et al.* 2007) et capable de réguler le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$ , *via* la régulation du potentiel membranaire (Peiter *et al.* 2007 ; Matzke *et al.* 2009). Le mécanisme par lequel le signal calcique nucléaire est mis en place n'est pas encore parfaitement connu. Les nucléoporines, protéines faisant partie du complexe du pore nucléaire (Kanamori *et al.* 2006 ; Saito *et al.* 2007) pourraient être impliquées dans le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le noyau. Il a toutefois été montré dans des cultures cellulaires de tabac que le noyau était parfaitement autonome en terme de signalisation calcique en réponse notamment à des stress mécaniques et thermiques (Pauly *et al.* 2000 ; Xiong *et al.* 2004 ; Mazars *et al.* 2009). L'enveloppe nucléaire constitue en tout état de cause une indiscutable réserve d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  alors que la membrane nucléaire interne posséderait des canaux voltage-dépendants, des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases et peut-être bien une « ER-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase » (ECA ; Downie *et al.* 1998 ; Grygorczyk et Grygorczyk 1998 ; Bunney *et al.* 2000). La mitochondrie est capable d'accumuler de très grandes concentrations d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Putney et Thomas 2006). L'étude des mécanismes régulant l'homéostasie calcique de ce compartiment est intensive chez les animaux, notamment parce que la concentration de calcium mitochondriale ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ ) régule la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  dans des processus régulant la mort cellulaire apoptotique (Giacomello *et al.* 2007). Chez les plantes, en revanche, on ne connaît pas grand chose, bien que des variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  aient été déjà observées (Logan et Knight 2003). La voie principale permettant la variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  passe par un uniport mitochondrial (Kirichok *et al.* 2004). A l'inverse, le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la mitochondrie fonctionne *via* des «  $\text{Ca}^{2+}$ -eXchangers » (CAXs ; Putney et Thomas 2006) mais l'identité moléculaire de ces canaux reste inconnue à ce jour.

Des oscillations calciques circadiennes sont également générées dans le chloroplaste, l'intensité des oscillations étant dépendante de la durée de la période lumineuse précédant l'obscurité (Johnson *et al.* 1995 ; Sai et Johnson 2002). Une hypothèse suggère que ces oscillations calciques serviraient de relais pour l'inhibition des processus photosynthétiques à l'obscurité (Sai et Johnson 2002). AtACA1, une « CaM-regulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase » potentielle serait localisée dans l'enveloppe interne du chloroplaste (Huang *et al.* 1993 ; Johnson *et al.* 2006) bien qu'une étude protéomique l'ait aussi localisée dans le RE (Dunkley *et al.* 2006). Par ailleurs, le chloroplaste constitue une ressource alternative d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour la signalisation calcique cytosolique. En effet, des cellules de garde d'*Arabidopsis* qui sur-expriment PPF1, une protéine chloroplastique du pois considérée comme un transporteur calcique putatif, subissent une baisse des variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  alors que le chloroplaste séquestre plus d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2004). Une autre protéine capable de



lier le  $\text{Ca}^{2+}$ , CAS, semble également être essentielle pour la régulation de la fermeture du stomate. La mutation de cette protéine inhibe la fermeture du stomate en réponse à une variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  mais pas en réponse à l'ABA ; et cette observation coïncide avec la perte des oscillations calciques cytosoliques générées par la variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  (Han *et al.* 2003). Bien qu'initialement prédite comme étant membranaire (Han *et al.* 2003), il est à présent établi que cette protéine est spécifiquement présente dans la membrane thylakoïdienne (Nomura *et al.* 2008 ; Vainonen *et al.* 2008 ; Weinl *et al.* 2008). CAS pourrait donc être un régulateur de la variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  induite par la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  *via* le contrôle des pools calciques chloroplastiques, bien que les mécanismes sous-tendant cette hypothèse soient inconnus.

#### I.1.2.2.3 Amplification de la réponse : le priming

Des expériences d'imagerie calcique ont permis de montrer dans des cellules de garde d'*Arabidopsis* que des oscillations calciques spontanées et répétitives se produisaient même en conditions non stimulées, y compris dans des plantes entières intactes (Yang *et al.* 2008). Dans ces conditions, comment la fermeture des stomates médiée par le  $\text{CO}_2$  et l'ABA peut-elle être  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante si des oscillations interviennent spontanément ? Une nouvelle hypothèse a émergé récemment. Elle suggère que les signaux physiologiques de fermeture des stomates tels que le  $\text{CO}_2$  et l'ABA sont capables de sensibiliser les cellules de garde, qui seraient ainsi plus réceptives aux signaux calciques déclenchés (Young *et al.* 2006 ; Kim *et al.* 2010). Cette hypothèse a récemment été démontrée pour l'ABA (Siegel *et al.* 2009). En effet, dans un environnement calcique extérieur faible, des canaux anioniques de type S présents dans des cellules de garde ne sont pas réactifs à une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  à  $2\mu\text{M}$ . En revanche, la présence d'ABA dans ce milieu extérieur suffit à activer les canaux anioniques en réponse à une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  d'un même ordre de grandeur (Siegel *et al.* 2009). En conséquence, l'ABA amplifie la capacité de la cellule de garde à répondre à des variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  et à activer des canaux anioniques. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  serait elle-même capable d'augmenter la capacité de la cellule à mettre en place une signalisation calcique intracellulaire (Allen *et al.* 2001 et 2002). Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'expliquer comment la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ , le  $\text{CO}_2$  et l'ABA peuvent induire une sensibilité accrue au  $\text{Ca}^{2+}$ . Par exemple, les courants anioniques mesurés dans des cellules de garde préincubées avec de l'ABA suggèrent que les cellules ont pu anticiper et synthétiser les protéines capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  ou de faciliter sa perception par la cellule. La relocalisation de protéines est une autre hypothèse : un premier évènement de signalisation calcique serait alors requis pour la relocalisation intracellulaire d'une calciprotéine nécessaire à la suite de la cascade de transduction du signal (Cheong *et al.* 2007 ; Kim *et al.* 2010).





#### I.1.2.2.4 Action concertée du $\text{Ca}^{2+}$ avec les autres seconds messagers

Le  $\text{Ca}^{2+}$  a certes émergé comme un second messenger ubiquitaire, élément de signalisation incontournable de toute réponse adaptative apportée par la plante à un changement de son environnement. Toutefois, le signal calcique n'est qu'une composante parmi d'autres de la cascade d'évènements déclenchée par la perception d'un stimulus. Ainsi, de nombreux autres seconds messagers peuvent être impliqués de manière spécifique, de façon  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante ou non, et participer ainsi à l'encodage de la spécificité de réponse. Ainsi, la cryptogéine, un éliciteur fongique synthétisé par *Phytophthora cryptogea*, induit toute une cascade de signalisation comprenant, outre le  $\text{Ca}^{2+}$ , la synthèse de ROS, le NO, le glutamate, et donc toute une gamme de seconds messagers nécessaires pour l'activation d'une partie au moins des réponses (voir chapitre I.2.5).

Dans un autre exemple, il a pu être montré récemment que la D-érythro-sphinganine, un des sphingolipides les plus abondants chez les plantes, induisait la production  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de ROS dans des cultures cellulaires de tabac. Plus intéressant, il a également été démontré que cette production de ROS était impliquée dans les réponses de défense de la plante ne conduisant pas à une « Programmed Cell Death » (PCD ; Lachaud *et al.* 2010b). Ces résultats soulignent parfaitement l'intrication entre les signaux codés par les différents seconds messagers et le rôle ainsi joué dans le codage de la spécificité de réponse.

#### I.1.2.2.5 Le $\text{Ca}^{2+}$ « toolkit »

La génération du signal calcique, sa dissipation et son décryptage sont des évènements liés à la présence dans la cellule et à un instant donné des effecteurs appropriés pour la réponse au stimulus perçu (Sanders *et al.* 2002). L'ensemble de ces effecteurs impliqués dans la signalisation calcique constitue la boîte à outils calcium appelée aussi « Calcium Toolkit ». Cet ensemble comprend notamment les canaux et pompes calciques nécessaires à la génération et à l'arrêt des signaux calciques ainsi que l'ensemble des calciprotéines capables de décoder et de transmettre ces signaux.

### I.1.3 Génération du message calcique

La génération d'un message calcique dans le cytosol de la cellule résulte de la combinatoire entre trois types d'évènements. Les influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol sont contrebalancés par les mécanismes actifs d'efflux depuis le cytosol ainsi que par la présence de protéines affines pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , capables de tamponner la présence de ces ions dans ce compartiment cellulaire. L'équilibre dynamique entre ces trois évènements permet en situation normale de maintenir l'homéostasie calcique de la cellule de sorte que la simple perturbation de cet équilibre suffise à générer un signal transitoire. Une fois décodé, ce signal se dissipe pour permettre un retour à la normale dans la cellule. La génération de ce message

Membrane where Ca <sup>2+</sup> flux occurs	Direction of Ca <sup>2+</sup> flux	Transporter type	Main physiological regulators <sup>a</sup>
Plasma membrane	Into the cytosol	CNGC	cAMP, cGMP, CaM
		DACC	Voltage
		GLR	Amino acids
		HACC	Voltage, ROS, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , ABA
		MCC	Mechanosensitive
Tonoplast	Out of the cell	ACA	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , CaM
	Into the cytosol	ECA? <sup>b</sup>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> ?
		InsP <sub>3</sub> R-like	InsP <sub>3</sub>
		RyR-like	cADPR
		SV channel (ATPC1)	Voltage, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , pH, CaM
Endoplasmic reticulum (ER)	Into the vacuole	VVCa channel	Voltage, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>vac</sub>
		ACA	CaM
	Into the cytosol	CAX	ΔpH, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>
		InsP <sub>3</sub> R-like	InsP <sub>3</sub>
		NAADPR-like	NAADP
Mitochondria (inner membrane)	Into the ER lumen	NSCC	Voltage
		RyR-like	cADPR
	Into the cytosol	ACA	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , CaM
		ECA	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> ?
		Ca <sup>2+</sup> exchanger?	ΔpH?, Ca <sup>2+</sup> ?
Chloroplast (inner envelope)	Into the matrix	Ca <sup>2+</sup> uniporter?	Ca <sup>2+</sup> ?, voltage?
	Into the cytosol	ACA?	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> , CaM
Golgi	Into the stroma	Ca <sup>2+</sup> uniporter	ΔpH, voltage
	Into the cytosol	unknown	
Nuclear envelope	Into the Golgi	ECA	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> ?
	Into the envelope	ECA?	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> ?
	Into the nucleus	NSCC	Voltage

ABA, abscisic acid; ACA, autoinhibited Ca<sup>2+</sup>-ATPase activated by calmodulin (CaM); [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>, cytosolic Ca<sup>2+</sup>; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>vac</sub>, vacuolar lumen Ca<sup>2+</sup>; CAX, H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger; CNGC, cyclic nucleotide-gated channel; DACC, depolarization-activated Ca<sup>2+</sup> channel; ΔpH, pH gradient; ECA, ER-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase; GLR, glutamate receptor-like channel; HACC, hyperpolarization-activated Ca<sup>2+</sup> channel; InsP<sub>3</sub>R-like, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like channel; MCC, mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> channel; NAADPR, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptor-like channel; NSCC, nonselective cation channel; ROS, reactive oxygen species; RyR-like, cyclic ADP-ribose (cADPR)-activated ryanodine receptor-like channel; SV channel, slow-activating vacuolar Ca<sup>2+</sup> channel; VVCa channel, vacuolar voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel.

Tableau I-2 : Canaux et transporteurs de Ca<sup>2+</sup> responsables des flux calciques dans une cellule de plante. (McAinsh et Pittman 2009).

est prise en charge par une batterie de protéines localisées à la membrane plasmique et sur les endomembranes (tableau I-2).

### I.1.3.1 Influx d'ion $\text{Ca}^{2+}$ via l'activation de canaux calciques

Différents types de canaux ioniques susceptibles de réguler des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  coexistent au sein de la membrane plasmique et sur les autres membranes cellulaires. Ces canaux peuvent être classés dans trois catégories différentes selon leur mécanisme d'activation : les canaux voltage-dépendants, les canaux ligand-dépendants et les canaux mécano-senseurs (Kudla *et al.* 2010). Typiquement chez les plantes, les canaux permettant l'influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  présentent une sélectivité faible et sont perméables à d'autres cations (Very et Davies 2000).

#### I.1.3.1.1 Canaux voltage-dépendants

La répartition des ions de part et d'autre de la membrane plasmique génère un potentiel de membrane négatif compris entre -120 et -200mV dans les cellules de plantes supérieures (Bates et Goldsmith 1983). Deux cas de figure peuvent alors se présenter lorsque les cellules sont soumises à des stress biotiques ou abiotiques : le potentiel de membrane peut chuter encore (hyperpolarisation) ou, au contraire, retrouver une valeur moins négative (dépolarisation). Dans la plante, les canaux voltage-dépendants de la membrane plasmique sont donc activés par dépolarisation (« Depolarization-Activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Channels » ou DACCs) ou par hyperpolarisation (HACCs ; White *et al.* 2002). Ce type de canaux a été particulièrement bien étudié par des approches d'électrophysiologie ; en revanche leur identité moléculaire reste encore méconnue (White *et al.* 2002). Des canaux de type DACCs ont été caractérisés chez le maïs (Marshall *et al.* 1994), *Arabidopsis* (Thion *et al.* 1998) et dans des cultures cellulaires de carotte (Thuleau *et al.* 1994). Les HACCs ont aussi été étudiés dans de nombreux modèles et types cellulaires comme le fucus (Coelho *et al.* 2002), les poils racinaires (Foreman *et al.* 2003) ou la cellule de garde (Demidchik *et al.* 2002) d'*Arabidopsis*. De manière remarquable, il semble que les DACCs contribuent à un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  très transitoire en réponse au froid ou à un stress biotique (Thion *et al.* 1998) alors que les HACCs sont responsables d'un influx plus prolongé de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à la lumière bleue (Harada et Shimazaki 2009) et à l'ABA notamment (Hamilton *et al.* 2000, Pei *et al.* 2000), suggérant la possibilité d'une régulation fine de l'influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol.

Une étude récente a montré qu'une annexine cytosolique était capable de générer un influx calcique cytosolique dans des conditions de pH acide (Laohavisit *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été montré que les annexines pouvaient avoir une activité peroxidase *in vitro* (Laohavisit *et al.* 2009). Ce résultat suggère que les annexines sont des canaux calciques potentiels, capables de prendre part à une voie de génération de signal calcique répondant aux ROS (Laohavisit *et al.* 2010).

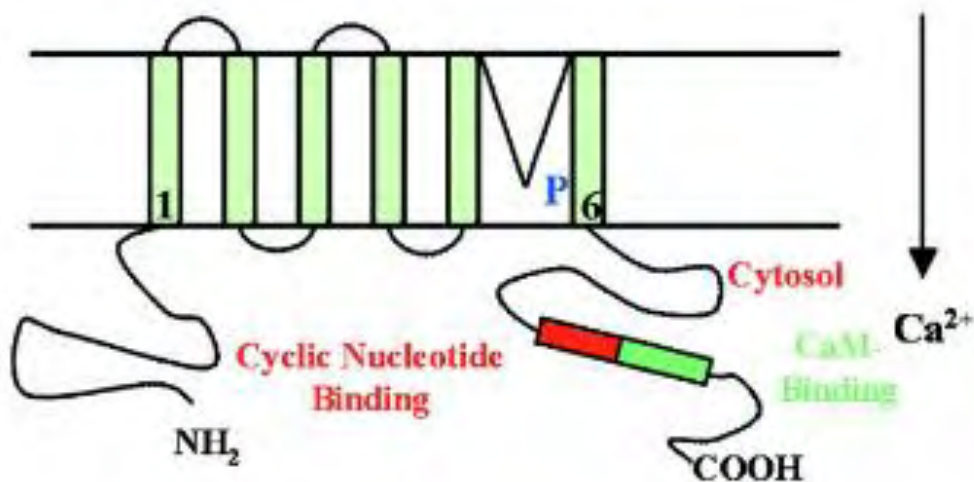


Figure I-6 : **Structure d'un CNGC.** (Sanders *et al.* 2002).

La structure d'un CNGC contient aussi une boucle P alors que les domaines C-ter de liaison au nucléotide cyclique et à la CaM se recoupent partiellement.

L'existence de canaux voltage-dépendants ou ligand-dépendants n'est pas restreinte à la membrane plasmique. En effet, un grand nombre d'études montre que les deux types de canaux sont présents également sur la membrane de la vacuole (Kudla *et al.* 2010).

Un canal voltage-dépendant situé sur la membrane de la vacuole a été identifié en 1992 comme étant capable de réguler un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la vacuole (Johannes *et al.* 1992 ; Allen et Sanders 1994). L'activité de ce canal a par la suite été caractérisée ; elle est conférée par une protéine nommée « Two-Pore Channel 1 » (TPC1) qui représente une classe de canaux calciques vacuolaires  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants (Peiter *et al.* 2005). En effet, ce canal semble être régulé de manière très fine par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Une élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique induit l'activité de ce canal alors qu'une augmentation vacuolaire de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne l'inactivation du canal (Pottosin et Schonknecht 2007). TPC1 ne semble pas jouer un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie calcique en réponse à divers stress abiotiques ou biotiques puisqu'un mutant perte-de-fonction *tpc1* reste capable de générer des signaux calciques cytosoliques en réponse à l'ABA ou au peptide issu de la flagelline, flg22 (Ranf *et al.* 2008 ; Perez *et al.* 2008). En plus de ses fonctions dans la réponse à l'ABA et la régulation de l'ouverture des stomates (Peiter *et al.* 2005), TPC1 semble avoir un rôle dans les réponses aux pathogènes chez le riz (Kurusu *et al.* 2005) et le tabac (Kadota *et al.* 2004). *NtTPC1*, qui code un canal membranaire, est notamment essentiel pour les réponses de défense induites par la cryptogéine dans des cellules de tabac BY-2. De plus, il a récemment été montré chez les animaux que des canaux de type TPC de structure proche d'*AtTPC1* existaient aussi et étaient régulés par le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP), lesquels induisaient des efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis des compartiments de type lysosomes et endosomes (Calcraft *et al.* 2009). Il serait particulièrement intéressant de démontrer ou infirmer l'existence d'un tel mécanisme chez les plantes.

#### I.1.3.1.2 Canaux ligand-dépendants

Les « Cyclic Nucleotide-Gated Channels » (CNGCs) sont des canaux ligand-dépendants essentiels pour l'homéostasie cationique de la cellule (Hua *et al.* 2003) et sont capables de générer des influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme (Leng *et al.* 1999 ; figure I-6). Les CNGCs sont activés par la liaison avec des nucléotides cycliques tels que l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC) ou la Guanosine MonoPhosphate cyclique (GMPc) et portent un site de liaison à la CalModuline (CaM) recouvrant partiellement le site de liaison au nucléotide cyclique (figure I-6). En conséquence, la liaison d'une calmoduline à un CNGC bloque l'activité de ce dernier par blocage du site de liaison au nucléotide cyclique (Ali *et al.* 2006). Le  $\text{Ca}^{2+}$ , par liaison avec une CaM ou une CalModuline-Like (CML) est donc théoriquement capable de réguler l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  généré par des CNGCs. Bien que pouvant moduler un grand nombre de processus cellulaires tels que l'homéostasie ionique ou la régulation de la croissance du tube pollinique (Kudla *et al.* 2010), beaucoup de CNGCs ont été caractérisés en relation avec des contextes d'interactions plantes-pathogènes, notamment



AtCNGC4, AtCNGC11 et AtCNGC12 (Balague *et al.* 2003 ; Yoshioka *et al.* 2006 ; Urquhart *et al.* 2007). En particulier, ces CNGCs ont un rôle très important dans la signalisation cellulaire conduisant à l'établissement d'une réponse de type Hypersensitivité Réponse (HR). En outre, il a été montré qu'AtCNGC2 était essentiel pour la production d'Oxyde Nitrique (NO), un second messenger important pour la réponse de HR (Ali *et al.* 2007), cette production de NO étant elle-même dépendante d'un influx de  $Ca^{2+}$  (Lamotte *et al.* 2004).

De manière similaire aux CNGCs, les récepteurs au glutamate (GLRs) sont des canaux ioniques non sélectifs capables de réguler l'influx de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol de la cellule. Lam *et al.* ont été les premiers en 1998 à remarquer la présence chez *Arabidopsis* d'une famille de gènes codant pour des GLRs homologues aux iGLRs (pour ionotropic Glutamate Receptors) animaux (Lam *et al.* 1998). Les GLRs sont capables d'initier une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Qi *et al.* 2006) importante pour la nutrition de la plante (Demidchik et Maathuis 2007) mais également primordiale dans les réponses à l'ABA (Kang *et al.* 2004), à la lumière (Brenner *et al.* 2000), aux stress abiotiques (Meyerhoff *et al.* 2005) ou encore en réponse à une infection fongique (Kang *et al.* 2006). Kang *et al.* ont pu montrer que la surexpression d'un iGLR de radis chez *Arabidopsis* conduisait au développement de zones de nécrose au niveau de la coiffe, à la surexpression de gènes codant pour des défensines, et induisait une réponse accrue à un champignon de type *Botrytis*, suggérant l'implication de ce récepteur glutamate dans des réponses de défense.

Plusieurs études d'électrophysiologie ont montré qu'il existait potentiellement des canaux calciques ligand-dépendants sur le tonoplaste et sur la membrane du réticulum endoplasmique (Allen *et al.* 1995 ; Muir et Sanders 1997 ; Navazio *et al.* 2001). Ces récepteurs seraient activés par des seconds messagers de type  $IP_3$  (Allen *et al.* 1995 ; Muir *et al.* 1997), cADPR (Navazio *et al.* 2001) ou NADP (Navazio *et al.* 2000). En dépit de ces évidences électrophysiologiques, les acteurs moléculaires ne sont, pour l'heure, pas identifiés. On ne trouve pas de séquence codant potentiellement des récepteurs à  $IP_3$  ou à cADPR chez les plantes supérieures. Le fait que plusieurs espèces d'algues dont *Volvox* possèdent des récepteurs  $IP_3$  localisés au niveau du RE suggère que ces protéines étaient présentes chez l'ancêtre commun et auraient été perdues plus tard au cours de l'évolution des végétaux supérieurs (Wheeler et Brownlee 2008).

#### I.1.3.1.3 Canaux mécano-sensibles

Des études d'électrophysiologie ont permis de mettre en évidence des canaux calciques mécano-sensibles chez *Vicia Faba* (Cosgrove et Hedrich 1991), *Arabidopsis* (Qi *et al.* 2004) et *Lilium longiflorum* (Dutta et Robinson 2004). Ces derniers postulent notamment que la germination du tube pollinique et son élongation sont dépendants d'influx calciques *via* des canaux mécano-senseurs. Cependant, ces récepteurs restent très méconnus. Plus récemment a été caractérisée chez *Arabidopsis* une protéine membranaire, MCA1, capable de médier un influx calcique cytosolique en réponse à une distorsion de la membrane plasmique (Nakagawa





*et al.* 2007). Son paralogue MCA2 serait impliqué dans le prélèvement de  $\text{Ca}^{2+}$ , alors que sa fonction dans la croissance de la plante semble redondante avec MCA1 (Yamanaka *et al.* 2010).

### I.1.3.2 Efflux d'ion $\text{Ca}^{2+}$ par transport actif

Second messenger ubiquitaire et nutriment important pour la plante, le  $\text{Ca}^{2+}$  demeure cependant un ion très toxique pour la cellule quand il est présent à de fortes concentrations dans le cytosol. La plante a du mettre en place des mécanismes permettant de réguler la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  et de la limiter à un niveau basal une fois l'évènement de signalisation accompli (Bothwell et Ng 2005). Par cette capacité à réduire la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  et à recharger les pools internes et externes de  $\text{Ca}^{2+}$ , les multiples transporteurs de  $\text{Ca}^{2+}$  participent de fait à la génération de signatures calciques complexes. Classiquement, il existe deux grandes familles de protéines capables de réguler l'efflux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  : les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases à haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et les échangeurs de cations à faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces deux familles multigéniques sont particulièrement conservées dans le règne eucaryote et sont donc particulièrement bien connues chez les plantes.

#### I.1.3.2.1 Transporteurs à haute affinité pour le $\text{Ca}^{2+}$ : $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases

Les transporteurs calciques de type ATPases appartiennent au sous-groupe  $\text{P}_2$  des ATPases de type P (Baxter *et al.* 2003). Dans le sous-groupe  $\text{P}_2$ , on retrouve deux types d'ATPases : les ATPases de type  $\text{P}_{2A}$  qui incluent les SERCA (pour Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum C $\text{a}^{2+}$ -ATPases) animales et les ECA (pour ER-Type C $\text{a}^{2+}$ -ATPases) végétales, et les ATPases de type  $\text{P}_{2B}$  qui regroupent les PMCA (pour CaM-regulated Plasma Membrane C $\text{a}^{2+}$ -ATPases) animales et les ACA (pour Autoinhibited C $\text{a}^{2+}$ -ATPases) végétales. Il existe 4 ECAs et 10 ACAs chez *Arabidopsis* (Sze *et al.* 2000) ce qui suggère une grande flexibilité de réponse.

Les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de type  $\text{P}_{2A}$  sont principalement localisées au niveau du RE (Liang *et al.* 1997), du Golgi (Mills *et al.* 2008) ou des endosomes (Li *et al.* 2008) impliquant de ce fait ces organelles dans la machinerie complexe contribuant à la génération et à la spécificité d'un signal calcique (Menteyne *et al.* 2006). L'importance des pompes calciques de type  $\text{P}_{2A}$  dans la signalisation a récemment été démontrée avec des mutants perte-de-fonction de *Physcomitrella patens* incapables de répondre correctement à un stress salin (Qudeimat *et al.* 2008). Alors que les lignées sauvages répondent à un stress salin par une signature calcique transitoire, les lignées mutées ne sont plus capables d'une telle réponse et sont ainsi rendues moins tolérantes à un stress salin (Qudeimat *et al.* 2008). Ces résultats montrent l'importance des systèmes d'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$ , garants de l'homéostasie de la cellule mais également acteurs de sa signalisation interne.



Les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de type  $\text{P}_{2\text{B}}$ , contrairement aux PMCA animales, sont non seulement localisées au niveau de la membrane plasmique (Bonza *et al.* 2000 ; Schiott *et al.* 2004 ; George *et al.* 2008) mais également au niveau du RE (Harper *et al.* 1998), du noyau (McAinsh et Pittman 2009), de la vacuole (Geisler *et al.* 2000 ; Lee *et al.* 2007) et de l'enveloppe plastidique (Huang *et al.* 1993). Le domaine autoinhibiteur de ce type de protéine peut être inactivé *via* la liaison d'une CaM au domaine régulateur, ce qui a pour résultat d'activer la pompe (Harper *et al.* 1998). En revanche, l'activité des ATPases de type  $\text{P}_{2\text{B}}$  peut être inhibée par la phosphorylation de la partie N-terminale du domaine régulateur par une calciprotéine de type « CaM-like Domain Protein Kinases » (CDPK ; Hwang *et al.* 2000). Chez *Arabidopsis*, ACA9 et ACA10 sont impliquées dans des étapes du développement de la plante comme la croissance du tube pollinique (Schiott *et al.* 2004) ou le développement des inflorescences (George *et al.* 2008). Plus récemment, il a été postulé que l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* des ATPases membranaires était une étape importante conduisant chez *Nicotiana benthamiana* à une réaction de type HR en réponse à *Pseudomonas syringae* (Nemchinov *et al.* 2008).

En plus des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de type II, il semblerait que les ATPases de type I, connues comme étant des transporteurs de métaux lourds, pouvaient être impliquées dans le transport de  $\text{Ca}^{2+}$ . AtHMA1, une ATPase de type I localisée sur l'enveloppe du chloroplaste, est capable de transporter le  $\text{Ca}^{2+}$  en plus des métaux lourds de type cuivre, et est inhibée, de la même façon que les pompes calciques animales, par la thapsigargine (Seigneurin-Berny *et al.* 2006 ; Moreno *et al.* 2008).

#### I.1.3.2.2 Transporteurs de basse affinité pour le $\text{Ca}^{2+}$ : échangeurs $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$

Les échangeurs d'ions sont généralement moins affines pour le  $\text{Ca}^{2+}$  que les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, toutefois ils évacuent le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol beaucoup plus rapidement. L'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  chez les plantes est pris en charge par des échangeurs  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou CAX (pour Calcium eXchangers ; Shigaki et Hirschi 2006). Ces antiports fonctionnent sur la base de trois atomes d' $\text{H}^+$  échangés pour un atome de  $\text{Ca}^{2+}$  (Blackford et al 1990). Six gènes codent des CAX chez *Arabidopsis*, 5 gènes supplémentaires codent pour des antiports  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  semblables à ceux observés chez les animaux alors que 4 antiports putatifs contenant des motifs EF-hand ont également été prédits (Shigaki *et al.* 2006). Les échangeurs CAX1 à CAX4 sont localisés sur la vacuole (Hirschi *et al.* 2000 ; Cheng *et al.* 2002 et 2003) même si une activité antiport  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  a également pu être localisée à la membrane plasmique (Luo *et al.* 2005) et sur la membrane des thylakoïdes (Ettinger *et al.* 1999). Les protéines de type CAX possèdent un domaine autoinhibiteur à leur extrémité N-terminale (Pittman *et al.* 2002). La levée d'inhibition intervient notamment lors de la formation d'hétéromères CAX1/CAX3 par exemple (Cheng *et al.* 2005 ; Zhao *et al.* 2009a). Il a de plus été démontré que la partie N-terminale des protéines CAX1 et CAX3 prenait en charge le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  alors que la



partie C-terminale de la protéine était responsable du spectre de phénotypes répondant à un stress salin, soulignant ainsi la haute plasticité de ces systèmes d'antiport (Zhao *et al.* 2009b). De plus, un certain nombre de protéines, parmi lesquelles les CXIPs (pour CAX-Interacting Proteins), sont connues pour s'associer avec des CAX afin de réguler leur activité antiport (Cheng et Hirschi 2003, Cheng *et al.* 2004). La surexpression de CAX1 chez le tabac engendre une hypersensibilité au magnésium, au sodium et au froid ; il a été postulé que cette surexpression conduisait à une sur-accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la vacuole et à une sévère réduction des possibilités de variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (Hirschi 1999). Ces plantes transgéniques accumulent une quantité importante de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce que les auteurs tentent d'expliquer par la mise en place d'un mécanisme bien connu chez les animaux et la levure et nommé CCE (pour Capacitative Calcium Entry). Ce mécanisme est géré par des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type  $I_{\text{CRAC}}$  (pour Calcium-Release Activated Calcium Current) localisés au niveau de la membrane plasmique (Locke *et al.* 2000). Bien que particulièrement impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique et du développement (Zhao *et al.* 2008), de récents travaux indiquent un rôle putatif de CAX dans les réponses de défense. Ainsi, des plants de tomate soumis à une infection par un Potyvirus mettent en place une surexpression de gènes de la famille des CXIPs, suggérant l'implication de complexes CXIP/CAX dans les mécanismes de transduction du signal biotique (Alfenas-Zerbini *et al.* 2009).

#### I.1.3.3 Pouvoir tampon à l'égard du $\text{Ca}^{2+}$ dans la cellule

Bien que leur rôle dans la signalisation calcique soit encore hypothétique chez les plantes, les protéines capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  et jouant un rôle de tampon calcique pourraient tenir une place importante dans la mise en forme du signal calcique (Hetherington et Brownlee 2004).

Chez les animaux, la calréticuline est une protéine chaperone capable de tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le lumen du RE (Michalak *et al.* 2009). Cette capacité de liaison et de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle dans l'influx calcique dans le cytosol et influence les voies transcriptionnelles  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes activées durant l'embryogénèse (Corbett et Michalak 2000). Chez les plantes, la surexpression d'une calréticuline de maïs chez le tabac augmente la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  stockée dans le RE (Persson *et al.* 2001) alors que chez *Arabidopsis*, des lignées surexprimant une calréticuline résistent mieux à une déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$ , suggérant que les calréticulines constituent un pool de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible pour l'homéostasie calcique cytosolique (Yuasa et Maeshima 2000).

Outre le réticulum endoplasmique, la mitochondrie est connue chez les animaux pour jouer un rôle dans l'homéostasie calcique cytosolique. Ainsi, la mitochondrie joue un rôle très important dans la régulation de l'extension et la propagation du signal calcique cytosolique *via* une activité tampon extrêmement finement localisée. Par exemple, il a pu être montré avec diverses sondes spécifiques que des élévations cytosoliques de  $\text{Ca}^{2+}$  très localisées en réponse à l'histamine ne pouvaient survenir que dans des zones éloignées des mitochondries (Malli *et*

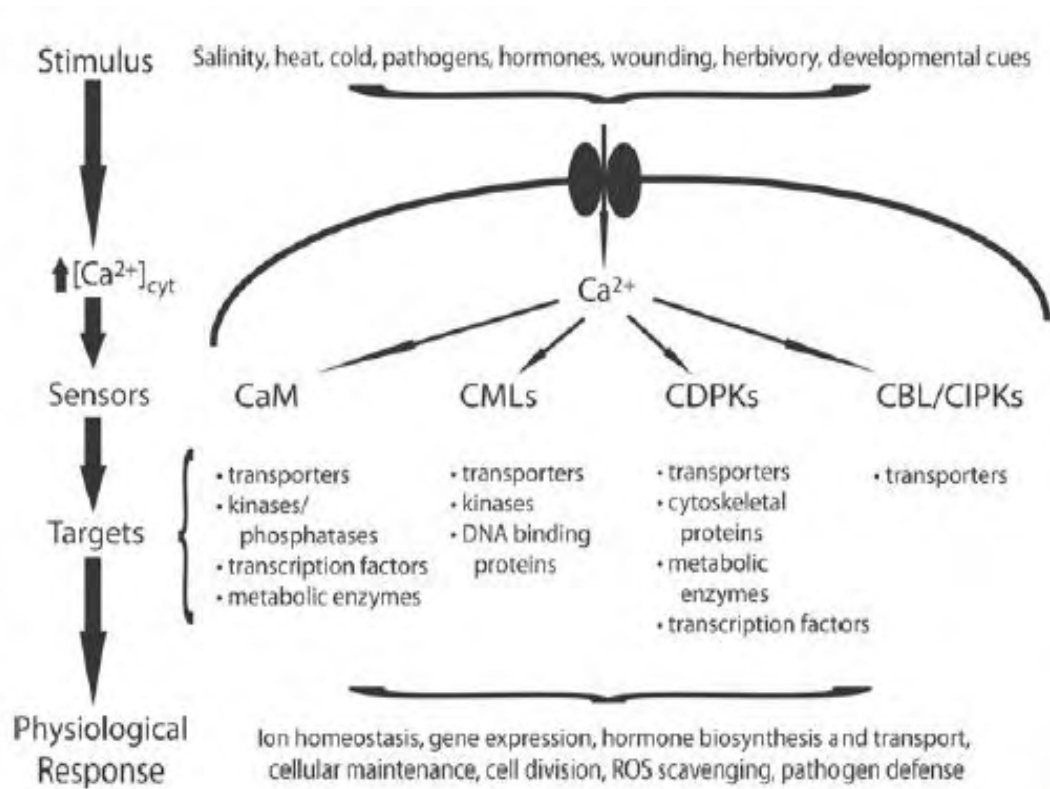


Figure I-7 : **Diversité des Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins (CBP) chez les plantes.**

CaM : Calmoduline ; CML : Calmoduline-like ; CDPK : Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase ; CBL : Calcineurin B-Like ; CIPK : CBL-Interacting Protein Kinase. (DeFalco *et al.* 2009).

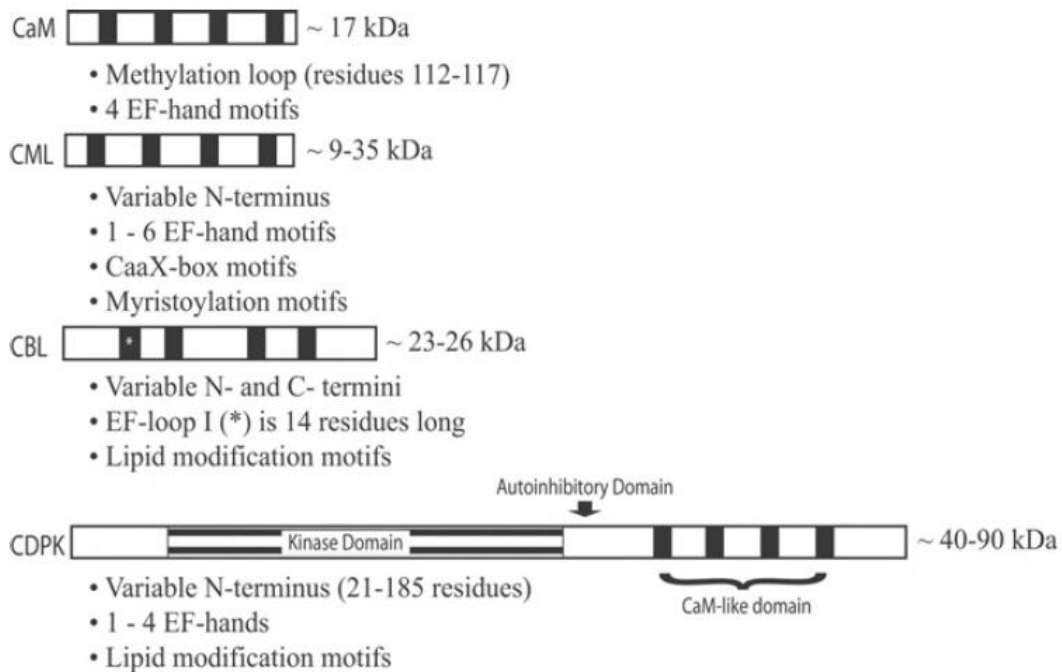


Figure I-8 : **Diversité de structures des CBP chez les plantes.** (DeFalco *et al.* 2009).

al. 2003). Un tel système encore jamais démontré chez les végétaux est parfaitement compatible avec les données obtenues par Logan et Knight (2003) sur la signalisation calcique mitochondriale.

### I.1.4 Décodage du signal

La transduction des signaux calciques en réponses moléculaires et biochimiques dépend de la présence, de la localisation cellulaire et de l'affinité de liaison de protéines senseurs capables de décoder les signatures calciques et d'induire les événements de signalisation appropriés (Reddy 2001 ; Kudla *et al.* 2010). Chez les plantes coexistent un nombre très diversifié de Ca<sup>2+</sup>-Binding Proteins (Ca<sup>2+</sup>-BP) susceptibles de jouer un rôle dans ces étapes de décodage et de transmission du signal (Luan *et al.* 2002 ; Batistic et Kudla 2004 ; McCormack *et al.* 2005 ; Kim *et al.* 2009 ; figure I-7).

Ces senseurs calciques ont été classés en deux grandes catégories (Sanders *et al.* 2002) : les senseurs-effecteurs, comme les Ca<sup>2+</sup>-Dependent Proteins Kinases (CDPKs), qui combinent un domaine de liaison au Ca<sup>2+</sup> et une activité enzymatique de réponse ; et les senseurs-relais, comme les CalModulines (CaMs), les CaMs-Like proteins (CMLs) ou les Calcineurine B-Like proteins (CBLs), qui lient le Ca<sup>2+</sup> et s'associent ensuite à des protéines cibles effectrices. La majorité de ces protéines capables de fixer le Ca<sup>2+</sup> possèdent des domaines très conservés possédant une forte affinité pour le Ca<sup>2+</sup> : les domaines 'EF-hand' (Roberts et Harmon 1992), constitués par une boucle de 12 acides aminés riches en aspartate et glutamate (figure I-8).

#### I.1.4.1 Système CaM-CML/Effecteur

Les CaMs sont parmi les protéines les plus conservées chez les eucaryotes ; elles ont été identifiées chez les plantes et les animaux il y a presque 30 ans et ont été nommées calmodulines pour CALcium MODULating proteIN (Means et Dedman 1980). Alors que les génomes animaux ne contiennent que quelques gènes codant pour des CaMs, celles-ci ou leurs isoformes très similaires, les CMLs, représentent chez les plantes une très large famille protéique. Par exemple chez *Arabidopsis*, 5 gènes codent pour des CaMs à 89% identiques à la CaM humaine (CaM 1, 4, 2, 3 et 5), et deux gènes codent pour des isoformes distinctes mais très proches de la CaM2 (CaM 6 et 7). En plus de ces CaMs canoniques, les plantes possèdent une très grande famille multigénique, les CMLs. Chez *Arabidopsis*, 50 CMLs coexistent, avec un pourcentage d'homologie avec les CaMs canoniques variant de 16 à 75% (McCormack et Bram 2003).

Structurellement, la CaM est une petite protéine acide comprenant 4 motifs 'EF-hand' capable de lier le Ca<sup>2+</sup> avec une coopérativité positive (Gifford *et al.* 2007). La liaison du Ca<sup>2+</sup> à la CaM induit des changements conformationnels, libérant des motifs hydrophobiques pour l'interaction avec des protéines cibles (Ikura et Ames 2006 ; Gifford *et al.* 2007). Les CaMs

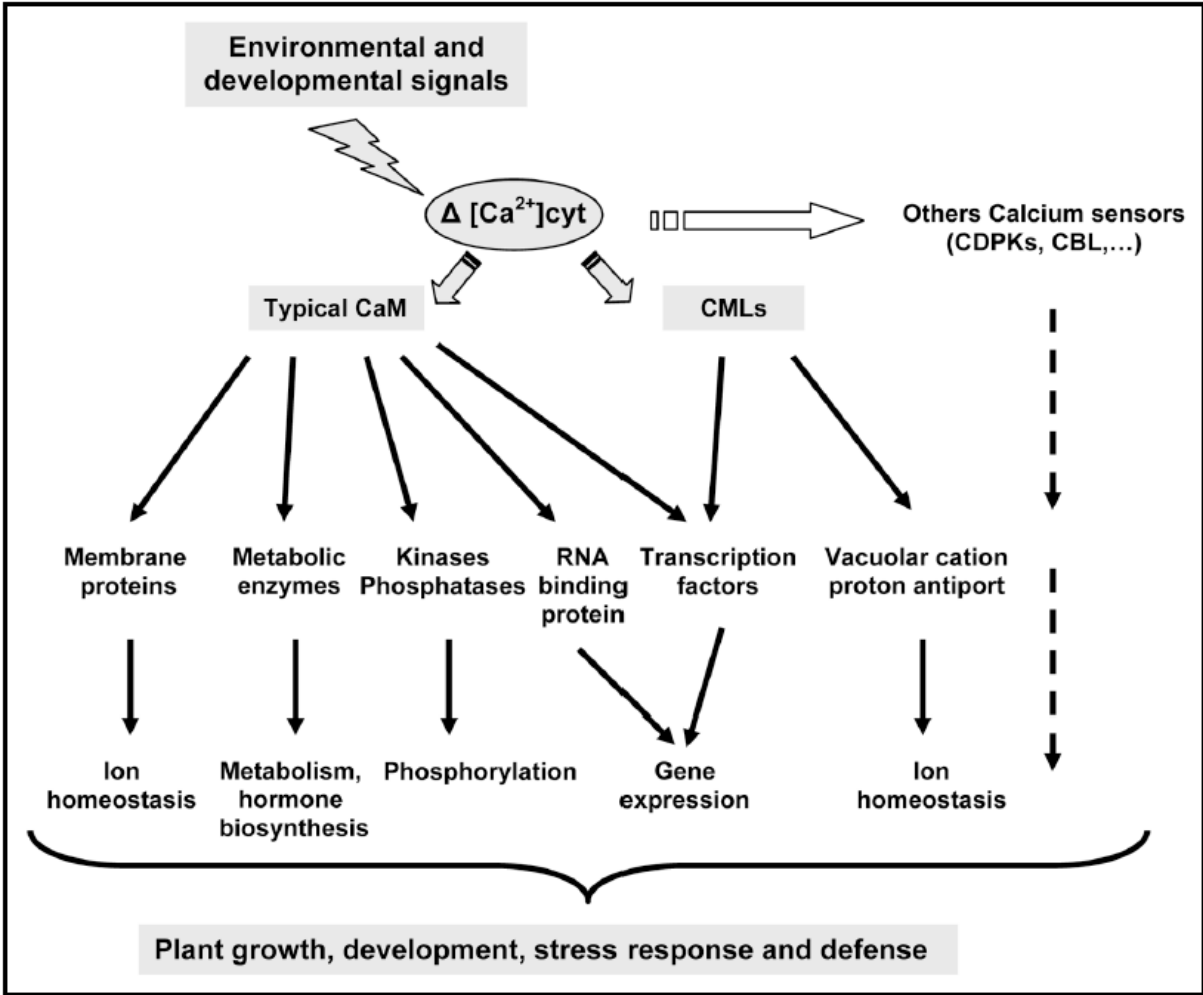


Figure I-9 : Diversité des processus cellulaires impliquant des CAMs/CMLs. (Ranty *et al.* 2006).



sont capables de se lier avec un nombre étonnant de cibles parmi lesquelles des kinases, des enzymes métaboliques, des facteurs de transcription, des canaux, des pompes ou encore des protéines de fonction inconnue. Cette capacité tient à plusieurs facteurs : (i) la flexibilité de la zone de liaison à la cible, (ii) l'état d'occupation des 'EF-hands' par un ion  $\text{Ca}^{2+}$ , la CaM étant quelquefois capable de lier sa cible sans liaison préalable au  $\text{Ca}^{2+}$ , et (iii) l'éventail de modifications post-traductionnelles potentielles qui multiplie les combinaisons avec des protéines cibles éventuelles (Ishida et Vogel 2006). De la même manière que les CaMs, les CMLs possèdent de 1 à 6 motifs 'EF-hand' bien que la plupart n'en ait que 4 de prédits (McCormack *et al.* 2005).

Des CaMs/CMLs et leurs cibles ont été identifiées dans un grand nombre de processus cellulaires incluant le développement de la plante, la réponse aux hormones, les stimuli biotiques et abiotiques (Ranty *et al.* 2006 ; Bouché *et al.* 2005 ; DeFalco *et al.* 2009 ; figure I-9).

Au cours du développement, des protéines cibles de CaMs ont pu être identifiées et impliquées dans la germination du pollen et la croissance du tube pollinique : il s'agit de NPG1 (pour No Pollen Germination 1), une protéine de fonction inconnue et d'ACA9, une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Golovkin et Reddy 2003 ; Schiott *et al.* 2004). Plus récemment, une étude chez *Picea meyeri* a permis, *via* l'utilisation d'inhibiteurs de CaMs ayant un effet drastique sur la germination du pollen, d'identifier plus de 95 protéines comme étant régulées par des CaMs, suggérant que celles-ci ont un rôle très important dans cet aspect du développement des plantes (Chen *et al.* 2009). Les CaMs sont également impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire *via* des interactions avec des kinesin-like proteins (Oppenheimer *et al.* 1997 ; Vos *et al.* 2000) ; alors que des membres de la famille des CMLs sont impliqués dans la régulation de la morphologie cellulaire (Azimzadeh *et al.* 2008) et dans la transition florale (Delk *et al.* 2005).

L'auxine est une hormone primordiale pour l'établissement de la polarité des cellules végétales et il a pu être montré que CML12 pourrait réguler l'établissement de cette polarité à travers une interaction avec PINOID, une sérine/thréonine protéine kinase capable de réguler le transport d'auxine en définissant la localisation cellulaire de protéines PIN (Benjamins *et al.* 2003). L'inhibition de l'activité des CaMs ou de l'activité des canaux calciques dans des plantes surexprimant CML12 induit de sévères phénotypes, renforçant cette hypothèse. De plus, les CaMs jouent un rôle très important dans les réponses aux brassinostéroïdes. En effet, une étape initiale des voies médiées par les brassinostéroïdes est catalysée par DWARF1, une cytochrome P450 régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et une CaM. Le mutant *dwf1* ne peut être complété par une surexpression de DWF1 que si le CaM Binding Domain (CaMBD) de DWF1 est intact (Du et Poovaiah 2005).

Les CaMs et CMLs sont également importantes dans les réponses aux stress abiotiques, ayant été caractérisées dans les réponses à la sécheresse et la salinité (Vanderbeld et Snedden 2007 ; Magnan *et al.* 2008), à la chaleur (Zhang *et al.* 2009) ou encore aux UV-C (Liang *et al.* 2006).

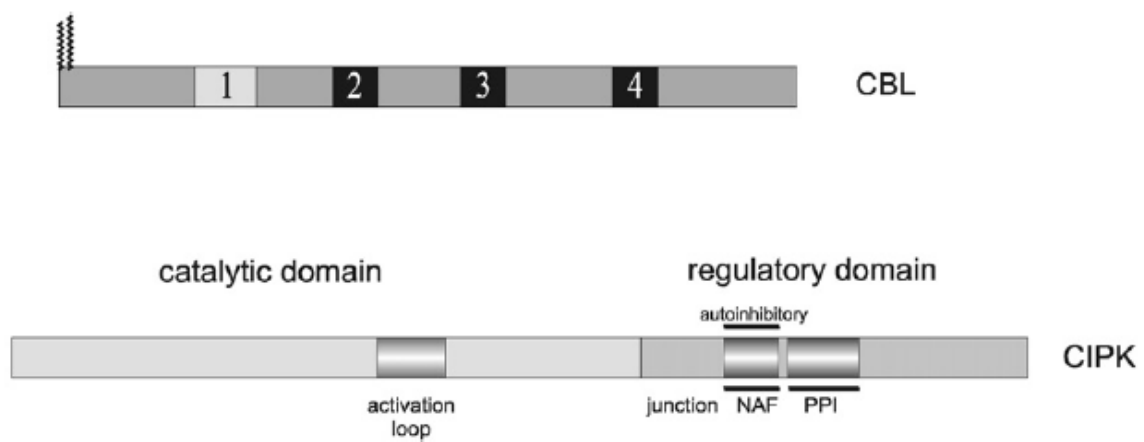


Figure I-10 : **Structure générale des CBLs et CIPKs.**

La structure des CBLs comprend notamment 4 motifs EF-hand (numérotés de 1 à 4). La structure générale des CIPKs comprend un domaine kinase en N-ter, lequel comprend la boucle d'activation. Le domaine régulateur en C-ter est partitionné en un domaine NAF responsable de la liaison CBL/CIPK et un domaine PPI. (Batistic et Kudla 2009).

Enfin, les CaMs et les CMLs ont également des rôles importants dans les réponses de défense des plantes. CML24 est par exemple primordiale pour le développement de la HR en réponse à des bactéries avirulentes (Ma *et al.* 2008). Chez le tabac, rgsCaM (pour Regulator of Gene Silencing) interagit avec le TEV (pour Tobacco Etch Virus) HCPPro (pour TEV Helper Component Protease) et l'expression de rgsCaM est induite en réponse au TEV (Anandalakshmi *et al.* 2000). La surexpression de rgsCaM conduit à une déficience en VIGS (pour Virus-Induced Gene Silencing), suggérant que rgsCaM est un suppresseur endogène de VIGS (Anandalakshmi *et al.* 2000).

#### I.1.4.2 Système CBL/CBL-interacting protein kinases

Les protéines CBLs et leurs partenaires interactants « CBL-Interacting Protein Kinases » (CIPKs) ont été identifiés en premier lieu chez *Arabidopsis* (Kudla *et al.* 1999 ; Shi *et al.* 1999). Des études plus approfondies ont permis d'établir que le génome d'*Arabidopsis* comprenait 10 gènes CBL et 26 gènes CIPK (10 et 30 chez le riz respectivement ; Kolukisaoglu *et al.* 2004 ; Weinl et Kudla 2009). Contrairement aux kinases de type CDPK, le système CBL/CIPK dissocie la fonction de senseur calcique de la fonction d'effecteur, ce qui permet une multiplicité d'associations et explique quelquefois la spécificité par rapport au signal calcique généré (Albrecht *et al.* 2001).

Les CBLs sont des protéines significativement similaires aux sous-unités régulatrices B des calcineurines animales (Weinl et Kudla 2009). Toutes les CBL possèdent 4 motifs 'EF-hand' alors que les kinases de type CIPK possèdent toutes un domaine kinase en N-ter et un domaine régulateur en C-ter (Kolukisaoglu *et al.* 2004 ; figure I-10). Le domaine NAF est un domaine conservé au sein de la partie régulatrice de la protéine, nécessaire et suffisant pour l'interaction avec des CBLs (Albrecht *et al.* 2001). Il est par ailleurs spéculé que la liaison de CBL à la CIPK *via* ce domaine provoquerait le « defolding » de la partie effectrice de la CIPK, activant la kinase (Guo *et al.* 2001 ; Gong *et al.* 2002). De plus, il a été montré récemment que la phosphorylation de la CBL par sa kinase partenaire augmentait sa capacité d'interaction (Mahajan *et al.* 2006 ; Lin *et al.* 2009). En outre, un domaine PPI (pour protein phosphatase interaction) d'interaction avec des phosphatases de type PP2C a été retrouvé dans la partie C-terminale de ces CIPKs (Ohta *et al.* 2003), suggérant la formation possible de modules CIPK/PP2C capables de phosphoryler-déphosphoryler des protéines cibles avec une très haute efficacité (Kudla *et al.* 2010).

Les microdomaines calciques sont supposés être en partie responsables de la spécificité géographique d'un signal calcique (Berridge *et al.* 2006). Les complexes CBL/CIPK sont potentiellement impliqués dans cette spécificité dans la mesure où les CBLs d'*Arabidopsis* ont pu être localisées aussi bien sur la membrane plasmique que sur la membrane vacuolaire ou encore dans le noyau (Batistic *et al.* 2010). Il a par ailleurs été montré que des modifications post-traductionnelles étaient à l'origine de changement de localisation, une myristoylation et une S-acylation étant par exemple nécessaires à la

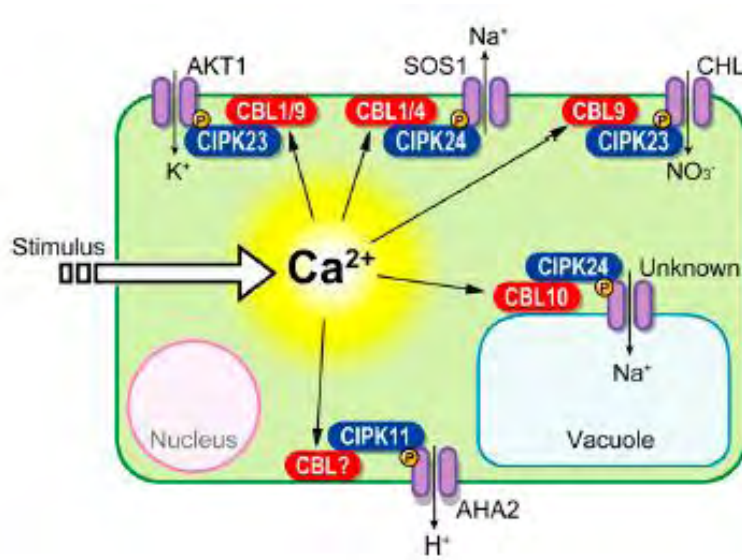


Figure I-11 : **Vue générale des systèmes de signalisation CBL/CIPK caractérisés chez *Arabidopsis*.**

AKT1 : *Arabidopsis* K<sup>+</sup> Transporter 1 ; SOS1 : Salt Overly Sensitive 1 ; CHL : un transporteur de nitrate ; AHA2 : *Arabidopsis* H<sup>+</sup> ATPase 2. (Kudla *et al.* 2010).

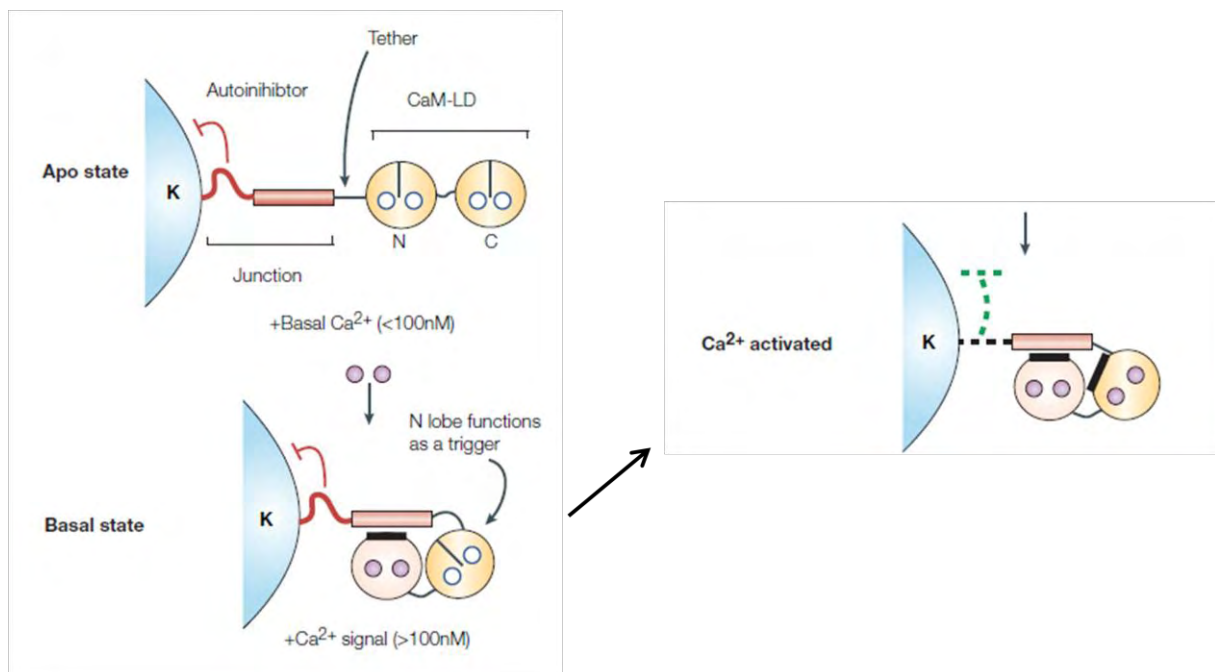


Figure I-12 : **Mécanismes de régulation des CDPKs.**

Le site de jonction contient un domaine autoinhibiteur (en rouge) et un site de liaison pour le domaine calmoduline-like (CaM-LD). Le CaM-LD est relié par une petite séquence. Les lobes N- et C-Ter contiennent chacun une paire de domaines EF-hand. En conditions basales, le domaine autoinhibiteur empêche toute activation du domaine kinase. En revanche, lorsque le CaM-LD lie 4 ions Ca<sup>2+</sup>, des changements conformationnels se produisent et mènent à la levée d'inhibition du domaine kinase. (Harper et Harmon 2005).

localisation membranaire de CBL1 (Batistic *et al.* 2008). Au contraire des CBLs, la plupart des CIPKs sont cytoplasmiques ou nucléaires (D'Angelo *et al.* 2006, Batistic *et al.* 2010) ; toutefois, leur association avec une CBL spécifique régule leur localisation finale d'action (D'Angelo *et al.* 2006 ; Cheong *et al.* 2007 ; Waadt *et al.* 2008 ; Batistic *et al.* 2008 et 2010). Par exemple, CIPK1 est localisée sur la membrane plasmique lorsqu'elle est associée avec CBL1 ou CBL9 alors qu'une association avec CBL2 l'adresse au tonoplaste (Cheong *et al.* 2007 ; Waadt *et al.* 2008 ; Batistic *et al.* 2008).

Les complexes CBL/CIPK sont essentiels pour bien des fonctions physiologiques incluant la tolérance au sodium, la nutrition minérale, l'homéostasie du potassium, ou encore les réponses à l'ABA, à la sécheresse, à la déficience en O<sub>2</sub> et au froid (pour revue Luan 2009 ; Luan *et al.* 2009 ; Batistic et Kudla 2009 ; Weinel et Kudla 2009 ; figure I-11). Jusque là, les études du network CBL/CIPK ont porté sur les réponses aux stress abiotiques et sur la nutrition de la plante ; toutefois, ce système de décodage calcique est également impliqué dans d'autres processus physiologiques tels que les interactions plantes-pathogènes. Ainsi, il a été montré très récemment chez le riz qu'OsCIPK14 et OsCIPK15 étaient essentiels pour l'activation des défenses en réponse à des « Microbe-Associated Molecular Patterns » (MAMPs ; Kurusu *et al.* 2010).

#### I.1.4.3 Système de signalisation via les CDPKs

Les CDPKs sont des kinases spécifiques des plantes (et de quelques protistes), on en compte 34 chez *Arabidopsis* sans compter 8 CRKs (pour CDPK-Related Kinases ; Hrabak *et al.* 2003 ; Harper et Harmon 2005). Les CDPKs sont des sérine/thréonine kinases qui ont également été identifiées chez le riz, le peuplier ou encore le blé (Hrabak *et al.* 2003 ; Asano *et al.* 2005 ; Ray *et al.* 2007 ; Li *et al.* 2008).

Les CDPKs sont constituées notamment d'un domaine catalytique de type Ser/Thr kinase, d'un domaine autoinhibiteur capable d'inhiber l'activité kinase et d'un domaine CLD (pour CaM-Like Domain) capable de lier le Ca<sup>2+</sup>. Il a par ailleurs été montré récemment que la variabilité de séquence du domaine N-ter des CDPKs était responsable en partie de la spécificité de reconnaissance du substrat (Ito *et al.* 2010). La plupart des CDPKs possèdent 4 sites 'EF-hand' (Cheng *et al.* 2002) ; la liaison du Ca<sup>2+</sup> sur le CLD lève l'inhibition médiée par le domaine autoinhibiteur, ce processus étant amplifié par une autophosphorylation de la kinase par elle-même (Ludwig *et al.* 2004 ; figure I-12). Par ailleurs, il a été montré que certains phospholipides et certaines protéines 14-3-3 intervenaient également dans l'activation des CDPKs (Harper *et al.* 1993 ; Camoni *et al.* 1998 ; Cheng *et al.* 2002 ; Szczegieliński *et al.* 2005). Il a été proposé que l'association des CDPKs à la membrane plasmique *via* l'interaction avec des phospholipides soit un facteur contribuant à l'activation des CDPKs alors que les protéines 14-3-3 permettraient une régulation plus fine de l'activité de la kinase (Cheng *et al.* 2002).



Les CDPKs de plantes sont présentes dans de nombreux compartiments cellulaires y compris le cytosol, le noyau, la membrane plasmique, le RE ou encore la mitochondrie (Harper *et al.* 2004 ; Klimecka et Muszynska 2007). Chez *Arabidopsis* par exemple, 9 des 34 CDPKs ont été localisées soit dans le cytosol, soit dans le noyau, soit dans la membrane plasmique (Lu et Hrabak 2002 ; Dammann *et al.* 2003). Il a également pu être montré que certaines CDPKs étaient relocalisées en réponse à un stress ; ainsi McCPK1, une CDPK membranaire de *Mesembryanthemum crystallinum* était relocalisée dans le noyau en réponse à un stress salin ou hydrique (Patharkar et Cushman 2000 et 2006).

La première caractérisation du lien entre CDPK et activation d'une voie de signalisation a mis en évidence l'importance de NtCDPK2 pour la mise en place de la HR en réponse à une élévation race-spécifique par Avr9 (Romeis *et al.* 2001). Il a pu être également montré que la voie de signalisation régulée par NtCDPK2 pouvait avoir une influence sur une voie parallèle médiée par des MAPKs, suggérant que les deux voies sont régulées de façon concertée (Ludwig *et al.* 2005). Outre les stress biotiques, les CDPKs sont impliquées dans la régulation de la fermeture du stomate par l'ABA et la  $[Ca^{2+}]_{ext}$  (Mori *et al.* 2006 ; Geiger *et al.* 2010), la réponse aux gibbérellines (Ishida *et al.* 2008) et dans la plupart des stress abiotiques (Li *et al.* 2008).

#### I.1.4.4 Autres kinases $Ca^{2+}$ -dépendantes

Les CRKs (pour CDPK-Related Kinases) ont la même structure générale que les CDPKs mais leur CLD est apparemment dégénéré. Sur les 8 CRKs d'*Arabidopsis*, 3 semblent posséder des motifs 'EF-hand' mais leur fonctionnalité n'est pas encore connue (Harmon 2003). En revanche, il a été montré qu'au moins une CRK d'*Arabidopsis* était régulée par la CaM (Wang *et al.* 2004). On ne sait rien à ce jour sur la fonctionnalité physiologique de ces CRKs chez les végétaux.

Les CCaMKs (pour  $Ca^{2+}$ /CaM regulated Kinases) ont une structure avec un domaine kinase, un CaMBD et un domaine C-ter de liaison au  $Ca^{2+}$  avec trois motifs 'EF-hand' similaires à la protéine visinine animale (Patil *et al.* 1995 ; Sathyanarayanan *et al.* 2000). La liaison du  $Ca^{2+}$  sur les 'EF-hand' entraîne une autophosphorylation capable d'amplifier la capacité de la CCaMK à lier la CaM et le  $Ca^{2+}$ , et permettant la levée de l'autoinhibition du domaine kinase (Patil *et al.* 1995 ; Sathyanarayanan *et al.* 2001 ; Gleason *et al.* 2006 ; Tirichine *et al.* 2006). Des CCaMKs ont pu être identifiées chez la plupart des légumineuses, chez le tabac et chez le riz, mais apparemment pas chez *Arabidopsis* (Liu *et al.* 1998 ; Harmon *et al.* 2001 ; Levy *et al.* 2004 ; Chen *et al.* 2007). Bien que potentiellement impliquées dans le développement floral (Poovaiah *et al.* 1999), les CCaMKs ont principalement été caractérisées chez les légumineuses dans le cadre d'interactions symbiotiques avec des bactéries rhizobia fixatrices d'azote.

Les CaMKs (pour CaM-dependent protein Kinases) sont une classe de kinases primordiales chez les animaux. Chez les plantes, bien que des CaMKs typiques n'aient pu être

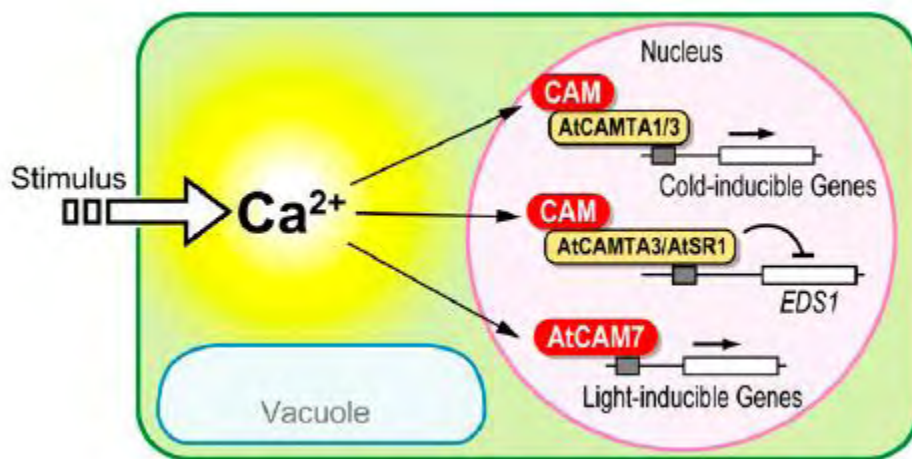


Figure I-13 : **Conversion de signaux calciques en réponses transcriptionnelles.**  
*EDS1* : Enhanced Disease Susceptibility 1. (Kudla *et al.* 2010).



identifiées à ce jour (Luan *et al.* 2002), plusieurs protéines ayant des homologies avec les CaMKs animales ont pu être identifiées chez la pomme, le riz, le maïs ou le tabac (Watillon *et al.* 1993 ; Wang *et al.* 2001 ; Zhang et Lu 2003 ; Ma *et al.* 2004) mais pas chez *Arabidopsis*. Les CaMKs végétales ne possèdent pas de sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de type 'EF-hand' et diffèrent en cela des CCaMKs (Harmon *et al.* 2001), et sont régulées de façon différentielle par des CaMs chez le tabac (Ma *et al.* 2004). Le rôle des CaMKs dans la physiologie de la plante reste très méconnu à ce jour.

### I.1.5 $\text{Ca}^{2+}$ et activité transcriptionnelle

La régulation de la transcription de gènes codant des protéines clés de réponse à un stimulus est couplée à des événements de signalisation médiés par des seconds messagers tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  et dépend de protéines capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  (Ikura *et al.* 2002). La plupart des mécanismes découverts à ce jour mettent en lumière un lien indirect entre  $\text{Ca}^{2+}$  et transcription, à travers l'intervention de protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$  et *via* des voies de signalisation souvent très complexes. Ainsi, et ce malgré l'importance de la spécificité du signal calcique dans l'élaboration d'une réponse transcriptionnelle appropriée, les mécanismes moléculaires liant le  $\text{Ca}^{2+}$  à la transcription des gènes sont longtemps restés inconnus (Scrase-Field et Knight 2003). Toutefois, il a pu être montré chez *Arabidopsis* que des variations calciques artificielles provoquées par des inhibiteurs de CaM étaient capables d'augmenter le niveau d'expression de plusieurs centaines de gènes (Kaplan *et al.* 2006). Cette étude a permis d'identifier dans les promoteurs de ces gènes induits un élément cis-régulateur de type ABRE (pour « ABscissic acid-Responsive Element ») précédemment caractérisé dans des situations de stress abiotiques (Finkler *et al.* 2007a), capable de jouer un rôle dans l'activation rapide de gènes suite à un signal calcique.

Il a récemment été mis en évidence qu'une CaM était capable d'exercer son rôle régulateur *via* une interaction directe avec le promoteur de gènes cibles, et non *via* une interaction avec des protéines effectrices (Kushwaha *et al.* 2008). CaM7 interagit directement avec les promoteurs de gènes induits par la lumière, suggérant un lien direct entre la génération d'un signal calcique, son décodage par une calciprotéine et la traduction en réponse transcriptionnelle (figure I-13).

Les CAMTAs (pour « CAIModulin binding Transcriptionnal Activators ») sont des facteurs de transcription capables de lier la CaM et donc capables de jouer un rôle de lien direct entre  $\text{Ca}^{2+}$  et transcription (figure I-13). Ils forment des familles multigéniques dans beaucoup d'organismes eucaryotes, y compris l'homme, le poulet, la drosophile, *Physcomitrella patens*, *Arabidopsis* ou le riz (Finkler *et al.* 2007b). Leur structure est extrêmement bien conservée et comporte notamment un signal de localisation nucléaire, un domaine unique CG-1 de liaison à l'ADN (*via* des sites de liaison tel le motif ABRE) et un certain nombre de motifs IQ connus pour leur capacité d'association à des CaMs ou des CMLs (Bouché *et al.* 2002).



Les CAMTAs fonctionnent comme activateurs transcriptionnels directs ou comme coactivateurs. En effet, certains CAMTAs disposent d'un domaine d'activation de la transcription capable de réguler l'expression de gènes cibles chez le riz et chez *Arabidopsis* (Mitsuda *et al.* 2003 ; Choi *et al.* 2005). Mais les CAMTAs peuvent également intervenir dans des complexes transcriptionnels plus importants soit en association avec des coactivateurs ou des corépresseurs, soit en formant des homo- et hétérodimères (Gong *et al.* 2007).

Les CAMTAs jouent un rôle dans les réponses aux stress abiotiques et biotiques. AtCAMTA1 et AtCAMTA3 sont importants pour la régulation de la tolérance au froid chez les plantes ; ces 2 CAMTAs interagissent avec des éléments du promoteur des gènes *DREB1c* et *CBF2*, connus pour être des régulateurs de la tolérance au gel, et activent la transcription de *CBF2* notamment (Doherty *et al.* 2009 ; Eckardt 2009). AtCAMTA3 est également un régulateur critique des réponses aux pathogènes *P. syringae* et *Botrytis cinerea* (Galon *et al.* 2008). Il a pu être montré qu'AtCAMTA3 interagit avec le promoteur du gène *EDS1*, un régulateur des niveaux de SA, et réprime l'expression du gène (Du *et al.* 2009). En outre, il a été démontré que la liaison à la CaM était requise pour cette fonction régulatrice (Du *et al.* 2009). Il peut être noté qu'AtCAMTA3 est capable de jouer un rôle dans des voies de réponse très différentes en induisant ou au contraire en réprimant l'expression de gènes cibles.



## I.2 REACTIONS DE DEFENSE CHEZ LES PLANTES

Les végétaux sont confrontés tout au long de leur vie à de multiples agressions : insectes, herbivores, mais aussi virus, bactéries, champignons, oomycètes... Comparé à cette multitude d'agresseurs potentiels, les maladies des plantes font figure d'exception. Cette exceptionnelle résistance est tout d'abord basée sur la préexistence de barrières physiques et chimiques capables de repousser ou de limiter l'attaque pathogène. Lorsque les organismes pathogènes ne sont pas capables de franchir ces barrières préformées, ils ne peuvent utiliser la plante comme hôte de leur cycle de vie.

En revanche, lorsque le pathogène réussit à franchir ces barrières, les plantes disposent de mécanismes de reconnaissance capables de stimuler leur « système immunitaire » et d'induire des réponses de défense spécifiques. Il est aujourd'hui admis que ce système immunitaire se base sur des mécanismes de reconnaissance pouvant se dérouler à deux niveaux et déboucher soit sur une interaction dite incompatible (Chisholm *et al.* 2006 ; Jones et Dangl 2006), dans le cas d'une résistance à la maladie, soit sur une interaction dite compatible, en cas d'échec des mécanismes de défense permettant un développement de la maladie.

### I.2.1 Barrières pré-existantes

#### I.2.1.1 Barrières physiques

Les barrières physiques préformées susceptibles de limiter ou d'arrêter la progression d'un pathogène sont essentiellement constituées de la cuticule et de ses cires, ainsi que de la paroi cellulaire. Elles sont l'un des nombreux obstacles que le pathogène rencontre dans sa route vers l'invasion et constituent *de facto* une mesure de défense pré invasive (Thordal-Christensen 2003 ; Lipka *et al.* 2005).

La cuticule des plantes est supposée fournir une barrière très efficace contre la majorité des pathogènes et empêcher ainsi la colonisation de la surface (Reina-Pinto et Yephremov 2009). Il a pu être montré que des mutants affectés dans la biosynthèse de la cuticule étaient plus sensibles à l'attaque de pathogènes (Xiao *et al.* 2004 ; Tang *et al.* 2007). Ainsi, l'expression des gènes codant pour le système de sécrétion de type III des bactéries *P. syringae* est multipliée par 10 dans le mutant *att1*, qui a par la suite été identifié comme correspondant à une CYP450 indispensable à la biogénèse de la cuticule. Le mutant *att1* montre une réduction de 30% de sa surface cuticulaire et est bien plus sensible à une souche virulente de *P. syringae* (Xiao *et al.* 2004). Il est de plus connu que la variabilité de la composition de la cuticule explique une partie des réponses de défense. En effet, la composition lipidique de la cuticule est d'une importance capitale pour la formation d'appressoria par de nombreux pathogènes tels *Magnaporthe grisea* ou *C. gloeosporioides* (Podila *et al.* 1993 ; Kolattukudy *et al.* 1995).

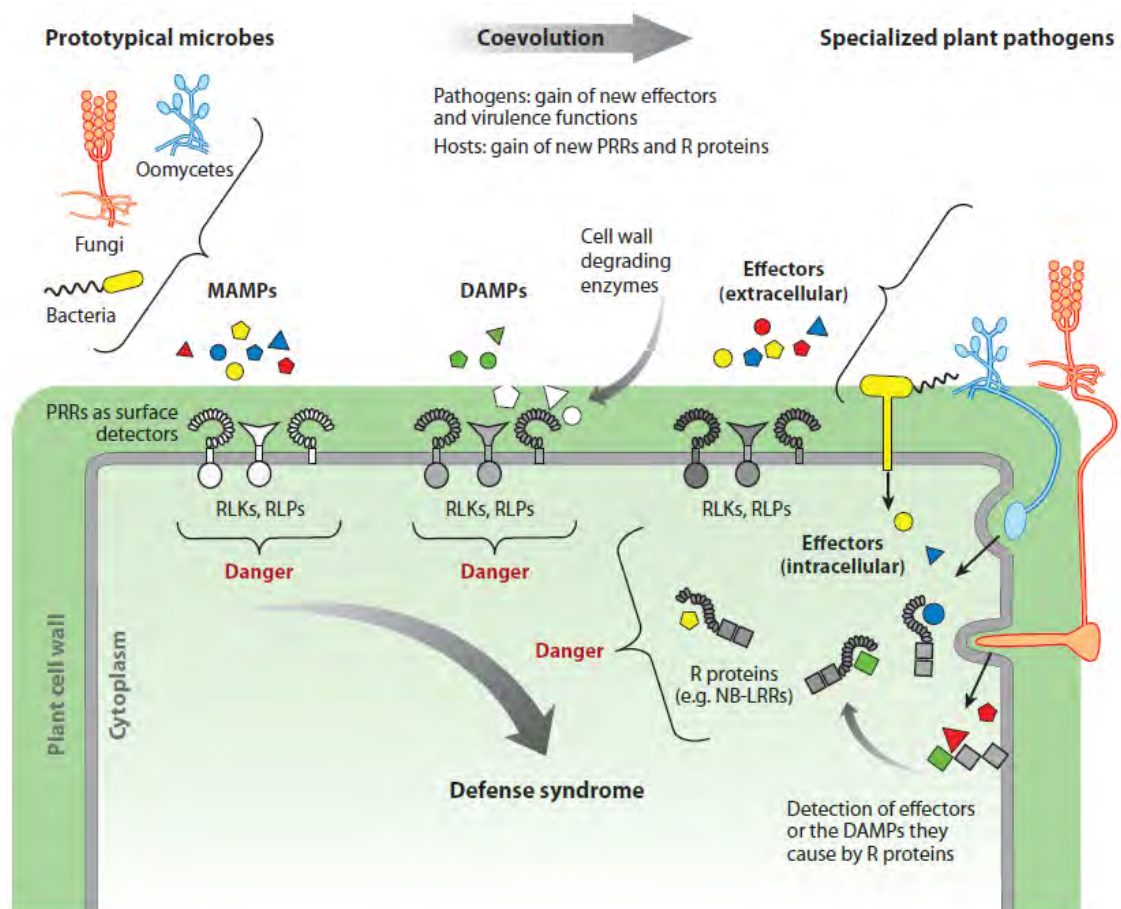


Figure I-14 : **Mécanismes de perception du danger chez les plantes.**

Les Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs), les Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), et les effecteurs sont perçus comme des signaux de danger. Les MAMPs extracellulaires de microbes typiques et les DAMPs issus de l'action de leurs enzymes sont reconnus via des Pattern Recognition Receptors (PRRs). Au cours de leur coévolution, les pathogènes ont développé des effecteurs comme facteurs de virulence et les plantes ont mis en place de nouveaux PRRs et de nouvelles protéines de Résistance (R). Quand les MAMPs, les DAMPs et les effecteurs sont reconnus par des PRRs et des protéines R, une réponse de défense typique est induite. RLK, Receptor-Like Kinase; RLP, Receptor-Like Protein; NB-LRR, Nucleotide Binding-site-Leucine-Rich Repeat. (Boller et Felix 2009).

La paroi cellulaire des plantes constitue également à la fois une barrière physique pré-établie et un lieu de rencontre entre hôte et pathogène. Bien qu'il soit difficile de discriminer entre son rôle de barrière pré établie et son rôle primordial dans la perception du pathogène, il est désormais clair que la paroi cellulaire joue un rôle dans la résistance non-hôte qui suppose l'impossibilité pour un pathogène de coloniser une plante. Le rôle de la paroi cellulaire en tant que tissu senseur de la menace pathogène (*via* le contrôle de son intégrité notamment) et premier acteur de la PTI est bien mieux documenté (pour revue Hématy *et al.* 2009).

#### I.2.1.2 Barrières chimiques

Outre les barrières physiques, les plantes disposent également de barrières chimiques préformées incluant des composés antimicrobiens et des métabolites secondaires qui peuvent être toxiques pour le pathogène ou encore inactiver ses effecteurs (Heath 2000). L'avenacine A-1, une saponine (famille de métabolites secondaires glycosylés), est présente en très grande quantité dans des plants sauvages d'avoine et est supposée avoir une activité antifongique forte. Il a pu être montré que des mutants *sad* (pour saponin-deficient) n'accumulant plus d'avenacine A-1 étaient bien plus susceptibles à des attaques fongiques que les plants sauvages, suggérant que cette saponine joue un rôle de barrière chimique pré-invasive (Papadopoulou *et al.* 1999).

#### **I.2.2 Immunité végétale : « Pathogene-Associated Molecular Patterns-Triggered Immunity »**

Dans le cas où un pathogène a pu outrepasser les barrières pré invasives existantes, la plante a la capacité de mettre en place un second rideau de défense (figure I-14). La stratégie repose sur la PAMP-Triggered Immunity ou PTI (anciennement appelée résistance basale ou horizontale), qui fait intervenir des motifs généraux conservés (Microbe-Associated Molecular Patterns ou MAMPs) qui sont situés à la surface du pathogène (PAMPs pour Pathogène-Associated Molecular Patterns par exemple), ou à la surface d'élicitines sécrétées par le pathogène ou encore sont issus de l'interaction entre le pathogène et la plante (DAMPs ou Damage-Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont ensuite reconnus par des récepteurs végétaux de type PRR (pour Pattern Recognition Receptor) qui vont permettre la mise en place de la PTI.

##### I.2.2.1 Microbe-Associated Molecular Patterns

La PTI résulte de l'interaction entre un MAMP et son PRR associé (figure I-14). Les PRRs sont des protéines transmembranaires contenant un domaine extracellulaire de type LRR (pour Leucine Rich Repeat) et un domaine Ser/Thr kinase en C-ter. Les LLR-RLKs





(pour LRR-Receptor-Like Kinases) sont connus pour être des récepteurs de facteurs de pathogénicité.

Le peptide flg22 provenant de la flagelline et le facteur d'élongation EF-Tu sont les deux MAMPs les mieux caractérisés, en couple avec leurs récepteurs respectifs, FLS2 et EFR. Le motif flg22 a été identifié comme étant un peptide provenant de la protéine flagelline, essentielle pour la formation du flagelle lui-même indispensable pour la virulence de la bactérie (Felix *et al.* 1999). Par la suite, FLS2 (pour FLAGELLIN SENSING2) a été identifié comme étant une LRR-RK (Gomez-Gomez *et al.* 1999) capable effectivement de reconnaître le motif flg22 de la flagelline (Chinchilla *et al.* 2006) et dont le mutant *fls2* montrait une sensibilité plus prononcée à une infection bactérienne (Zipfel *et al.* 2004). La perception de flg22 par FLS2 induit chez *Arabidopsis* un certain nombre de réponses de défense parmi lesquelles la formation de callose ou l'accumulation de la protéine de défense PR1 (Felix *et al.* 1999).

EF-TU a été identifié dans des extraits protéiques d'*Escherichia coli* ; c'est l'une des protéines les plus conservées des bactéries (Kunze *et al.* 2004). Les motifs impliqués correspondent à la partie N-acétylée de la protéine et sont appelés elf18 et elf26 ; ils sont responsables de la PTI chez *Arabidopsis* et d'autres brassicacées mais pas chez d'autres espèces (Kunze *et al.* 2004). Le récepteur d'elf18/26 (EFR) a été caractérisé par la suite : il s'agit d'une autre LRR-RK de la famille XII (Zipfel *et al.* 2006). Bien que la perception d'EF-TU soit restreinte aux brassicacées, des orthologues très proches d'EFR ont été retrouvés chez le riz et le peuplier, suggérant qu'ils fonctionneraient comme récepteurs de MAMPs non encore identifiés (Boller et Felix 2009).

Des PRRs autres que des LRR-RK/RLK ont pu être associés à des MAMPs, notamment une LRR-RLP (pour LRR-Receptor-Like Protein) impliquée dans la perception d'une xylanase chez la tomate (Ron et Avni 2004) ou encore une LysM-RLK (CERK1 chez *Arabidopsis* et CEBiP chez le riz) impliquée dans la perception de fragments de chitine fongique (Kaku *et al.* 2006 ; Miya *et al.* 2007 ; Wan *et al.* 2008).

Les éliciteurs peptidiques d'oomycètes sont également capables d'induire une PTI *via* des MAMPs. Le premier d'entre eux à avoir été caractérisé est pep13, un épitope hautement conservé d'une transglutaminase typique du persil, et capable d'induire des réponses de défense chez la pomme de terre (Blume *et al.* 2000 ; Brunner *et al.* 2002). Bien que des sites à haute affinité pour le pep13 aient été identifiés dans des membranes du persil, le récepteur reste à ce jour inconnu (Nürnberg *et al.* 2004). La situation est identique pour une autre classe d'éliciteurs peptidiques particulièrement bien étudiée : les élicitines. Ces structures peptidiques produites par des oomycètes de type *Phytophthora* et capables de lier des stérols sont capables d'activer les défenses et de provoquer une HR chez le tabac (Osman *et al.* 2001). De même que pour pep13, des sites de haute affinité pour la cryptogéine, une élicitine majeure produite par *Phytophthora cryptogea* ont été identifiés sur la membrane du tabac, mais sans que le PRR ne puisse être identifié (Bourque *et al.* 1999).

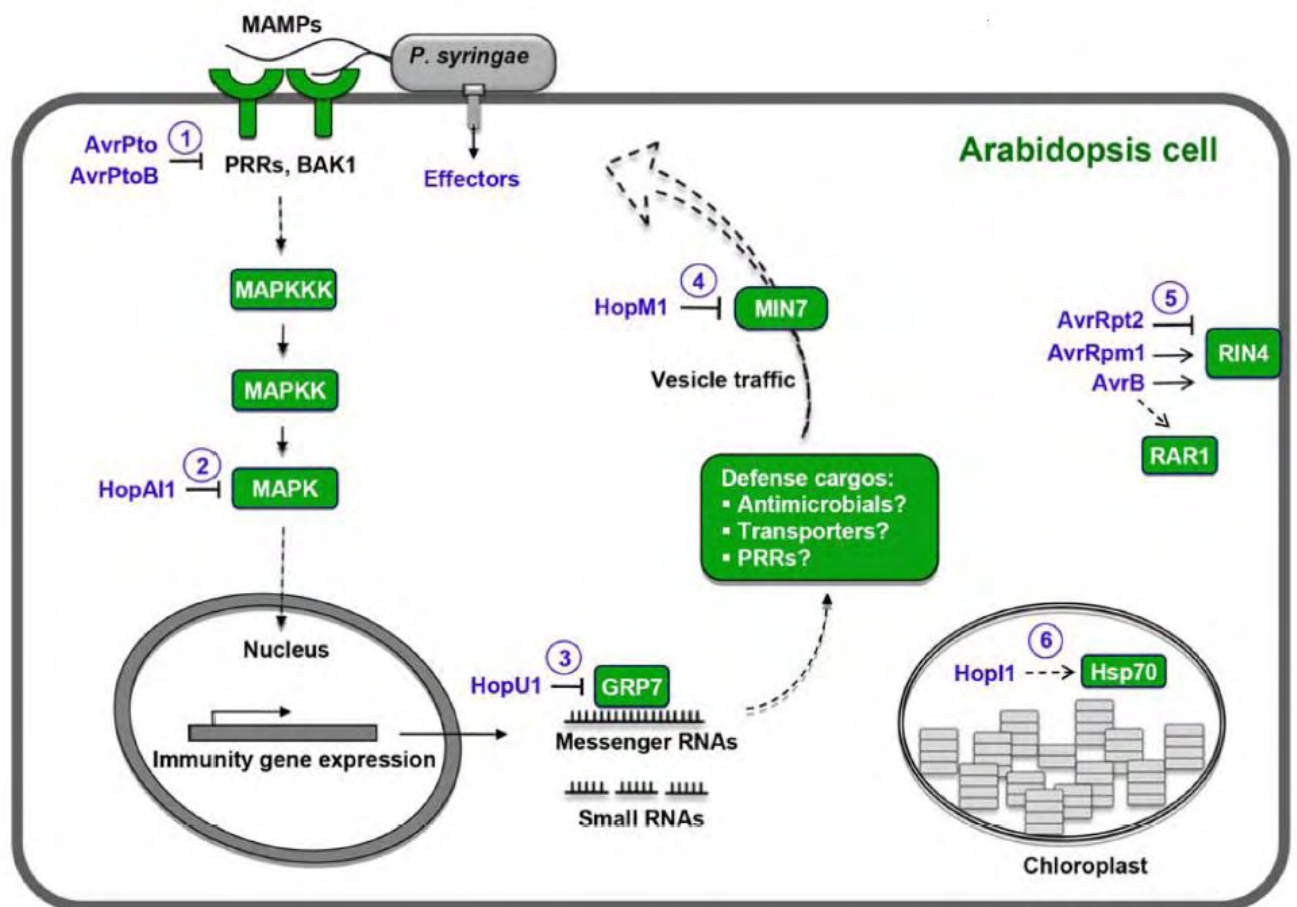


Figure I-15 : Mécanismes d'activation et de suppression de la PTI.

Ce schéma conceptualise les mécanismes de signalisation induits par des PRRs et l'action de plusieurs effecteurs de *P. syringae* pour lesquels les cibles dans la plante ont été caractérisées. Les couleurs verte et violette indiquent des protéines de plante et des effecteurs de *P. syringae* respectivement. Les nombres dans les cercles représentent six étapes cibles des effecteurs : la perception du MAMP (PRRs), la cascade de MAPK (MPK3 et MPK6), le métabolisme des ARNs (GRP7), le trafic vésiculaire (MIN7), des régulateurs de la PTI (RIN4 et RAR1) et la fonction chloroplastique (Hsp70). (Boller et He 2009).

### I.2.2.2 Damage-Associated Molecular Patterns

La plupart des pathogènes produisent des enzymes de lyse capables de percer les défenses de la plante. Les produits générés par ces enzymes peuvent fonctionner comme des éliciteurs endogènes et forment alors des DAMPs. Ces DAMPs se retrouvent au niveau de l'apoplaste et peuvent servir de signaux de danger pour induire une PTI (Matzinger 2002 ; Schwessinger et Zipfel 2008).

Les fragments de paroi cellulaire végétale détachés par l'action d'enzymes microbiennes sont des exemples classiques de DAMPs appelés initialement éliciteurs endogènes (Darvill et Albersheim 1984). Les oligo- $\alpha$ -galacturonates (OGs) détachés des pectines de la paroi végétale peuvent par exemple être reconnus par la plante et éliciter des réactions de défense (D'Ovidio *et al.* 2004 ; Ferrari *et al.* 2007). Des fragments de cutine relargués après action de cutinases fongiques jouent également le rôle de DAMPs chez la pomme de terre et le concombre (Schweizer *et al.* 1996 ; Kauss *et al.* 1999).

Par ailleurs, un peptide de 23 acides aminés, AtPep1, isolé à partir de feuilles d'*Arabidopsis*, représente la partie C-terminale d'une petite protéine cytoplasmique codée par le gène *PROPEP1*, lequel est induit en réponse à la blessure, au méthyljasmonate, à flg22 ou encore à AtPep1 lui-même (Huffaker *et al.* 2006). Il semblerait qu'AtPep1 représente un signal endogène de stress similaire à la systémine de tabac (pour revue Lotze *et al.* 2007), relargué après blessure ou attaque pathogène et agissant comme DAMP pour les cellules avoisinantes (Huffaker *et al.* 2006). AtPep1 est perçu *via* un récepteur de type LRR-RK appelé PEPR1 (Yamaguchi *et al.* 2006 ; Huffaker et Ryan 2007) selon un système étonnamment très semblable aux couples flg22/FLS2 et EF-TU/EFR.

### **I.2.3 Immunité végétale : Effector-Triggered Immunity**

Au cours de l'évolution, les pathogènes de plantes ont développé des stratégies moléculaires très performantes leur permettant d'éviter ou de manipuler les mécanismes de défense des plantes. Ainsi, le pathogène qui a coévolué avec une espèce de plante particulière est quelquefois quand même capable de délivrer à l'intérieur de l'hôte des effecteurs contribuant à la pathogénicité. Les pathogènes sécrètent ces effecteurs dans l'espace intercellulaire ou à l'intérieur de la cellule hôte *via* les systèmes de sécrétion de type III (TTSS pour Type-Three Secretion System) pour les bactéries ou une exocytose pour les oomycètes et champignons. Une souche pathogénique de *P. syringae* mutée dans son TTSS et incapable de délivrer ses effecteurs induit une réponse transcriptionnelle plus rapide et plus importante qu'une souche sauvage (Jacobek *et al.* 1993). Un TTSS opérationnel est indispensable au pathogène pour espérer une colonisation réussie (Nomura *et al.* 2005). L'action de ces effecteurs (directement au niveau des PRRs ou plus en aval dans la voie de signalisation conduisant à la PTI ; figure I-15) peut conduire à un mécanisme de sensibilité appelé Effector-Triggered Susceptibility (ETS) qui contrecarre le développement de la PTI.



Toutefois, dans un deuxième temps, un effecteur pathogène donné pourra être reconnu par protéine de type NB-LRR (pour Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat) issue du pool de gènes de résistance de la plante (figure I-14). Cette reconnaissance, basée sur une interaction spécifique entre un effecteur pathogène et le produit d'un gène de résistance végétal conduit à un mécanisme de résistance appelé Effector-Triggered Immunity ou ETI (anciennement appelée résistance verticale ou gène-pour-gène) qui est en quelque sorte une PTI amplifiée et accélérée (Jones et Dangl 2006 ; Boller et Felix 2009). L'ETI aboutit très souvent à la résistance de la plante à la maladie, résistance qui passe par la mise en place de réponses de défense passant notamment par le développement d'une réponse dite hypersensible (HR) impliquant une mort cellulaire programmée (PCD) localisée.

### I.2.3.1 Effecteurs pathogènes

AvrPto et AvrPtoB par exemple sont des effecteurs de type III de la bactérie *P. syringae* qui pourraient contribuer à la virulence en inhibant des étapes précoces de la PTI, en amont des MAPKKKs (He *et al.* 2006). Il a pu être démontré que ces deux effecteurs étaient en fait capables de se lier directement aux PRRs FLS2 et EFR chargés de reconnaître les MAMPs dans le cadre d'une PTI (Göhre *et al.* 2008 ; Xiang *et al.* 2008). Ces interactions physiques inhibent l'activité kinase des PRRs. Par ailleurs, la partie C-ter d'AvrPtoB contient un domaine ressemblant à une E3 ligase, chargée de dégrader une protéine kinase hôte « Fen » (Janjusevic *et al.* 2006 ; Rosebrock *et al.* 2007). AvrPtoB peut également se lier à CERK1, un récepteur capable de reconnaître des fragments de chitine et essentiel pour la défense face aux champignons (Gimenez-Ibanez *et al.* 2009), suggérant que CERK1 jouerait également un rôle dans la suppression de la croissance bactérienne.

En plus de leurs possibilités d'actions directement au niveau du PRR, certains effecteurs agissent plus en aval en inhibant la voie de signalisation des MAPK conduisant à la PTI (Boller et He 2009 ; figure I-15). Par exemple, l'effecteur HopAI1 présent dans de très nombreuses souches de bactéries est capable d'inhiber en partie la PTI en supprimant l'activité de MAPKs (pour Mitogen-Activated Protein Kinases) induites par la perception du MAMP (Zhang *et al.* 2007). Les effecteurs sont également capables d'agir en aval de la voie de signalisation de la PTI, directement sur des processus cellulaires nécessaires à la défense comme le trafic vésiculaire (HopM1 ; Nomura *et al.* 2006), l'intégrité chloroplastique (HopI1 ; Jelenska *et al.* 2007) ou encore les processus de synthèse d'ARNm (HopU1 ; Fu *et al.* 2007).

De fait, les effecteurs contribuent à la virulence du pathogène souvent en imitant ou en inhibant des fonctions cellulaires eucaryotes (pour revue Grant *et al.* 2006 ; Abramovitch *et al.* 2006 ; Boller et He 2009 ; figure I-15), la plupart restant à caractériser à ce jour.

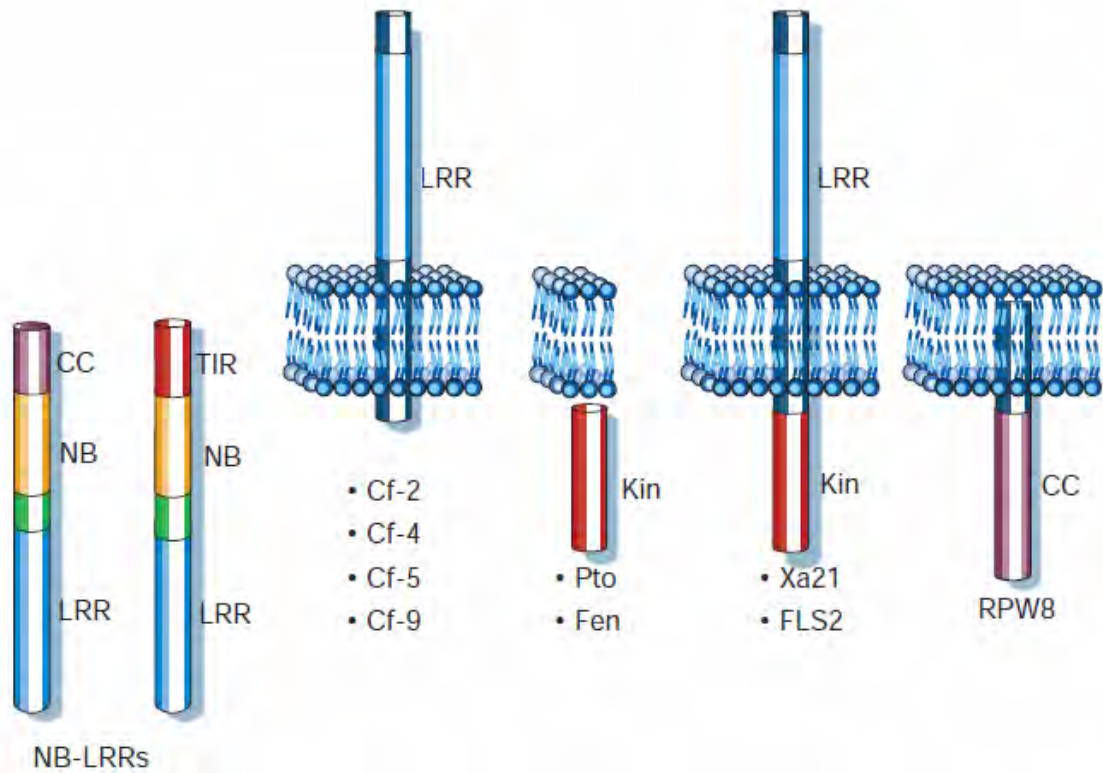


Figure I-16 : **Structures des protéines R de type NB-LRR.**

Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf9, Pto, Fen, Xa21, FLS2 et RPW9 sont des produits de gènes de résistance de la famille des NB-LRR. NB : Nucleotide Binding ; LRR : Leucine-Rich Repeat ; CC : Coiled-Coil ; TIR : Toll Interleukin Receptor 1. (Jones et Dangl 2001).

### I.2.3.2 Produits de gènes de résistance

L'évolution commune avec les pathogènes a conduit les plantes à développer des outils moléculaires leur permettant de reconnaître spécifiquement ces effecteurs. Cette capacité de reconnaissance spécifique a été caractérisée génétiquement comme étant la résistance gène-pour-gène (Flor 1971). La présence d'un effecteur (produit du gène d'avirulence) et de la protéine R (produit du gène de résistance) associée capable de le reconnaître entraîne une ETI alors qu'une absence de reconnaissance conduira à la maladie.

Dans la littérature, la plus importante classe de gènes de résistance code des protéines R de type NB-LLR, qui sont des récepteurs capables de reconnaître des effecteurs cytoplasmiques. Le site NB de liaison à des nucléotides a été caractérisé comme important pour la liaison à l'ATP ou au GTP. Cette famille de protéines R est subdivisée en deux grandes classes (figure I-16), se basant sur leur domaine N-ter (Dangl et Jones 2001) : les Coiled-Coil NB-LRR (CC-NB-LRR) et les Toll-Interleukin-1 Receptor NB-LRR (TIR-NB-LRR). Dans cette classe de protéines, les membres les mieux caractérisés sont RPS2, RPM1 et RPS5, des protéines d'*Arabidopsis* capables de reconnaître les effecteurs AvrRpt2, AvrRpm1/AvrB et AvrPphB respectivement (Bent *et al.* 1994 ; Grant *et al.* 1995 ; Warren *et al.* 1998).

Une autre classe majeure de protéines R comprend toutes les protéines LLR extracellulaires (eLRRs). Parmi ces eLRRs, trois sous-classes ont été caractérisées selon leurs domaines structuraux (Fritz-Laylin *et al.* 2005) : les RLPs (pour Receptor-Like Proteins), les RLKs (pour Receptor-Like Kinases) et les PGIPs (pour PolyGalacturonase-Inhibiting Proteins). Les RLPs les mieux caractérisées sont représentées par les protéines Cf de la tomate (Jones *et al.* 1994 ; Rivas et Thomas 2005) qui confèrent la résistance à *Cladosporium fulvum* via la reconnaissance des effecteurs Avr2, Avr4 et Avr9 (pour revue De Wit *et al.* 2009).

L'ETI induite par l'interaction entre une protéine R et un effecteur pathogène conduit à l'établissement de réponses de défense visant à contrecarrer l'action de l'envahisseur. Ces réponses de défense démarrent par des événements de signalisation très précoces comprenant un burst oxydatif, des changements dans l'homéostasie ionique et l'activation de MAPKs couplée à des événements de dé/phosphorylation. Ces événements de signalisation conduisent généralement : (i) à l'activation d'un certain nombre de gènes de défense (gènes codant pour des Pathogenesis-Related (PR) proteins notamment), (ii) à une HR-PCD localisée au lieu d'infection, (iii) à l'établissement de la « Systemic Acquired Resistance » (SAR) et (iv) au renforcement des barrières préexistantes.





## I.2.4 Réponses de défense

### I.2.4.1 Evènements précoces de signalisation

#### ➤ Flux ioniques

Un des premiers évènements de signalisation mesurables à la suite de la reconnaissance d'un PAMP ou d'un DAMP par la cellule végétale est une alcalinisation du milieu extracellulaire due à des changements de flux ioniques à travers la membrane (Boller 1995 ; Nürnberger *et al.* 2004). Ces changements incluent un influx de  $H^+$  et de  $Ca^{2+}$  et un efflux concomitant de  $K^+$ . Un efflux important d'anions, nitrate notamment, a également été observé par exemple chez le tabac en réponse à la cryptogéine (Wendehenne *et al.* 2004 ; Gauthier *et al.* 2007). Ces flux ioniques conduisent à une dépolarisation de la membrane plasmique de cellules de soja élicitées avec des heptoglucanes (Mithöfer *et al.* 2005) ou de cellules d'*Arabidopsis* stimulées avec AtPep1 (Krol *et al.* 2010). Les MAMPs sont connus pour induire un influx important de  $Ca^{2+}$  apoplastique, engendrant ainsi un signal calcique cytosolique capable de médier l'ouverture et la fermeture de divers canaux anioniques ou cationiques, régulant ainsi les différents flux ioniques essentiels à la réponse de défense (Blume *et al.* 2000 ; Brummer *et al.* 2002 ; Lecourieux *et al.* 2002 ; Ranf *et al.* 2008). Les flux ioniques régulés par le  $Ca^{2+}$  sont essentiels aux réactions de défense, le blocage des canaux calciques responsables de l'entrée du  $Ca^{2+}$  dans la cellule conduisant à une susceptibilité supérieure de la plante (Dixon *et al.* 1994).

#### ➤ Activation de MAPKs et évènements de dé/phosphorylation

Une réponse précoce à des signaux de MAMPs est l'activation de cascades de MAPKs. Chez *Arabidopsis*, la perception de flg22 conduit à une activation transitoire de l'activité d'AtMPK6 (Nühse *et al.* 2000). Il a finalement pu être montré que la perception de flg22 conduisait à l'activation de deux cascades complètes de MAPKs (Asai *et al.* 2002), ces cascades permettant l'activation d'AtMPK3 et AtMPK6, protéines essentielles à l'induction de facteurs de transcription de type WRKY (Asai *et al.* 2002). La perception de DAMPs, RALF (pour Rapid Alkalisation Factor) notamment, peut également conduire à l'activation de cascades de kinases (Pearce *et al.* 2001).

L'activation de ces MAPKs conduit à des changements de niveau de phosphorylation de protéines cibles. Une étude à grande échelle a permis de montrer que des dizaines de protéines étaient phosphorylées quelques minutes après la perception de flg22 (Peck *et al.* 2001). La diversité de protéines substrat des phosphorylations induites par flg22 comprend notamment une NADPH oxydase, une ACA, deux CDPKs, des MAPKs, des Cellulose Synthases, des régulateurs potentiels du trafic vésiculaire, des protéines PIN ou encore des transporteurs ABC (pour revue van Bentem et Hirt 2007). En particulier, la NADPH oxydase responsable du burst oxydatif observé en réponse à flg22 (RbohD pour Respiratory burst



oxydase homologue D) fait partie des protéines phosphorylées (Benschop *et al.* 2007 ; Nühse *et al.* 2007).

➤ Burst oxydatif et NO

Les ROS jouent un rôle précoce et central dans les réponses de défense des plantes (pour revue Mittler *et al.* 2004 ; Yoshioka *et al.* 2009). Deux minutes après la perception de flg22, un burst oxydatif est observable chez *Arabidopsis* (Chinchilla *et al.* 2007). Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) et l' $H_2O_2$  sont les trois principales espèces réactives d'oxygène produites chez les plantes (Apel et Hirt 2004). Elles peuvent jouer un rôle antimicrobien direct ou indirect *via* le cross-linking de composés de défenses dans la paroi cellulaire ; les ROS peuvent également jouer le rôle de seconds messagers capables d'induire diverses réponses de défense (Apel et Hirt 2004). Les ROS, capables d'oxyder les membranes lipidiques et d'endommager l'ADN, sont rapidement prises en charge par des molécules chaperones afin d'assurer l'homéostasie « redox » de la cellule (Apel et Hirt 2004).

Chez les plantes, le NO est un second messager primordial dans l'établissement des réponses de défense et en particulier de l'induction de la HR (Lamb et Dixon 1997 ; Delledonne *et al.* 1998 et 2001). Il participe également à l'induction des gènes de défense tels PR1 et PAL (Durner *et al.* 1998). En outre, plusieurs études récentes ont rapporté la production de NO en réponse à la perception de MAMPs (Gust *et al.* 2007 ; Asai *et al.* 2008). Le NO est synthétisé chez les animaux par une NO synthase, une hémoprotéine qui oxyde l'arginine pour former la citrulline et du NO (Besson-Bard *et al.* 2008) ; chez *Arabidopsis*, il n'existe pas de séquence connue de NO synthase typique (Besson-Bard *et al.* 2008). Outre son action en tant que second messager, le NO peut également avoir des activités de Métal- ou S-nitrosylation ou de tyrosine nitration (Leitner *et al.* 2009) sur un large spectre de protéines cibles, régulant ainsi leur activité ou leur fonction (Besson-Bard *et al.* 2008). Il a pu être montré par exemple que le stade de S-nitrosylation de la métacaspase 9 chez *Arabidopsis* contrôlait son activité dans la mort cellulaire programmée (Belenghi *et al.* 2007).

#### I.2.4.2 Gènes marqueurs de défense

Le traitement de plants d'*Arabidopsis* par flg22 ou elf26 conduit à l'activation de presque 1000 gènes et à l'inactivation d'environ 200 gènes, et ce, dans les 30 minutes suivant le début de l'expérience (Zipfel *et al.* 2004 et 2006). Des traitements par d'autres MAMPs tels que des fragments de chitine ou des DAMPs tels les OGs conduisent à l'activation d'un set de gènes remarquablement similaire (Ramonell *et al.* 2002 ; Moscatiello *et al.* 2006 ; Ferrari *et al.* 2007 ; Libault *et al.* 2007). Parmi les gènes induits, ceux codant pour des RLKs sont surreprésentés ; FLS2 et EFR font partie de ces gènes ce qui suggère qu'un des rôles d'une activation précoce de l'expression génique est un feed-back positif capable d'accroître les capacités de perception des PRRs (Zipfel *et al.* 2004). Il a pu être montré que les gènes

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Tbi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Tableau I-3 : **Diversité des protéines de type Pathogenesis-Related (PR).** (Van Loon *et al.* 2006).

marqueurs de défense répondaient de manière relativement similaire au cours d'une interaction compatible et d'une interaction incompatible (Tao *et al.* 2003 ; Navarro *et al.* 2004). Toutefois, la réponse est accélérée dans le cas d'interactions incompatibles, suggérant que la cinétique et le pattern temporel du programme de défense sont des éléments clés déterminant le devenir de l'interaction plante-pathogène (Tao *et al.* 2003 ; Glazebrook 2005).

La principale famille de gènes marqueurs de défense est constituée par les protéines PR, classées en différentes sous-familles (PR1 à PR17) ; elles sont structurellement et fonctionnellement très différentes les unes des autres (pour revue Van Loon et Van Strien 1999 ; Van Loon *et al.* 2006 ; tableau I-3). Différentes voies de signalisation conduisent à l'expression de ces protéines PR durant la SAR chez *Arabidopsis* (Ward *et al.* 1991). L'éthylène et l'Acide Jasmonique (JA) activent la transcription de gènes codant des inhibiteurs de protéases, des défensines et des PR plutôt basiques, alors que l'Acide Salicylique (SA) active l'expression de protéines PR acides jouant un rôle dans la SAR (Epple *et al.* 1995 ; Van Loon *et al.* 2006).

Les gènes *hsr* (*hypersensitivity-related*) constituent une autre classe de marqueurs de défense, et notamment des réponses de HR. *hsr203J*, *hsr201* et *hsr515* sont des gènes identifiés chez le tabac et dont l'expression est corrélée au déroulement de la HR (Pontier *et al.* 1994 ; Czernic *et al.* 1996).

#### I.2.4.3 « Hypersensitive Response » et « Programmed Cell Death »

Le phénomène de résistance connu sous le nom de HR a été pour la première fois décrit il y a plus de 100 ans lorsque Ward observa une grande diversité de réponses à la rouille *Puccinia dispersa* chez plusieurs variétés de blé (Ward 1902). La définition même de HR a été donnée 13 ans plus tard par Stakman qui observa que les 'host plants exhibit a considerable degree of resistance to the fungus...the host plant in such cases is hypersensitive to the fungus' (Stakman 1915). Depuis lors, la HR est considérée comme une réponse classique de défense des plantes, leur permettant de restreindre l'évolution du pathogène en l'enfermant dans une zone de nécrose qui peut concerner quelques cellules pour *Pseudomonas syringae* ou des zones bien plus importantes pour le TMV (Tobacco Mosaic Virus). La PCD chez les plantes est un processus de mort cellulaire programmée organisé et essentiel pour divers processus dans le développement et la réponse aux pathogènes (Reape et McCabe 2008). L'apoptose-like PCD chez les plantes ressemble beaucoup à l'apoptose animale caractérisée notamment par une fragmentation nucléaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et finalement une dégradation de la cellule apoptotique (Van Doorn et Woltering 2005). On trouve chez les plantes des protéines de type caspase-like, c'est-à-dire ressemblant aux caspases animales qui jouent un rôle essentiel dans l'apoptose. Ces protéines sont des métacaspases (Watanabe et Lam 2004) dont l'expression est induite dans certains cas d'interaction plante-pathogène (Hoeberichts *et al.* 2003).

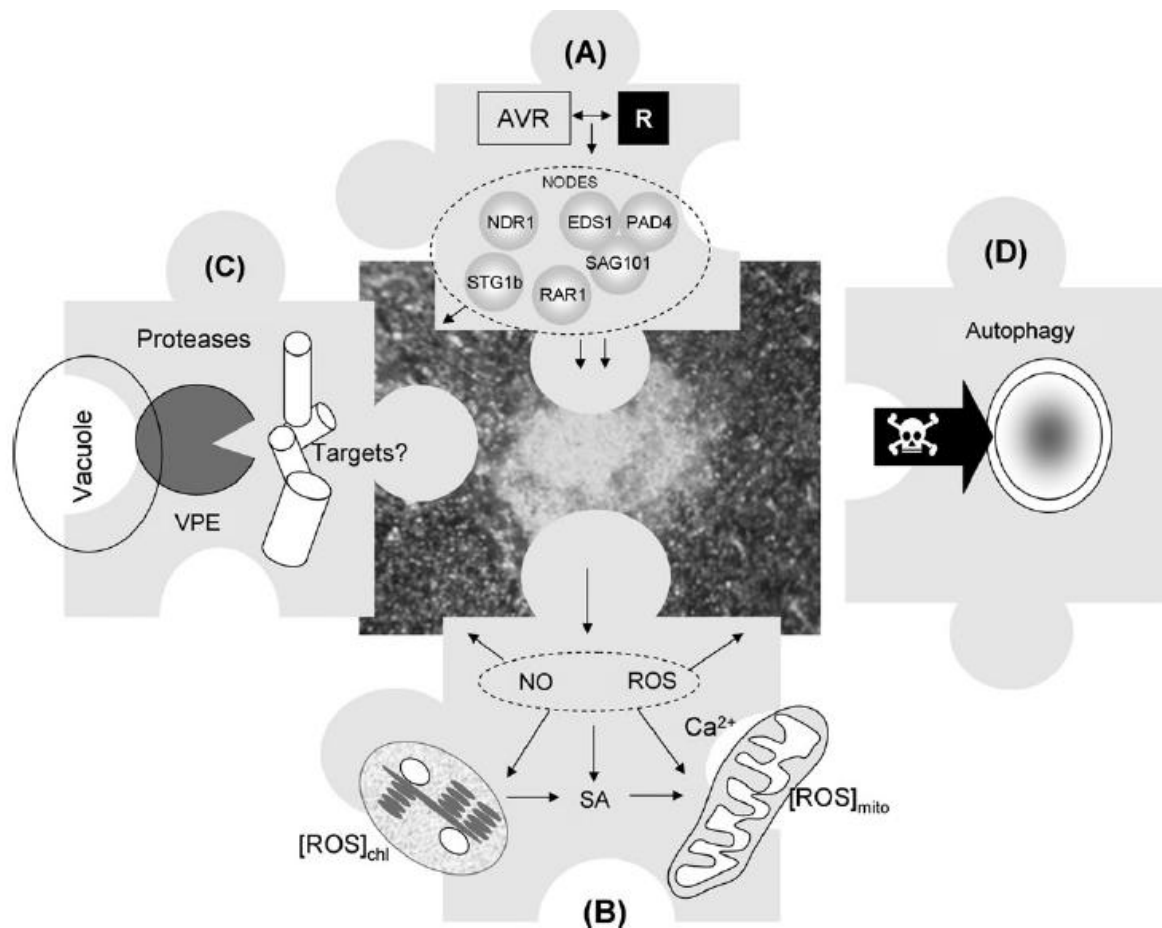


Figure I-17 : **Le puzzle de la Réponse Hypersensible.**

- (A) L'interaction d'un produit de gène d'avirulence (AVR) avec un produit de gène de résistance (R) initie la HR et un large nombre de réponses de défense associées.
- (B) *Via* des mécanismes encore méconnus, l'interaction Avr-R conduit à la production persistante de ROS, de NO, de SA et de flux calciques conduisant à une accumulation de ROS dans la mitochondrie et le chloroplaste.
- (C) L'interaction Avr-R et la génération de ROS et de NO conduit à l'activation de protéases de type caspase-like, qui pourraient être des enzymes vacuolaires conduisant *in fine* à la rupture du tonoplaste.
- (D) Récemment, il a été montré que le maintien de la mort cellulaire à la périphérie de la lésion de type HR était associé à des autophagosomes qui contiendraient des facteurs d'élicitation de la mort cellulaire. (Mur *et al.* 2008).

Un autre type de PCD chez les plantes a été annoté comme « autophagic PCD », par référence à l'autophagie animale. Chez les plantes, une telle PCD a notamment pu être observée en réponse à une carence en carbone (Rose *et al.* 2006). L'autophagie se produit quand les constituants cellulaires vitaux sont dégradés dans des lysosomes (Reape et McCabe 2008). Les caractéristiques de l'apoptose-like PCD et de l'autophagic PCD diffèrent notamment de part leurs cinétiques très différentes (l'autophagie étant un procédé beaucoup plus lent) et la formation d'autophagosomes uniquement dans le cadre de l'autophagie (Doorn et Woltering 2005 ; Love *et al.* 2008).

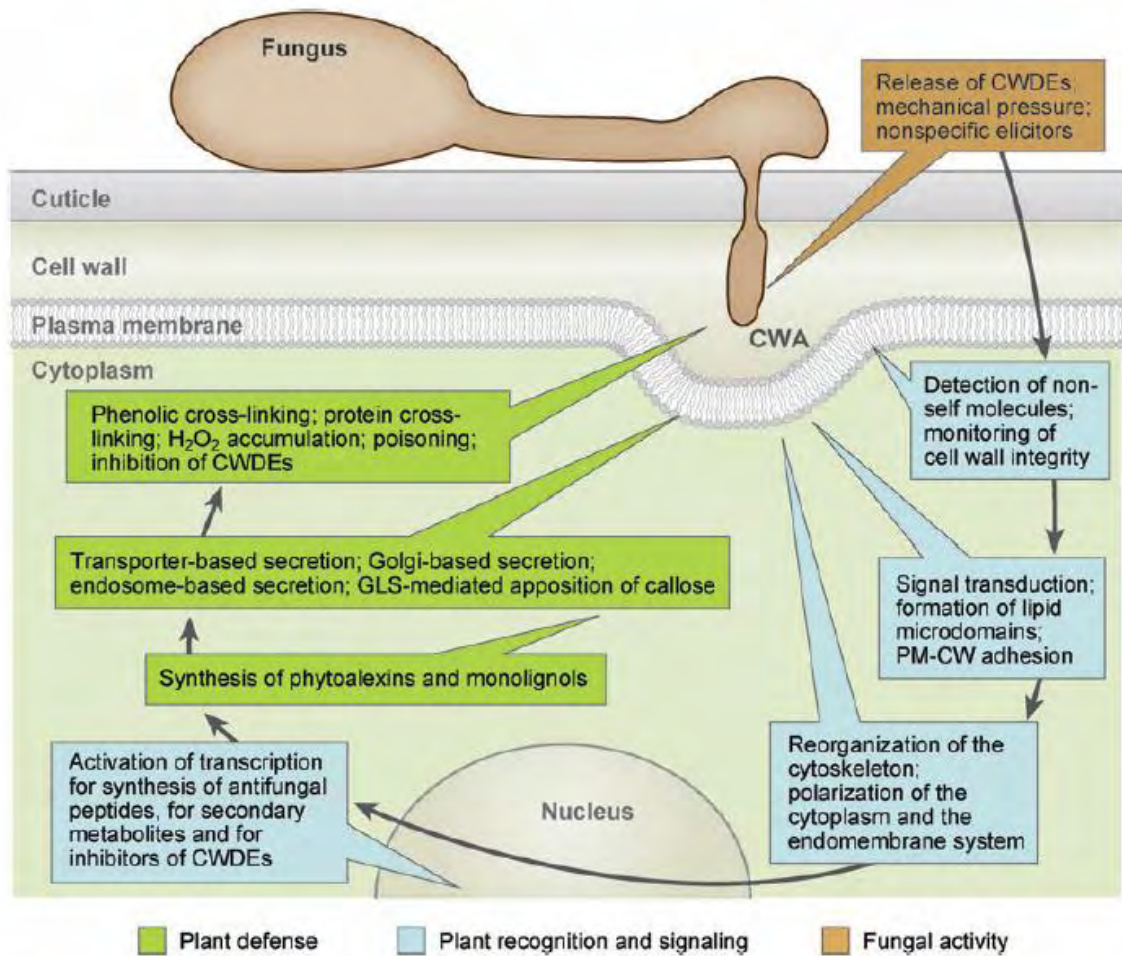
La HR chez les plantes est une mort cellulaire rapide déclenchée sur le site même d'une infection, limitant la progression du pathogène (Dangl *et al.* 1996 ; Greenberg 1997). Cette mort cellulaire est issue d'un programme génétique et non causée par des toxines pathogènes (Greenberg et Yao 2004). Des mutants d'*Arabidopsis* présentant des lésions HR de manière constitutive ont permis l'identification de régulateurs positifs et négatifs de la HR (Lorrain *et al.* 2003 ; Greenberg et Yao 2004). Le développement de cette HR présente des caractéristiques communes avec l'apoptose animale (Levine *et al.* 1996 ; Greenberg et Yao 2004) et est associée avec un grand nombre d'évènements moléculaires : flux ioniques (Grant *et al.* 2000 ; Ali *et al.* 2007), burst oxydatif (Levine *et al.* 1994 ; Bolwell *et al.* 2002), ou encore le signal NO (Zeier *et al.* 2004 ; Boccara *et al.* 2005). Bien que les caractéristiques de la HR se rapprochent des caractéristiques apoptotiques, il est possible que la réponse conduisant à une HR résulte d'une combinaison entre plusieurs mécanismes de PCD (Mur *et al.* 2008 ; figure I-17).

#### I.2.4.4 « Systemic Acquired Resistance »

La perception des signaux de danger intervient dans les environs immédiats de la blessure et des sites d'invasion. En plus des défenses locales, une attaque pathogène peut induire une réponse systémique, la SAR, permettant de protéger la plante contre une attaque ultérieure par une plus large variété de pathogènes (pour revue Vlot *et al.* 2008). La SAR se caractérise par des niveaux élevés en SA et par l'activation préventive de protéines PR et de gènes antimicrobiens dans des tissus sains, conférant ainsi une résistance améliorée contre une infection ultérieure par des pathogènes virulents (Glazebrook *et al.* 1997).

Afin d'être mise en place, la SAR requiert un signal systémique capable d'activer des défenses et d'être transloqué du tissu attaqué vers les tissus sains. Ces signaux systémiques peuvent transiter par le système vasculaire ou être véhiculés par voie aérienne ; la nature de ces signaux est multiple et inclut le MéthylJasmonate (MJ) et le méthylsalicylate (pour revue Shah 2009).

Une expression systémique de défense peut également être observée dans des plantes qui sont colonisées par des symbiontes. En effet, il a été observé qu'une colonisation par des *rhizobia* ou des mycorrhizes augmentait la résistance future de la plante contre des attaques biotiques



**Figure 2**

Integration of biochemical and molecular mechanisms for cell wall-associated defense. Figure should be looked at clockwise. This model does not claim to be exhaustive. CW, cell wall; CWA, cell wall apposition; CWDE, cell wall-degrading enzyme; GLS, glucan synthase; PM, plasma membrane.

**Figure I-18 : Mécanismes de défense liés à des modifications de la paroi des plantes.**  
(Hückelhoven 2007).



(Van Loon 2007 ; Liu *et al.* 2007), cette résistance a été nommée « Induced Systemic Resistance » (ISR).

#### I.2.4.5 Renforcement de la paroi

Les pathogènes disposent dans leur arsenal d'une batterie d'enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire et de faciliter la nutrition ou l'avancée du pathogène. Parmi ces enzymes, cutinases, cellulases, polygalacturonases, xylanases et protéinases participent à la dégradation concertée de la paroi (pour revue Annis et Goodwin 1997). La capacité du pathogène à percer les défenses de la plante dépend aussi de sa capacité à exprimer tout un ensemble d'enzymes lytiques (Kämper *et al.* 2006). Les fragments de paroi détachés par ces enzymes pathogènes peuvent alors être perçus par la plante comme des DAMPs (voir aussi paragraphe I.2.2.2). Une fois un MAMP ou un DAMP perçu, la plante induit une batterie de défenses apoplastiques comprenant l'inhibition des enzymes lytiques microbiennes, le renforcement de la paroi et l'empoisonnement du pathogène (Hückelhoven 2007 ; figure I-18).

Les agents antimicrobiens de plante sont des composés de bas poids moléculaire capables de rendre l'apoplaste toxique pour l'envahisseur. Certaines protéines PR (chitinases, glucanases, protéases, défensines) sécrétées dans la paroi jouent ce rôle et affectent la paroi des pathogènes ou l'intégrité de leurs membranes ; PR1 par exemple, possède une activité antimicrobienne (Rauscher *et al.* 1999). Les phytoalexines sont des constituants majeurs de la réponse de défense dans la mesure où elles peuvent inhiber le développement du champignon, ralentir sa progression tout en participant au renforcement des propriétés mécaniques de la paroi. Par exemple, des mutants *mlo* d'orge surproduisent la *p*-coumaroyl-hydroxyagmatine, une phytoalexine qui possède une activité antifongique et inhibe la formation d'haustorium *in vivo* (Von Röpenack *et al.* 1998). Des composés phénoliques peuvent également être liés de façon covalente ou « cross-linkés » dans la paroi pour restreindre le pathogène ; toutefois, on ne sait pas si ces composés phénoliques fonctionnent comme composés toxiques ou comme composés renforçant la paroi (Hahlbrock *et al.* 1995 ; Von Röpenack *et al.* 1998). Le renforcement chimique et mécanique de la paroi permet également à la cellule de contrecarrer l'avancée du pathogène. Ainsi, la lignification rend la paroi plus résistante à une pression mécanique exercée par un appressorium fongique (Bechinger *et al.* 1999). L'inhibition de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, voie biochimique majeure pour la production de composés de renforcement de la paroi, entraîne une sensibilité plus prononcée vis-à-vis de pathogènes de l'orge, du blé ou de l'avoine (Carver *et al.* 1992 ; Kruger *et al.* 2002 ; voir aussi I.3). Le dépôt de callose au sein de la paroi est une autre des réponses susceptibles d'expliquer la résistance à la pénétration de cellules élicitées ; le traitement des feuilles d'*Arabidopsis* par flg22 conduit à d'importants dépôts de callose au sein de la paroi (Gomez-Gomez *et al.* 1999).

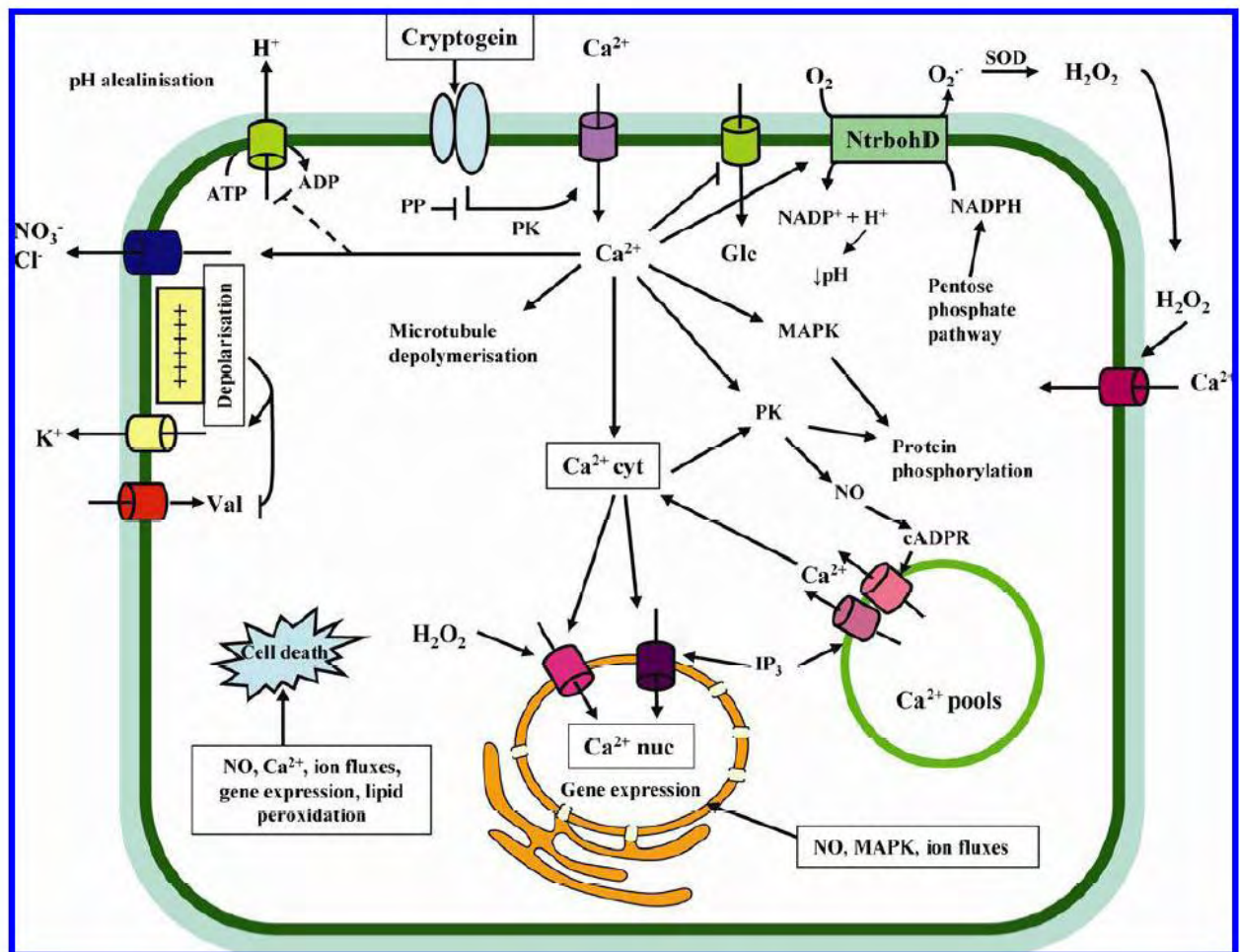


Figure I-19 : **Représentation des voies de signalisation et de transduction des signaux en réponse à la cryptogéine chez le tabac.** (Garcia-Brugger *et al.* 2006).

La perception de la cryptogéine induit une activité kinase précoce suivie d'un influx de calcium dans le cytosol. Cette variation de calcium cytosolique conditionne l'activation d'une cascade d'événements : production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO, libération de calcium des pools intracellulaires, phosphorylations de protéines, activation de canaux ioniques, dépolymérisation des microtubules, et régulation de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la réponse biologique.

### I.2.5 Le modèle cryptogéine/tabac

L'interaction compatible entre le tabac (*Nicotiana tabacum*) et *Phytophthora parasitica var. nicotianae*, la seule espèce de *Phytophthora* pathogène pour cette plante, provoque la maladie de la pourriture noire ou « black shank », responsable du pourrissement du pied de tabac puis de sa mort. Une interaction entre le tabac et d'autres espèces de *Phytophthora* conduit en revanche à l'apparition de nécroses foliaires et à la mise en place d'une SAR à spectre large, efficace également contre *Phytophthora parasitica var. nicotianae* (Bonnet *et al.* 1986 ; Ricci *et al.* 1997). Ces symptômes d'interaction incompatible peuvent également être obtenus par infiltration foliaire du filtrat de culture de ces oomycètes, suggérant la présence d'une ou plusieurs molécules à activité élicitrice. Les élicitines, petites protéines purifiées à partir du substrat sont responsables de cette activité élicitrice (Bonnet *et al.* 1986 ; Ricci *et al.* 1989). Les élicitines sont produites par des oomycètes, les *Phytophthora* et quelques espèces de *Pythium* (Panabières *et al.* 1997). La cryptogéine, sécrétée par *Phytophthora cryptogea*, est une petite protéine de 10kDa composée de 6 hélices  $\alpha$ , d'un feuillet  $\beta$  et d'une boucle  $\Omega$  susceptible d'être le site d'interaction de la cryptogéine avec son récepteur potentiel (Boissy *et al.* 1996). La cryptogéine est un éliciteur général, elle induit une HR dans divers cultivars de tabac mais aussi chez des brassicacées comme le colza et le radis (Bonnet *et al.* 1996 ; Ricci *et al.* 1997). L'étude intensive du modèle d'interaction tabac-cryptogéine a permis de mettre en évidence un certain nombre d'évènements cellulaires précoces conduisant à l'établissement des réponses de défense dans des cultures cellulaires et *in planta* (figure I-19).

#### I.2.5.1 Liaison cryptogéine-récepteur

Des sites de haute affinité pour la cryptogéine ont été identifiés sur la membrane plasmique de cellules de tabac (220 fmol.mg<sup>-1</sup> de protéines de plasmalemmes). La liaison de forte affinité (Kd=2nM) est saturable, réversible, spécifique et dépendante du pH (Wendehenne *et al.* 1995), correspondant parfaitement aux caractéristiques d'une interaction ligand-récepteur. La cinnamomine, la capsicéine et la parasiticéine, des élicitines provenant d'autres souches de *Phytophthora* sont également capables d'interagir avec ces mêmes sites de fixation, cette interaction étant essentielle pour leur fonction élicitrice (Bourque *et al.* 1998). Ces sites de fixation de la cryptogéine ont été par la suite caractérisés : ils sont constitués de deux glycoprotéines de masse moléculaire 160 et 50kDa (Bourque *et al.* 1999). Les motifs glucidiques de ces glycoprotéines sont impliqués dans l'interaction. Par ailleurs, la cryptogéine (et d'autres élicitines) possède la capacité de lier des stérols, entraînant un changement de leur conformation (Boissy *et al.* 1999). Par ailleurs, les élicitines, qui catalysent le transport de stérol entre des membranes phospholipidiques artificielles (Mikes *et al.* 1997 et 1998), peuvent capter et transférer des stérols de différentes membranes biologiques (Vauthrin *et al.* 1999). Il a été proposé, sachant que l'activité élicitrice de la



cryptogéine dépendrait de sa liaison à des stérols, que c'est le complexe cryptogéine-stérol qui serait reconnu par des récepteurs putatifs (Osman *et al.* 2001) non identifiés à ce jour. Immédiatement après la fixation de la cryptogéine sur son récepteur putatif, une cascade de signalisation est mise en place (figure I-19).

#### I.2.5.2 Evènements de dé/phosphorylation

Cette cascade de signalisation démarre par des évènements très précoces de phosphorylation mettant en jeu une protéine kinase non caractérisée à ce jour (Viard *et al.* 1994 ; Tavernier *et al.* 1995 ; Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000). Par ailleurs, il semblerait qu'une phosphatase jouerait un rôle régulateur dans la voie de signalisation induite par la cryptogéine (Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000).

Le rôle des protéines kinases induites par la perception de la cryptogéine n'est pas restreint aux premiers évènements précoces de signalisation mais concerne également la phosphorylation de protéines cibles dans le cytosol et le noyau. Ainsi, il a pu être montré que la cryptogéine induit la phosphorylation de 19 protéines dans les 5 minutes qui suivent la perception (Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000). Parmi les protéines kinases susceptibles de participer à la phosphorylation de ces protéines cibles, une SIPK (pour Salicylic acid-Induced Protein Kinase) et une WIPK (pour Wound-Induced Protein Kinase) sont activées de manière précoce par la cryptogéine (Zhang *et al.* 1998 et 2000 ; Lebrun-Garcia *et al.* 1998). Ntf4 code également pour une MAPK activée par la cryptogéine (Ren *et al.* 2006). L'activation de ces kinases, notamment SIPK et WIPK, dépend d'un influx prolongé de  $Ca^{2+}$  (Lebrun-Garcia *et al.* 1998). Le rôle de ces MAPK n'est pas clairement établi ; toutefois, il a pu être montré que SIPK régule le niveau de phosphorylation de WRKY1, un facteur de transcription impliqué dans les voies de défense et peut-être dans l'établissement de la HR (Menke *et al.* 2005). Il existe au moins 3 autres protéines kinases cytosoliques dont l'une coderait pour une CCaMK et donc potentiellement impliquée dans la régulation ou le décodage des signaux calciques générés en réponse à la cryptogéine (Lecourieux *et al.* 2002). Plus récemment ont pu être identifiées au moins 4 protéines kinases nucléaires activées en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.* 2009). En particulier, l'une des protéines kinase identifiées est en fait une SIPK nucléaire dont l'activité serait essentielle pour la mise en place de la HR (Dahan *et al.* 2009).

#### I.2.5.3 Flux ioniques

La modification des flux ioniques membranaires est l'une des réponses les plus précoces. Immédiatement après des évènements de phosphorylation se produit une ouverture de canaux calciques membranaires entraînant un influx de  $Ca^{2+}$  dans la cellule (Tavernier *et al.* 1995). Ces canaux ne sont pas encore identifiés bien que le canal codé par *NbTPC1*, récemment caractérisé, pourrait expliquer une partie du signal calcique généré en réponse à la cryptogéine (Kadota *et al.* 2004). L'utilisation d'agents pharmacologiques bloquant les

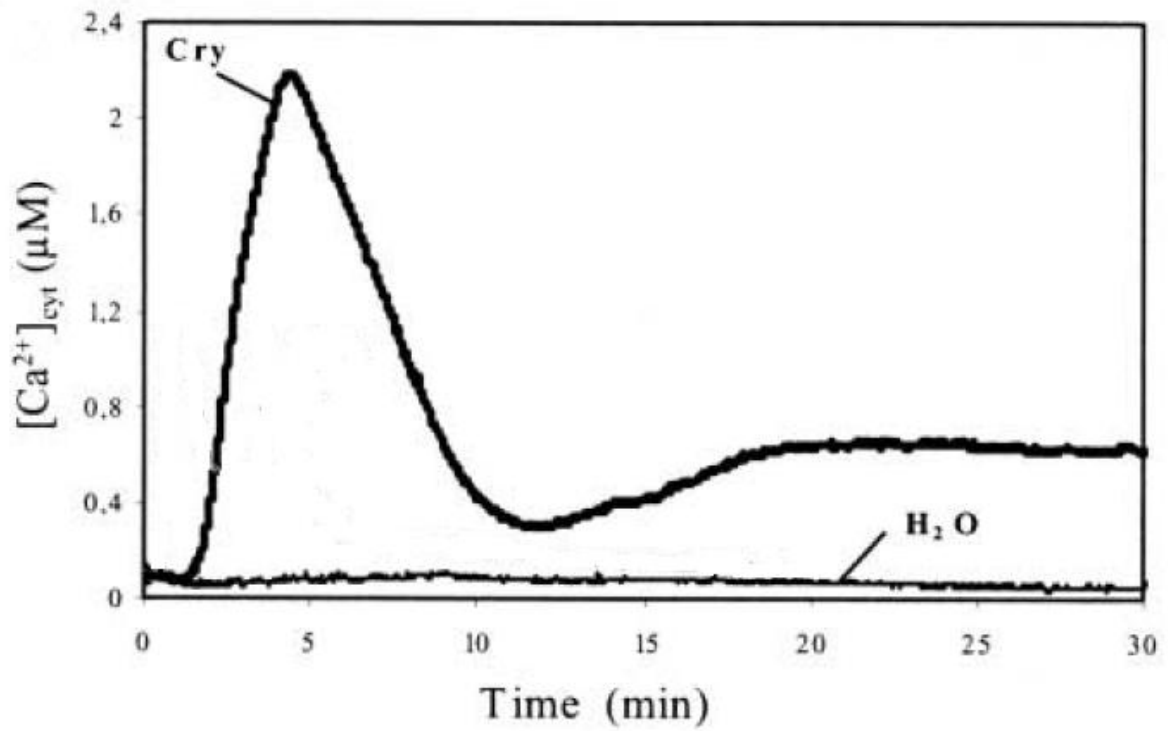


Figure I-20. Signature calcique cytosolique caractéristique de la cryptogéine dans des cultures cellulaires de *Nicotiana plumbaginifolia*. (Lecourieux *et al.* 2002).

canaux calciques membranaires ( $\text{La}^{3+}$  ou  $\text{Gd}^{3+}$ ) ou chélatant le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (BAPTA ou EGTA) a permis de montrer que la quasi-totalité des événements de signalisation déclenchés par la perception de la cryptogéine étaient dépendants de cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  : la production de ROS (Tavernier *et al.* 1995), l'efflux d'anions (Pugin *et al.* 1997), l'activation des MAPKs (Lebrun-Garcia *et al.* 1998), la dépolymérisation de microtubules (Binet *et al.* 2001), l'inhibition du prélèvement de glucose (Bourque *et al.* 2002), ou encore la production de NO (Lamotte *et al.* 2004). L'utilisation de cultures cellulaires de tabac exprimant l'aequorine a permis de montrer que l'influx initial de  $\text{Ca}^{2+}$  induisait une variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , responsable à son tour du relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis des pools intracellulaires (Lecourieux *et al.* 2002 et 2005). La signature calcique cytosolique caractéristique de la cryptogéine (figure I-20) dans des cultures cellulaires de *Nicotiana plumbaginifolia* comprend notamment après une phase de latence de quelques minutes un premier pic calcique maximal à 5 min suivi d'une seconde phase d'élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  bien plus prolongée dans le temps (Lecourieux *et al.* 2002). De manière très intéressante, une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de type  $\text{P}_{2\text{B}}$  a récemment été identifiée chez *Nicotiana benthamiana* (Zhu *et al.* 2010). Cette ACA joue un rôle dans la modulation de la signature calcique générée en réponse à la cryptogéine et exerce un contrôle partiel sur le déclenchement des réponses de défense (Zhu *et al.* 2010). Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue donc un rôle central dans la voie de signalisation induite par la cryptogéine.

Outre l'influx prolongé de  $\text{Ca}^{2+}$ , d'importants efflux d'anions, en particulier  $\text{NO}_3^-$ , ont été caractérisés dans les 5 minutes suivant la perception de la cryptogéine (Pugin *et al.* 1997 ; Wendehenne *et al.* 2002). Cet efflux est particulièrement important pour la dépolymérisation de la membrane plasmique et constituerait un pré-requis pour l'induction plus tardive de la HR (Pugin *et al.* 1997 ; Wendehenne *et al.* 2002 ; Gauthier *et al.* 2007). Cet efflux d'anions est temporellement postérieur à l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  ; toutefois, il est postulé que cet afflux d'anions contribue, par la dépolarisation qu'il entraîne, au prolongement de l'influx calcique *via* l'activation de canaux calciques voltage-dépendants (Gauthier *et al.* 2007). Il a également été montré que les efflux d'anions étaient essentiels pour l'induction de la HR et étaient impliqués dans l'expression de certains gènes associés à la mort cellulaire, y compris *hrs203J* (Wendehenne *et al.* 2002). Des efflux de  $\text{K}^+$  ont également été observés (Pugin *et al.* 1997).

#### I.2.5.4 Production de ROS et de NO, inhibition du prélèvement du glucose

La production de ROS, ou burst oxydatif est un processus important des voies de signalisation conduisant à la défense des plantes (Lamb et Dixon 1997). En réponse à la cryptogéine, une production de ROS est observée dès 10 minutes, avec un pic à 30 minutes de traitement. Une NADPH oxydase membranaire est responsable de la réduction de l' $\text{O}_2$  en  $\text{O}_2^-$  (Pugin *et al.* 1997). Elle a par la suite été identifiée comme étant codée par le gène *NtRbohD* (Simon-Plas *et al.* 1997 et 2002) ; cette NADPH oxydase est régulée par des petites protéines G membranaires de la famille des Rac et contribue à la mise en place des défenses (Morel *et al.* 2004). Il a également pu être montré qu'en réponse à la cryptogéine, des ROS





étaient produites dans le noyau et dans le cytoplasme de cellules de tabac BY-2, soulignant la complexité de la compartimentation de l' $H_2O_2$  notamment en réponse à un éliciteur. De plus, la production nucléaire de ROS semble être la première à être activée suggérant ainsi un rôle de molécule signal dans la cellule en plus du rôle toxique pour le pathogène dans l'apoplaste (Ashtamker *et al.* 2007). Par ailleurs, bien qu'il ait pu être montré que des plants de tabac traités à la lumière développaient une HR liée à la peroxydation des lipides par des ROS (Montillet *et al.* 2005), il semble bien que dans le modèle cryptogéine-tabac, les espèces réactives d'oxygène soient principalement impliquées dans des événements de signalisation et non dans l'établissement de la HR ou dans d'autres réponses de défense (Ashtamker *et al.* 2007 ; Lherminier *et al.* 2009).

Le NO est une autre molécule particulièrement importante dans les voies de signalisation conduisant à la défense des plantes (Durner et Klessig 1999). Des cellules de tabac élicitées par la cryptogéine répondent par une production de NO mesurable dès les premières minutes de l'interaction, et qui se poursuit plusieurs heures (Foissner *et al.* 2000 ; Lamotte *et al.* 2004). Cette production de NO est particulièrement importante pour la régulation des signaux calciques car elle contrôle la libération de  $Ca^{2+}$  depuis les pools internes (Lamotte *et al.* 2004). En outre, le NO plus que les ROS semble être une composante importante de l'induction de la HR.

La perception de la cryptogéine induit également une baisse importante de la quantité de 6P-glucose cytosolique ainsi qu'une accumulation de produits glycolytiques (Pugin *et al.* 1997), suggérant l'importance du métabolisme et du transport des sucres dans les réponses de défense. La cryptogéine induit en fait une inhibition calcium-dépendante de l'« uptake » en glucose, processus qui expliquerait en partie la mort cellulaire déclenchée par la perception de l'éliciteur (Bourque *et al.* 2002).

#### I.2.5.5 Dynamique membranaire

Un certain nombre de protéines impliquées dans la voie de signalisation médiée par la cryptogéine sont localisées au niveau de la membrane plasmique, soulignant le rôle important de cette bicouche lipidique dans la transduction du signal de perception de l'éliciteur. Chez les animaux, il a pu être montré que les lipides constituant la membrane ne sont pas organisés de façon uniforme mais peuvent se regrouper en microdomaines de façon dynamique notamment sous la forme de radeaux lipidiques ou « lipid rafts » (pour revue Rietveld et Simons 1998). Riches en stérols et en sphingolipides, ces microdomaines sont plus rigides et mieux organisés que le reste de la membrane. De tels microdomaines ont été caractérisés notamment dans la membrane plasmique de cellules de tabac (Mongrand *et al.* 2004). La composition protéique de ces microdomaines chez le tabac révèle la présence d'un certain nombre d'acteurs de la voie de signalisation cryptogéine-dépendante, y compris le système responsable de la production de ROS (Morel *et al.* 2006), dont l'analyse de la distribution a pu montrer qu'elles étaient notamment retrouvées dans ces microdomaines (Lherminier *et al.* 2009). Par ailleurs,



des cellules de tabac traitées par la cryptogéine déclenchent en quelques minutes une modification de la dynamique d'association des protéines à ces domaines membranaires (Stanislas *et al.* 2009).

L'endocytose est un phénomène essentiel chez les eucaryotes, permettant l'internalisation de portions de membranes et de protéines pour leur dégradation (*via* des lysosomes) ou leur recyclage (*via* des endosomes) dans la membrane plasmique (Willingham et Pastan 1984). Chez les plantes, le processus d'endocytose est important dans les interactions plante-pathogène ; le récepteur de la flg22, FLS2 est internalisé après liaison à son ligand (Robatzek *et al.* 2006) et l'éliciteur fongique EIX induit l'internalisation de son récepteur chez la tomate (Bar et Avni 2009). Chez le tabac, la cryptogéine induit de façon spécifique une endocytose accrue *via* la formation *de novo* d'invaginations de la membrane plasmique. La cinétique d'augmentation de ces invaginations coïncide avec celle de la production de ROS alors que des plants antisens pour le gène *NtRbohD* ne déclenchent plus d'endocytose en réponse à la cryptogéine, suggérant un lien entre les deux événements (Leborgne-Castel *et al.* 2008).

#### I.2.5.6 Réponses de défense : gènes marqueurs, « Hypersensitive Response », « Systemic Acquired Resistance » et renforcements pariétaux

La perception de la cryptogéine induit l'expression de gènes marqueurs des réactions de défense. Parmi ceux-ci, le gène *hsr203J*, caractérisé chez le tabac comme étant précocément induit en réponse à *P. syringae* et constituant un marqueur de la HR (Pontier *et al.* 1994), est fortement activé dans des cultures cellulaires de tabac élicitées par la cryptogéine (Lecourieux *et al.* 2002). Ces résultats sont en accord avec le fait que ces mêmes cellules subissent une PCD marquée dès 8 heures de traitement ; l'expression d'*hsr203J* et la HR induite sont deux événements  $Ca^{2+}$ -dépendants qui sont inhibés par le blocage de l'influx calcique par du  $La^{3+}$  (Lecourieux *et al.* 2002). Le gène *PAL* (pour Phénylalanine Ammonia-Lyase) est un autre gène typiquement induit dans le cadre d'interactions plantes-pathogènes (Edwards *et al.* 1985 ; Pellegrini *et al.* 1994) ; la cryptogéine active son expression de manière importante (Lecourieux *et al.* 2002).

La perception de la cryptogéine conduit également à l'établissement d'une SAR (Keller *et al.* 1996a). Bien que les mécanismes de son activation soient méconnus, il a été montré que l'acide salicylique (SA) jouerait un rôle important dans la mesure où des plants de tabac surexprimant le gène *NahG* (codant une enzyme métabolisant le SA) sont incapables d'induire une SAR en réponse à la cryptogéine (Keller *et al.* 1996b).

Par ailleurs, la HR induite chez le tabac par la cryptogéine est un mécanisme complexe sous la dépendance d'un certain nombre d'évènements de signalisation comprenant l'influx initial de  $Ca^{2+}$  mais également la production de NO, la dépolymérisation de microtubules (Binet *et al.* 2001) ainsi que l'apparition d'une plasmolyse dès les premières heures de l'interaction (Gauthier *et al.* 2007).



Enfin, il a été démontré dans des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum* qu'un traitement à la cryptogéine entraînait une altération de la paroi cellulaire due notamment à une réorganisation des couches de pectine de la lamelle moyenne (Kieffer *et al.* 2000). Ces modifications pariétales induisent en particulier une moindre digestibilité de la paroi, soulignant leur rôle dans son renforcement.

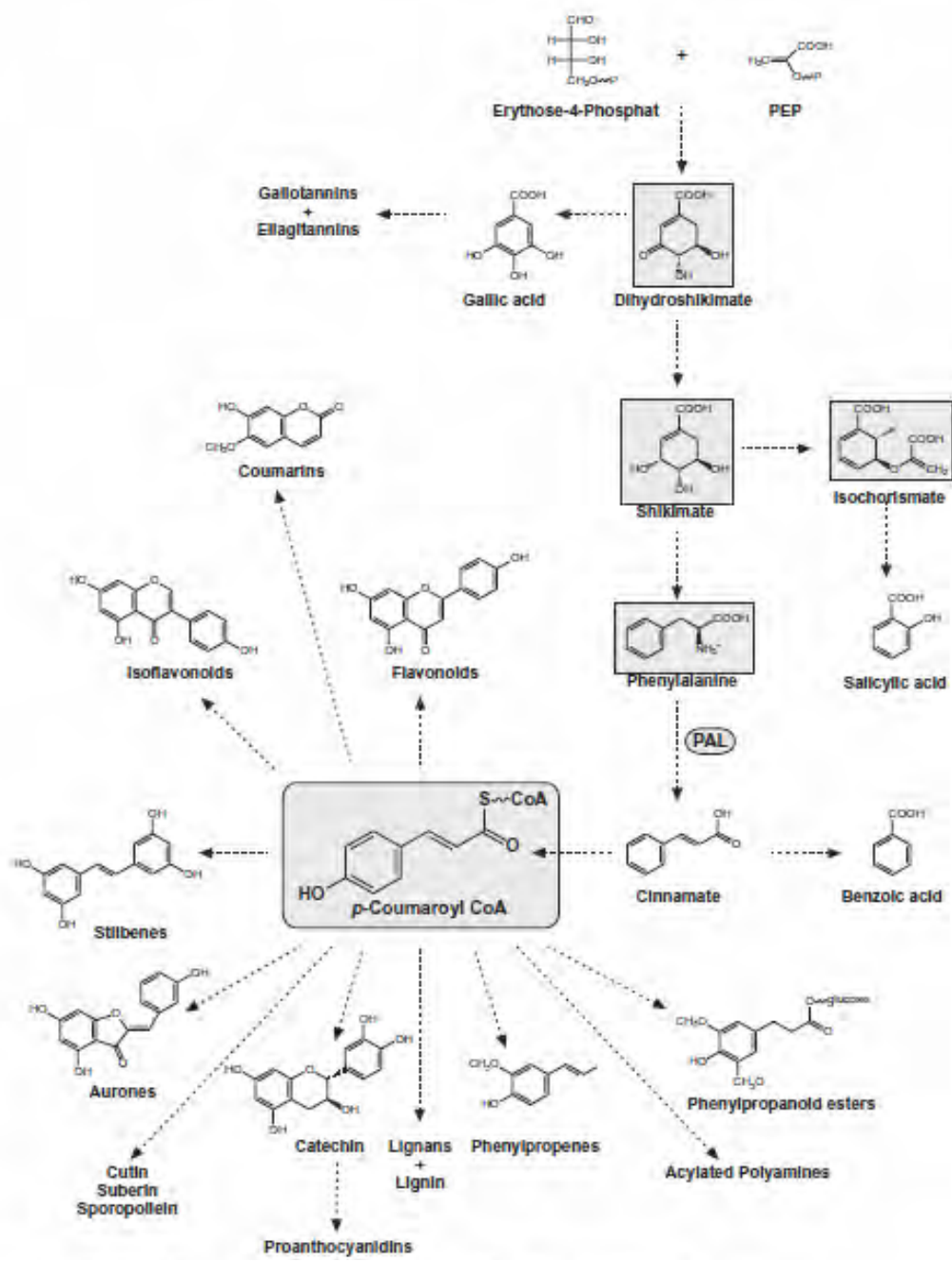


Figure I-21 : Principales voies de biosynthèse issues du métabolisme général des phénylpropanoïdes. (Vogt *et al.* 2010).

### I.3 LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES PHENYLPROPANOÏDES, ROLE DANS LA DEFENSE.

#### I.3.1 Métabolisme général des phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est une voie de biosynthèse spécifique des végétaux. Elle permet la synthèse d'un grand nombre de métabolites secondaires qui contribuent à tous les aspects de la vie d'une plante, particulièrement dans les réponses adaptatives mises en place suite à la perception de stimuli biotiques. La nature et la diversité des métabolites produits peuvent varier considérablement selon les espèces végétales. La grande majorité de ces composés dérive de la modification efficace d'un nombre peu élevé de squelettes chimiques de base (têtes de série) dérivés de la voie du shikimate (Herrmann 1995). Les lyases d'acides aminés aromatiques relient les pools de phénylalanine et de tyrosine à des voies de biosynthèse auparavant définies comme appartenant au métabolisme secondaire. Toutefois, au vu de l'importance de ce métabolisme pour la survie de la plante, la démarcation métabolisme primaire/secondaire devient obsolète (Hartmann 2007). L'acide *t*-cinnamique est le premier phénylpropane (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>, un noyau aromatique et une chaîne latérale à 3 carbones) synthétisé à partir de la phénylalanine *via* l'activité de la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL). La PAL est l'enzyme constituant le point d'entrée principal dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Deux étapes enzymatiques supplémentaires, catalysées par la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate CoA Ligase (4CL), permettent la biosynthèse du *p*-coumaroyl CoA, un composé central à partir duquel vont être synthétisées différentes familles de composés phénoliques *via* des voies de biosynthèse spécifiques (figure I-21).

La plasticité de ces voies de biosynthèse est assurée par différentes familles d'enzymes comprenant des oxygénases, des ligases, des oxydoréductases et un grand nombre de transférases (Vogt 2010). Cette diversité se retrouve également dans les fonctions biologiques de ces composés impliqués dans beaucoup d'aspects du développement (lignification, pigmentation, fertilité ou signalisation ; pour revue Hahlbrock et Scheel 1989 ; Baucher *et al.* 1998 ; Dudareva *et al.* 2004) mais aussi dans les relations symbiotiques (Mandal *et al.* 2010), la protection contre les stress abiotiques et surtout dans les réponses de défense (Dixon et Paiva 1995 ; La Camera *et al.* 2004).

En effet, les plantes sont capables d'élaborer un grand nombre de métabolites secondaires capables de conférer un avantage à la plante contre les attaques pathogènes (Dixon 2001 ; Dixon *et al.* 2002 ; Bednarek et Osbourn 2009). Parmi les processus cellulaires impliqués dans la production de métabolites secondaires de défense, la plupart des plantes sont capables (i) de réduire des acides hydroxycinnamiques en alcools (monolignols) qui seront dimérisés (lignanes) ou polymérisés dans la paroi cellulaire (lignine), (ii) d'estérifier des acides hydroxycinnamiques à des acides organiques (acide chlorogénique notamment) ou à des polysaccharides pariétaux (esters d'acide férulique), (iii) de lier des acides hydroxycinnamiques à des amines (phénolamines), (iv) de synthétiser des composés

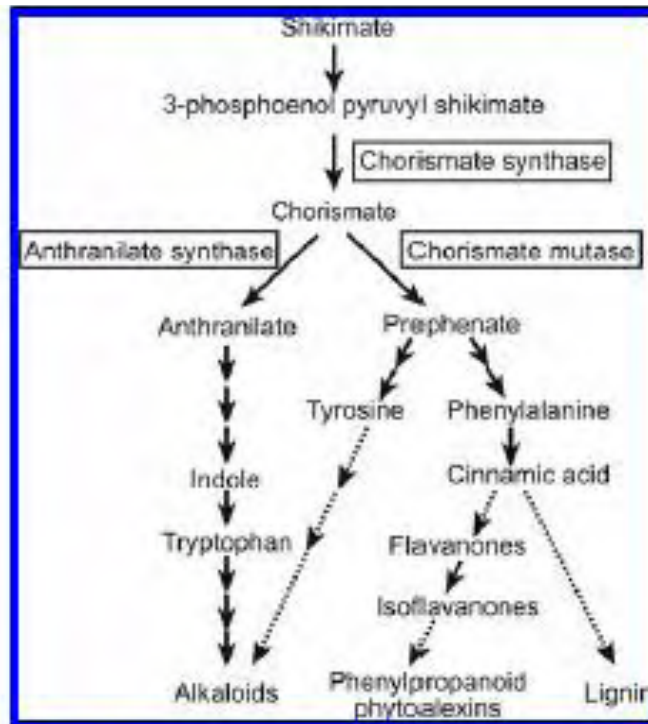


Figure I-22 : Voie du shikimate conduisant à la biosynthèse des acides aminés aromatiques. (Hu *et al.* 2009).

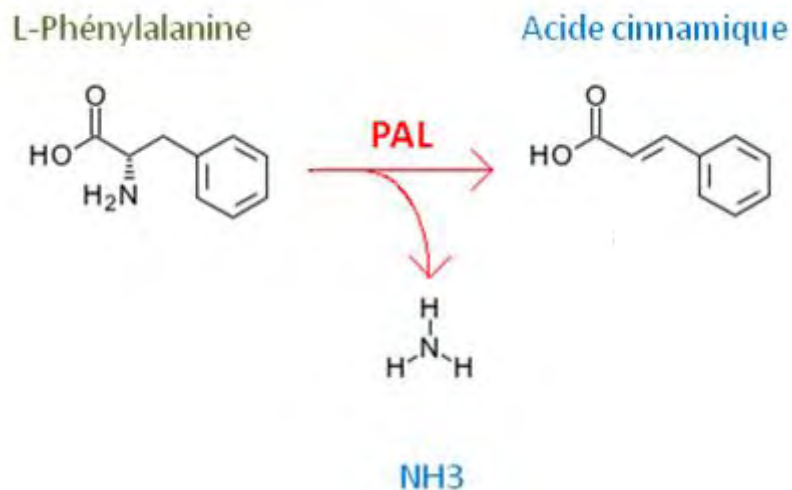


Figure I-23 : Réaction enzymatique catalysée par la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL). (<http://www.genome.jp/kegg/>).



phénoliques volatils, (v) d'allonger la chaîne à 3 carbones des phénylpropanes pour produire des structures en C15 (flavonoïdes et stilbènes), (vi) et enfin de cycliser des acides hydroxycinnamiques sur la chaîne latérale à 3 carbones pour obtenir des coumarines.

### I.3.1.1 Voie du shikimate

La voie du shikimate, spécifique des bactéries et des plantes, assure la biosynthèse des acides aminés aromatiques : la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Ces acides aminés essentiels à la synthèse protéique sont aussi les précurseurs chez les plantes des voies de biosynthèse de nombreux métabolites secondaires indoliques ou aromatiques (figure I-22). La voie du shikimate démarre par la condensation du phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate (deux composés issus du métabolisme primaire) en shikimate. Une succession d'étapes enzymatiques permet de produire le chorismate à partir duquel seront synthétisés, *via* 3 voies différentes, les 3 acides aminés aromatiques. Le tryptophane est le précurseur de nombreux composés (auxine, alcaloïdes indoliques, camalexine...) alors que la tyrosine est à la base de la synthèse de certains alcaloïdes et que la phénylalanine est le substrat de la première enzyme de la voie des phénylpropanoïdes.

Parmi les métabolites secondaires qui seront synthétisés à partir de ces acides aminés, un certain nombre sont essentiels aux réponses de défense des plantes. La voie du shikimate participe à ces réponses, non seulement *via* la synthèse des précurseurs de composés antimicrobiens ou de matériaux de renforcement de la paroi mais également en tant que déterminant de la défense. Il a ainsi pu être montré que la chorismate synthase, l'antranilate synthase et la chorismate mutase avaient une influence importante sur la pénétration de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, un champignon pathogène de l'orge (Hu *et al.* 2009). De plus, le shikimate permet la synthèse de quinate ou acide quinique. Ce composé peut être transformé en acide chlorogénique (par condensation avec de l'acide caféique), un composé essentiel de la défense des plantes face aux attaques biotiques (Matsuda *et al.* 2005 ; Leiss *et al.* 2009).

### I.3.1.2 Synthèse du p-coumaroyl CoA

#### I.3.1.2.1 Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL)

La PAL joue un rôle crucial à l'interface entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire en catalysant la déamination de la L-phénylalanine pour former de l'acide t-cinnamique (figure I-23), le squelette carbonné de base des phénylpropanes synthétisés au sein de la voie des phénylpropanoïdes. Les propriétés, l'expression, la régulation et la distribution cellulaire de la PAL ont été étudiées de façon intensive. Les gènes *PAL* ont ainsi été clonés chez de nombreuses espèces gymnospermes et angiospermes (Baucher *et al.* 1998). La PAL est une isoenzyme homo- ou hétérotétramérique (Reichert *et al.* 2009) dont les sous-unités sont codées par de petites familles multigéniques de 1 à 5

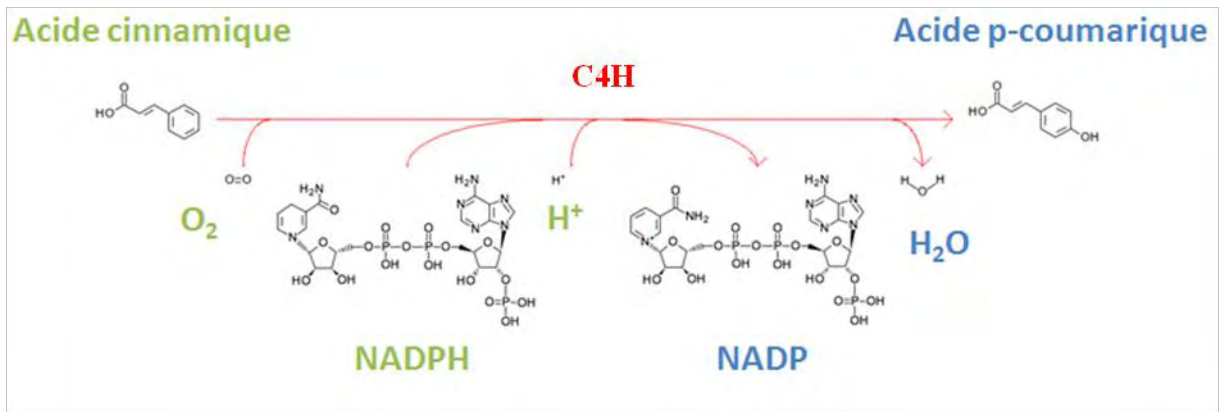


Figure I-24 : Réaction enzymatique catalysée par la Cinnamate 4-Hydroxylase.  
(<http://www.genome.jp/kegg/>).

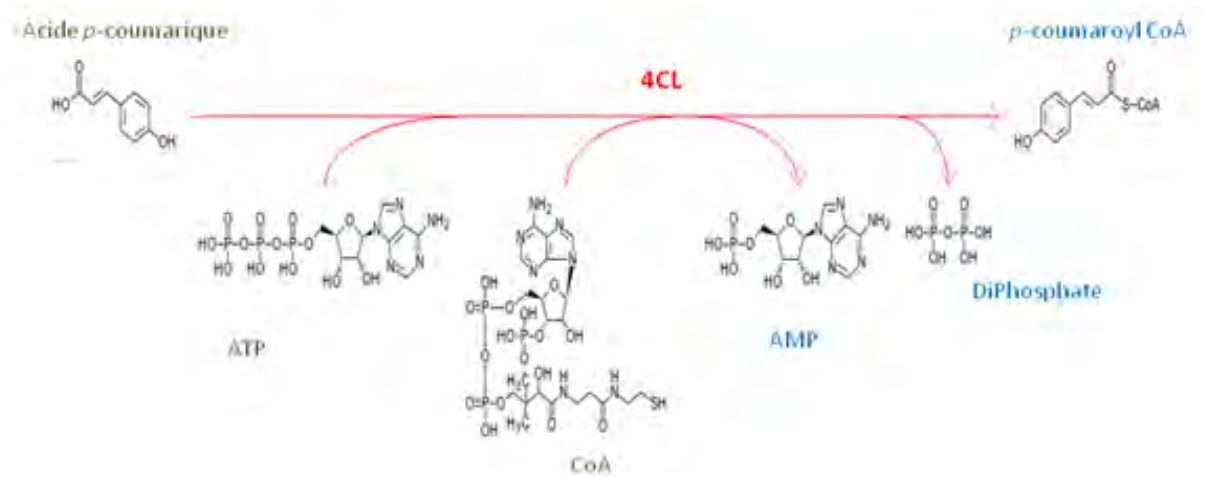


Figure I-25 : Réaction enzymatique catalysée par la 4-Coumarate CoA Ligase.  
(<http://www.genome.jp/kegg/>).

membres (Appert *et al.* 1994 ; Logemann *et al.* 1995 ; Reichert *et al.* 2009). La variété des protéines produites est supposée permettre la spécificité de réponse de la voie. Chez le haricot, les trois gènes codant la PAL sont activés par la blessure alors que seules les PAL1 et 3 sont activées en réponse à une infection fongique (Liang *et al.* 1989). Très souvent, deux isoformes de PAL coexistent, l'une étant importante pour la production de lignine au cours du développement, l'autre permettant la synthèse de tannins condensés essentiels pour les réponses de défense (Taguchi *et al.* 1998 ; Kao *et al.* 2002). Chez le tabac, 4 copies du gène *PAL* coexistent, elles appartiennent à 2 sous-familles de 2 membres chacune (Fukasawa-Akada *et al.* 1996 ; Reichert *et al.* 2009). Le gène *PAL* est régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel alors que la formation de métabolites est supposée jouer un rôle majeur dans le contrôle des flux métaboliques médiés par cette enzyme (Winkel 2004). Il a notamment été montré chez le tabac que la PAL1 était colocalisée avec la C4H au niveau de la membrane plasmique alors que PAL2 restait cytoplasmique (Rasmussen et Dixon 1999 ; Achnine *et al.* 2004). L'inhibition de la PAL perturbe la production de SA déclenchée en réponse à *Peronospora parasitica* chez *Arabidopsis* (Mauch-Mani et Slusarenko 1996) alors que chez le tabac, une telle inhibition conduit à une susceptibilité accrue vis-à-vis du TMV (Tobacco Mozaïc Virus) et de *Cercospora nicotianae* (Maher *et al.* 1994 ; Pallas *et al.* 1996). Au niveau métabolique, les changements de susceptibilité s'accompagnent d'une diminution d'acide chlorogénique et de rutine dans les feuilles (Korth *et al.* 2001).

#### I.3.1.2.2 Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H)

La C4H hydroxyle en position 4 du cycle aromatique l'acide t-cinnamique en acide *p*-coumarique (Russell et Conn 1967 ; Russell 1971 ; figure I-24). Cette enzyme, une monooxygénase à cytochrome P450, contrôle également une grande partie du flux métabolique conduisant à la synthèse des phénylpropanoïdes (Lewis et Anterola 2002). Elle possède une partie N-terminale hydrophobe permettant un ancrage à la membrane, de fait, la C4H est une enzyme exclusivement microsomale (Pierrel *et al.* 1994 ; Ro *et al.* 2001 ; Achnine *et al.* 2004). Les gènes codant la C4H ont pu être clonés chez de nombreuses espèces (notamment Farhendorf et Dixon 1993 ; Hotze *et al.* 1995 ; Mizutani *et al.* 1997 ; Nedelkina *et al.* 1999 ; Luo *et al.* 2001 ; Ro *et al.* 2001). Il existe deux classes distinctes de C4H et la plupart des plantes possèdent une isoforme pour chaque classe I et II, les solanacées en particulier (Ehltling *et al.* 2006). Toutefois, certaines espèces, *Arabidopsis* par exemple, ne disposent que de la classe I (Costa *et al.* 2003). Chez le tabac, de la même manière que pour la PAL, on observe une expression différentielle des deux gènes codant pour les C4H. Ainsi la C4H de classe I est induite par la blessure alors que la C4H de classe II s'exprime dans les tissus vasculaires, suggérant une spécificité de réponse pour les deux isoformes (Blee *et al.* 2001). Des tabacs transgéniques dont l'expression de la C4H est réprimée montrent une réduction de 60 à 70% de la quantité de lignine (Blount *et al.* 2000 ; Blee *et al.* 2001) mais également une accumulation bien moins importante d'acide chlorogénique et de rutine dans

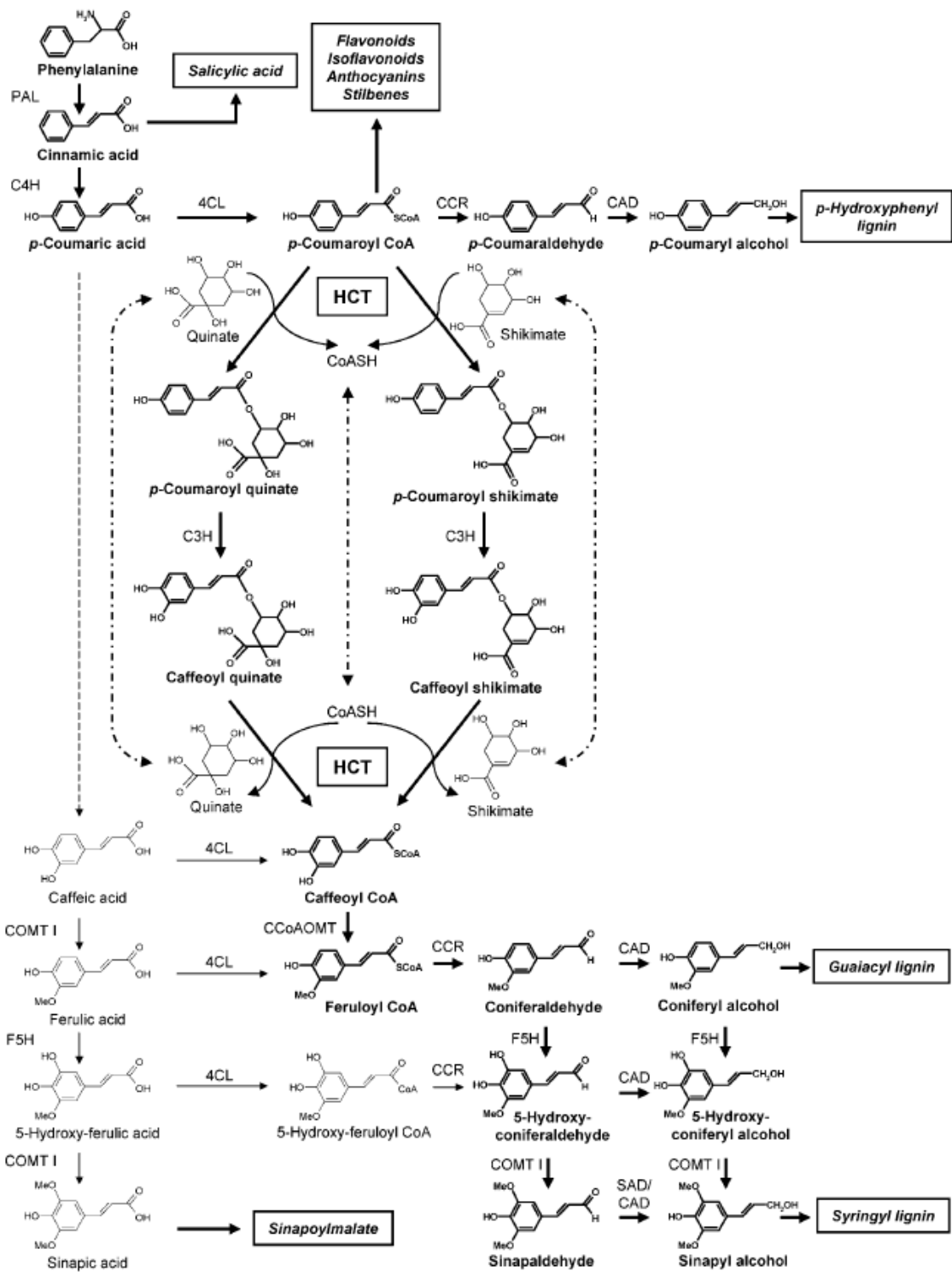


Figure I-26 : Vue générale du métabolisme des monolignols et lignines. (Hoffmann *et al.* 2004).

les feuilles transformées (Blount *et al.* 2000). D'autre part, il a pu être montré que la surexpression de la C4H chez le tabac conduisait à une élévation de la concentration foliaire en acide chlorogénique ainsi qu'à une importante augmentation de l'incorporation pariétale de dérivés d'acide *p*-coumarique (Blount *et al.* 2000). Ces résultats soulignent le rôle de la C4H comme enzyme pivot des défenses de plantes *via* des mécanismes de renforcement pariétal ou de toxification de l'apoplaste.

#### I.3.1.2.3 4-Coumarate CoA Ligase (4CL)

La 4CL catalyse la formation ATP-dépendante d'esters de CoA, principalement le *p*-coumaroyl CoA, à partir d'acides hydroxycinnamiques (figure I-25). La 4CL a pu être clonée chez de nombreuses plantes où elle est présente en petites familles multigéniques divisées en deux classes fonctionnelles (Knobloch et Hahlbrock 1975 ; Lee et Douglas 1996 ; Allina *et al.* 1998 ; Ehltling *et al.* 1999 ; Lindermayr *et al.* 2002). Chez la plupart des plantes étudiées, les analyses biochimiques effectuées sur les isoformes de 4CL ont permis de montrer des spécificités de substrat différentes, bien que le *p*-coumarate soit le substrat préférentiel, expliquant le nom générique de l'enzyme (Knobloch et Hahlbrock 1975 ; Lee et Douglas 1996 ; Hu *et al.* 1998 ; Ehltling *et al.* 1999 ; Lindermayr *et al.* 2002). La mutation d'un seul acide aminé sur la séquence protéique modifie la spécificité de substrat, expliquant ainsi la large diversité de substrat de l'enzyme (Lindermayr *et al.* 2003). De même que pour *Arabidopsis* (Ehltling *et al.* 1999), deux classes de 4CL coexistent chez le tabac, chacune d'entre elles étant caractérisée par sa spécificité de réponse selon le stade de développement ou le stimulus perçu (Lee et Douglas 1996). Chez le tabac, l'activité 4CL est détectée de façon constitutive dans le xylème mais est également stimulée par la blessure, les Aagluacan (pour  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6-glucan oligosaccharides) ou encore le MJ (Lee et Douglas 1996 ; Ellard-Ivey et Douglas 1996 ; Galis *et al.* 2006 ; Shinya *et al.* 2007). La 4CL, en produisant le 4-coumaroyl CoA, composé central des voies de biosynthèse des métabolites secondaires, est considérée comme une enzyme déterminante à la fois pour le développement de la plante mais également pour son adaptation à l'environnement biotique ou abiotique. Elle est la cible de stratégies visant à découvrir de nouvelles molécules capables d'inhiber son activité enzymatique et donc de perturber le développement et la croissance de la plante (Yun *et al.* 2006 et 2007).

### I.3.2 Métabolismes dérivés du *p*-coumaroyl CoA

#### I.3.2.1 Biosynthèse des monolignols et lignines

La biosynthèse des monolignols et la polymérisation de ces monolignols en lignines (figure I-26) permet d'assurer un certain nombre de fonctions essentielles à la plante, notamment l'imperméabilisation des cellules conductrices de sève (Jones *et al.* 2001), le maintien du port dressé de la plante (Jones *et al.* 2001) et la protection contre des attaques

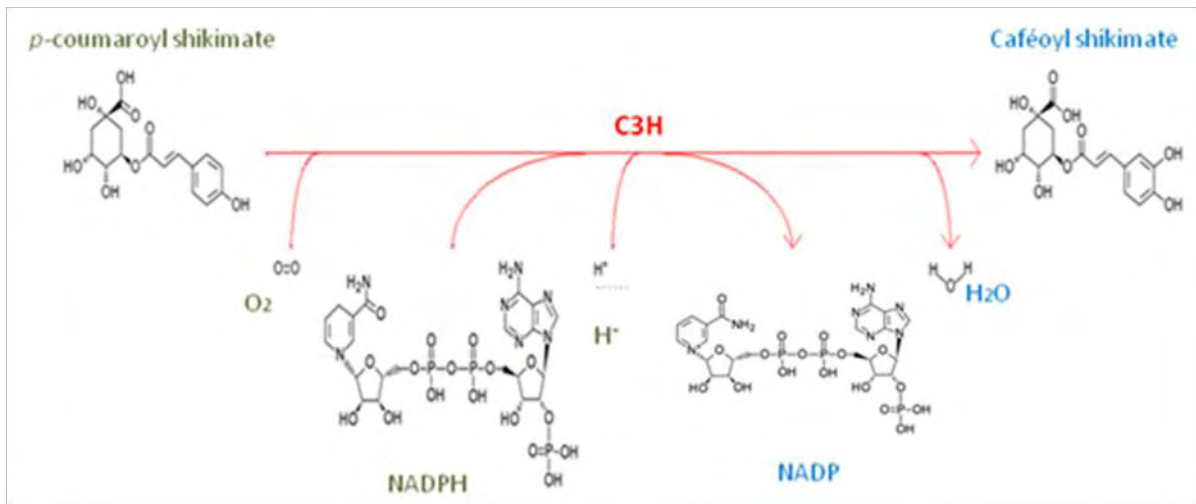


Figure I-27 : **Réaction enzymatique catalysée par la *p*-Coumarate 3-Hydroxylase.**  
 La C3H peut également accepter des esters de quinate comme substrat, permettant la formation de caféoyl quinate. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

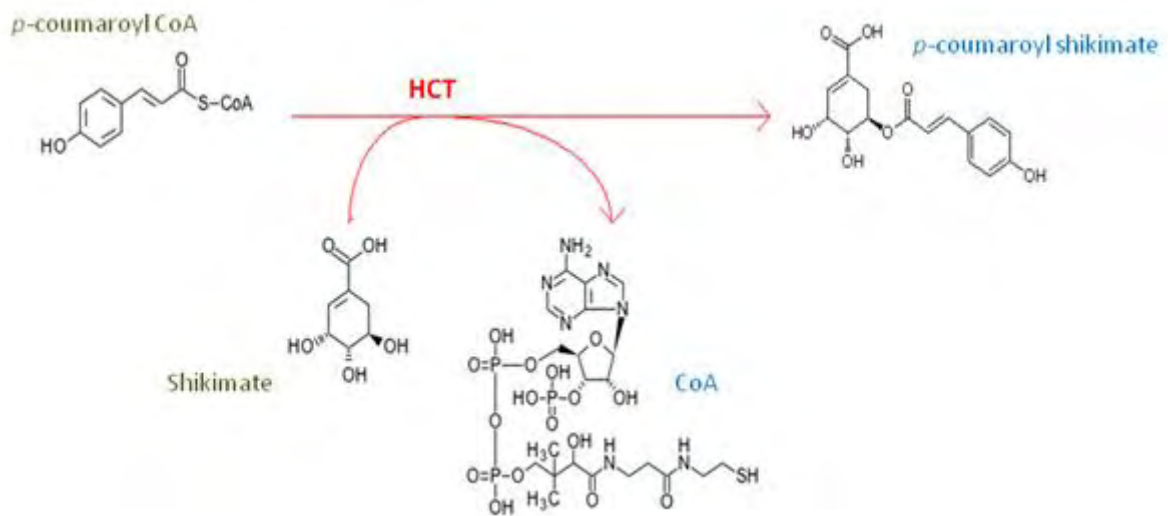


Figure I-28 : **Réaction enzymatique catalysée par l'Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxyCinnamoylTransférase.**  
 L'HCT peut également accepter le caféoyl-CoA, le féruloyl-CoA et le sinapoyl-CoA comme donneur acyl et l'acide quinique comme accepteur. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

biotiques par renforcement de la barrière physique (Franke *et al.* 2002b). Les monolignols sont des monomères d'alcool *p*-hydroxycinnamiques appelés alcool *p*-hydroxycoumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique. La polymérisation oxydative de ces monolignols conduit à la formation de polymère de lignine. Les monolignols sont synthétisés à partir de *p*-coumaroyl CoA ; les deux dernières étapes de leur synthèse passent par deux enzymes particulièrement bien étudiées au laboratoire : la Cinnamoyl CoA Réductase (CCR) et l'Alcool Cinnamylique Déshydrogénase (CAD) qui réduisent successivement les esters de CoA en aldéhydes puis en alcools. Le degré de méthylation des monomères dépend des actions successives des hydrolases, notamment la Coumarate-3-Hydroxylase (C3H) et la Férulate-5-Hydroxylase (F5H), et des O-méthyltransférases comme l'acide Caféique/acide 5-hydroxyférulique 3-O-MéthylTransférase (COMT) ou la Caféoyl-CoA 3-O-MéthylTransférase (CCoAOMT).

Les monolignols qui sont des composés toxiques ne sont pas accumulés dans la cellule. Synthétisés au niveau du Golgi, ils sont rapidement transportés vers la paroi pour y être polymérisés. La polymérisation implique probablement l'action combinée des peroxydases, des laccases, des polyphénols oxydases ou encore des alcools coniférylique oxydases (Boerjan *et al.* 2003).

#### I.3.2.1.1 Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxy Cinnamoyl Transférase (HCT) et Coumarate-3-Hydroxylase (C3H)

Bien que les acides hydroxycinnamiques libres soient des intermédiaires clés dans la voie de biosynthèse des monolignols, il est maintenant clairement établi qu'un certain nombre de conversions enzymatiques peuvent intervenir au niveau d'esters, d'aldéhydes ou d'alcool hydroxycinnamiques. Il a notamment été montré que l'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique était catalysée par la *p*-Coumarate 3-Hydroxylase (C3H), une cytochrome P450 à activité monooxygénase, dont le substrat préférentiel est constitué par le *p*-coumarate estérifié par du shikimate ou du quinate (Schoch *et al.* 2001 ; Franke *et al.* 2002a et b ; Sullivan et Zarnowski 2010 ; figure I-27). Bien que cette étape d'hydroxylation en position 3 des esters de *p*-coumarate ait été observée il y a 25 ans (Heller et Kuhn 1985 ; Kuhn *et al.* 1987), l'enzyme permettant la synthèse de ces esters n'a été cloné que récemment. Il s'agit de l'Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxyCinnamoylTransférase (HCT), une acyl-transférase qui utilise le *p*-coumaroyl CoA comme donneur acyl et l'acide shikimique ou l'acide quinique comme accepteur (Hoffmann *et al.* 2003) pour former les esters (figure I-28). De plus, cette acyl transférase est également capable de catalyser la réaction inverse à partir des esters hydroxylés en position 3 pour produire du caffeoyl CoA. Ce couple d'enzyme HCT et C3H permet donc la synthèse de caffeoyl CoA à partir de *p*-coumaroyl CoA *via* 3 étapes enzymatiques successives (figure I-26).

Des études d'immunolocalisation et de quantification de transcrits ont permis d'établir que l'expression de la C3H était constitutive dans tous les tissus de la plante, en particulier

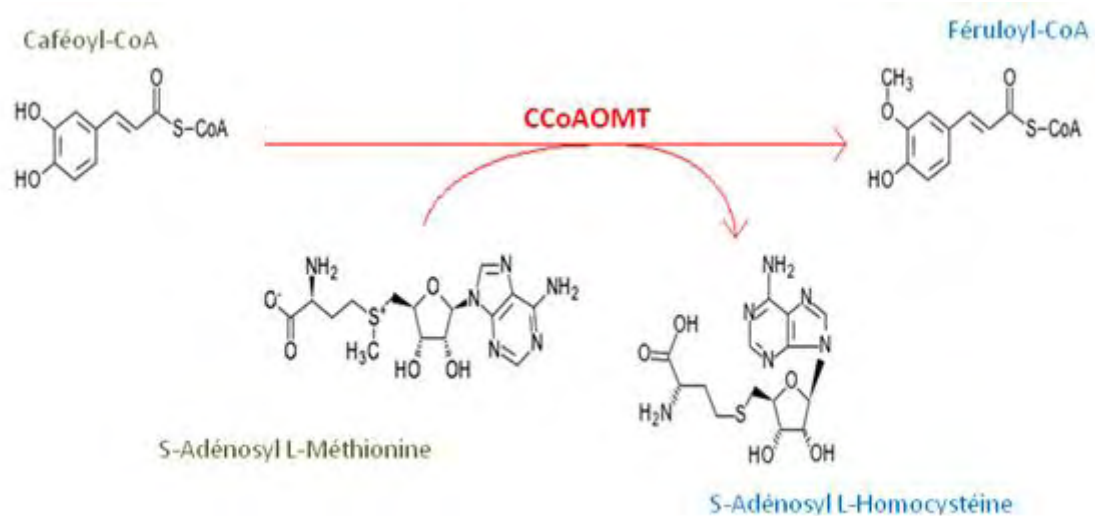


Figure I-29 : **Réaction enzymatique catalysée par la CaféoylCoA -O-MéthylTransférase.** La CCoAOMT est également capable d'utiliser le 5-hydroxyféruloyl-CoA comme substrat. (<http://www.genome.jp/kegg/>).



dans la tige d'*Arabidopsis* (Schoch *et al.* 2001). Un mutant d'*Arabidopsis* affecté dans le gène C3H, *ref8*, est affecté de manière importante dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. En particulier, il accumule des esters de *p*-coumarate plutôt que du sinapoylmalate alors que les lignines synthétisées par *ref8* sont principalement formées de monomères d'alcools de type *p*-coumaroyl, une forme normalement mineure dans la composition des polymères ligneux (Franke *et al.* 2002b). Ce phénotype est également retrouvé chez des plants de luzerne qui sous-expériment la C3H (Ralph *et al.* 2006). Par ailleurs, l'expression de la C3H est largement activée par la blessure chez *Arabidopsis* (Schoch *et al.* 2001 ; Nair *et al.* 2002) alors que le mutant *ref8* est plus sensible à la colonisation fongique que des plants sauvages (Franke *et al.* 2002b).

L'expression de la HCT est particulièrement importante dans tous les tissus lignifiés de plants de tabac (Hoffmann *et al.* 2004). Elle est également activée légèrement en réponse à la blessure et très fortement dans le cadre de la HR développée en réponse au TMV chez le tabac (Besseau 2007). L'activité enzymatique de l'HCT est également fortement augmentée en réponse au TMV, suggérant un rôle de cette enzyme dans les voies de défense dépendant de la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ce rôle pourrait notamment comprendre la synthèse d'acide chlorogénique, métabolite secondaire clé dans les réponses aux attaques biotiques.

#### I.3.2.1.2 Caféoyl-CoA 3-O-MéthylTransférase (CCoAOMT)

La CCoAOMT catalyse la méthylation en position 3 du cycle aromatique du caféoyl-CoA pour donner le féruloyl-CoA (figure I-29). Elle permet d'effectuer une O-méthylation sur un grand nombre de substrats de métabolites secondaires chez les plantes. La CCoAOMT utilise la S-adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle ; les substrats préférentiels de cette enzyme sont les caféoyl-CoA et le 5-hydroxyféruloyl-CoA chez le tabac, la luzerne, le pin, le lin ou encore le peuplier (Inoue *et al.* 1998 ; Martz *et al.* 1998 ; Meng et Campbell 1998 ; Li *et al.* 1999 ; Maury *et al.* 1999 ; Parvathi *et al.* 2001 ; Day *et al.* 2009). Il a été montré que la CCoAOMT forme un homodimère *via* son extrémité N-ter (Ferrer *et al.* 2005).

La CCoAOMT est codée par des familles multigéniques chez *Arabidopsis* (Zou et Taylor 1994), le peuplier (Chen *et al.* 2000) ou encore le tabac (Martz *et al.* 1998). Chez le tabac, 3 classes de CCoAOMT ont été identifiées (Maury *et al.* 1999, Pinçon *et al.* 2001), regroupant au moins 6 membres. La CCoAOMT s'exprime dans le cadre du développement de la plante (notamment Martz *et al.* 1998 ; Grimmig *et al.* 1999). Toutefois, elle a tout d'abord été identifiée comme une enzyme de défense participant au renforcement pariétal dans le cadre d'interactions plantes pathogènes ou en réponse à une blessure (Kuhnl *et al.* 1987 ; Kneusel *et al.* 1989 ; Pakusch *et al.* 1989 ; Schmitt *et al.* 1991 ; Grimmig et Matern 1997 ; Martz *et al.* 1998 ; Grimmig *et al.* 1999 ; Chen *et al.* 2000). Il a notamment été montré par des approches de RNAi que le gène CCoAOMT participait à la résistance du blé contre une attaque fongique de *Blumeria graminis* (Bhuyian *et al.* 2009). Par ailleurs, la CCoAOMT

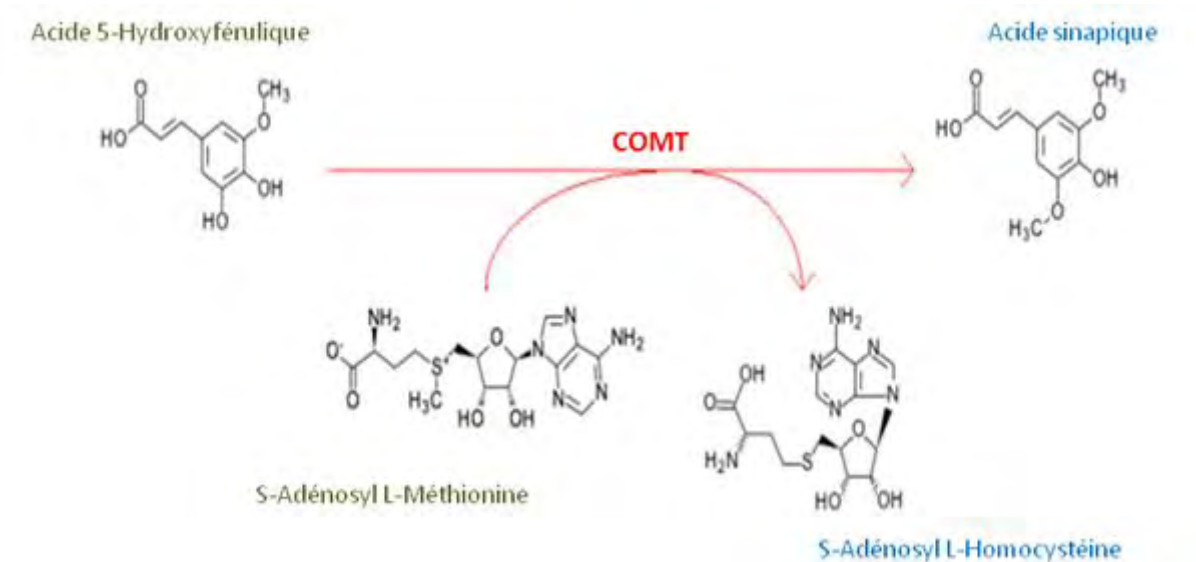


Figure I-30 : Réaction enzymatique catalysée par l'acide caféique/acide 5-Hydroxyfêrulique 3-O-MéthylTransfêrase. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

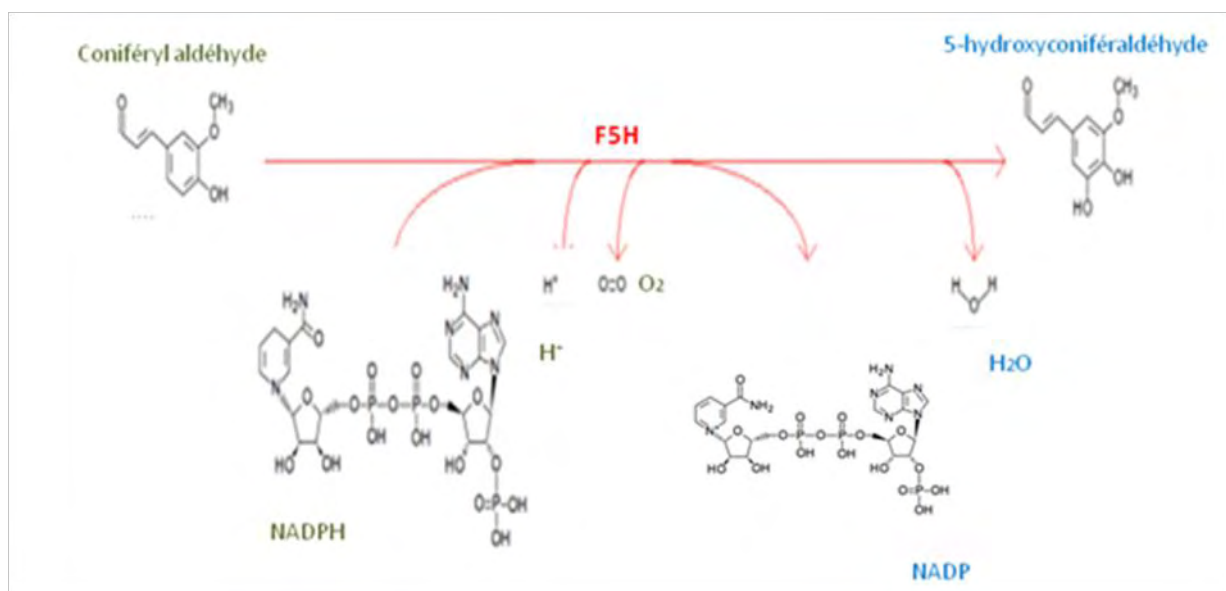


Figure I-31 : Réaction enzymatique catalysée par la Fêrulate 5-Hydroxylase. L'hydroxylation peut également être réalisée sur l'alcool conifêrylique. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

participe chez *Arabidopsis* à la synthèse de la scopolétine (Kai *et al.* 2008), une coumarine potentiellement impliquée dans les réponses de défense chez le tabac (Chong *et al.* 2002 ; Gachon *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent un rôle important de cette enzyme lors des interactions plantes-microorganismes. Elle pourrait être impliquée dans le renforcement de la paroi *via* la production de lignines défensives à base d'unités G ou S et dans la production de métabolites secondaires à activité antifongique comme la scopolétine.

#### I.3.2.1.3 acide Caféique/acide 5-hydroxyfêrulique 3-O-MéthylTransfêrase (COMT)

La COMT catalyse la seconde étape de méthylation en position 5 du cycle aromatique des phénylpropanoïdes (figure I-30). C'est une enzyme de la famille des O-méthyltransfêrases, distincte de la CCoAOMT. Les substrats préférentiels de la COMT sont le 5-hydroxyconifêraldéhyde et l'alcool 5-hydroxyconifêrylique (Humphreys *et al.* 1999 ; Li *et al.* 1999 ; Maury *et al.* 1999 ; Osakabe *et al.* 1999 ; Chen *et al.* 2001). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* : la COMT méthyle préférentiellement les formes aldéhyde et alcool et non pas les acides hydroxycinnamiques (Chen *et al.* 1999 ; Parvathi *et al.* 2001 ; Yamauchi *et al.* 2003).

Trois isoformes de COMT ont été identifiées chez le tabac (Legrand *et al.* 1976 ; Collendavello *et al.* 1983) et ont été regroupées en deux classes : les COMT I et II. La COMT de classe I s'exprime de manière constitutive dans les tissus vasculaires de nombreuses plantes où elle est plutôt associée aux processus de lignification (notamment Bugos *et al.* 1991 ; Van Doorselaere *et al.* 1993 ; Inoue *et al.* 1998) bien qu'elle soit également activée en réponse à des éliciteurs chez la luzerne (Dalkin *et al.* 1990 ; Gowri *et al.* 1991) et le maïs (Capellades *et al.* 1996) ou en réponse au TMV chez le tabac (Legrand *et al.* 1978). En revanche, la COMT de classe II semble s'exprimer spécifiquement dans les tissus racinaires et lors des réactions de défense chez le tabac (Toquin *et al.* 2003). Les deux classes de COMT semblent donc être associées à des processus physiologiques spécifiques.

Il a été montré plus récemment que des plants d'*Arabidopsis* dont l'activité COMT I a été drastiquement réduite étaient beaucoup plus sensibles à des attaques bactériennes et fongiques (Quentin *et al.* 2009). Les mutants *comt1* accumulent du 2-O-5hydroxyferuloyl-L-malate, un composé capable de stimuler la reproduction sexuée de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis*, soulignant le rôle de la COMT dans certaines interactions plantes-microorganismes.

#### I.3.2.1.4 Fêrulate 5-Hydroxylase (F5H)

La F5H catalyse l'hydroxylation en position 5 du cycle aromatique des phénylpropanoïdes (figure I-31). La F5H est un cytochrome P450 à activité monooxygénase (Grand 1984 ; Meyer *et al.* 1996). C'est une enzyme microsomale dont l'activité a été tout

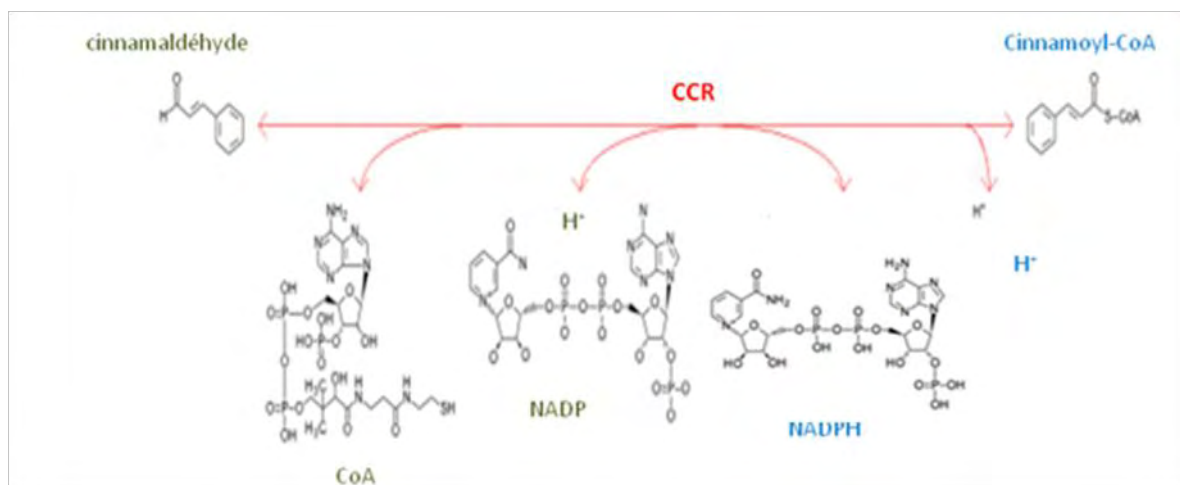


Figure I-32 : **Réaction enzymatique catalysée par la Cinnamoyl-CoA Reductase.**  
 La CCR accepte tous les esters de CoA comme substrats, avec une préférence pour le féruloyl-CoA. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

d'abord détectée dans le xylème de peuplier (Grand 1984). Le substrat préférentiel de la F5H est le coniféraldéhyde (Humphreys *et al.* 1999 ; Osakabe *et al.* 1999), bien que l'hydroxylation puisse également se dérouler sur l'alcool coniférylique (Chen *et al.* 1999 ; Humphreys *et al.* 1999 ; Matsui *et al.* 2000 ; Parvathi *et al.* 2001 ; Yamauchi *et al.* 2003).

La F5H est active dans les tiges, les racines et les feuilles (Nair *et al.* 2000). Un mutant d'*Arabidopsis* déficient pour l'expression du gène *F5H*, *fah1*, a été caractérisé par l'absence de sinapoylmalate (Chapple *et al.* 1992). La composition de la lignine de ce mutant se caractérise par une prévalence des unités G et une déficience en unités S (Marita *et al.* 1999). Des résultats similaires ont été observés chez la luzerne (Reddy *et al.* 2005), démontrant l'implication de la F5H dans la formation des dérivés sinapiques de plantes. Une étude a récemment montré que les lycophytes étaient, en plus des angiospermes, capables de synthétiser des lignines de type syringyl *via* une activité de type F5H (Weng *et al.* 2008). La surexpression dans *Arabidopsis* de cette F5H isolée chez *Selaginella* modifie fortement le métabolisme des phénylpropanoïdes, conduisant à une composition de lignine inhabituelle (Weng *et al.* 2010). En fait, la surexpression de *SmF5H* dans *Arabidopsis* mime l'activité de la HCT et de la C3H en catalysant la conversion du *p*-coumaraldéhyde ou de l'alcool *p*-coumarylique en caféoyl aldéhyde ou en alcool caféïque (Li *et al.* 2010).

La F5H est également induite par la blessure ainsi que par des traitements éthylène et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.* 2006). Malgré tout, son rôle potentiel dans les réponses de défense est relativement méconnu à ce jour.

#### I.3.2.1.5 Cinnamoyl CoA Réductase (CCR)

La CCR catalyse la réduction des esters de CoA en leur aldéhyde correspondant (figure I-32). Plusieurs études enzymatiques ont montré que la CCR chez les angiospermes acceptait tous les esters de CoA comme substrat, avec une nette préférence pour le féruloyl-CoA (Wengenmayer *et al.* 1976 ; Goffner *et al.* 1994 ; Lauvergeat *et al.* 2001 ; Baltas *et al.* 2005 ; Ma et Tian 2005). La CCR est une enzyme monomérique (Sarni *et al.* 1984 ; Goffner *et al.* 1994) dont l'ADNc a été cloné pour la première fois en 1997 chez l'Eucalyptus (Lacombe *et al.* 1997) à partir d'une banque de xylème. Elle a depuis été clonée chez de nombreuses espèces. Chez certaines, comme le tabac, il ne semble y avoir qu'un seul gène (Lacombe *et al.* 2000, O'Connell *et al.* 2002 ; Li *et al.* 2005). En revanche, chez d'autres espèces, on a pu mettre en évidence deux gènes *CCR*. Ainsi chez *Arabidopsis*, deux isoformes ont été caractérisées qui diffèrent notamment par leur profil d'expression (Jones *et al.* 2001 ; Lauvergeat *et al.* 2001). La CCR1 est impliquée dans la biosynthèse des lignines au cours du développement alors que la CCR2 est fortement induite lors d'une interaction incompatible avec *Xanthomonas campestris* (Lauvergeat *et al.* 2001). Une telle situation se retrouve également chez le panic érigé, une espèce de céréale sauvage (Escamilla-Trevino *et al.* 2010). Par ailleurs, la CCR est induite par des éliciteurs chez le lin (Hano *et al.* 2006) et le riz

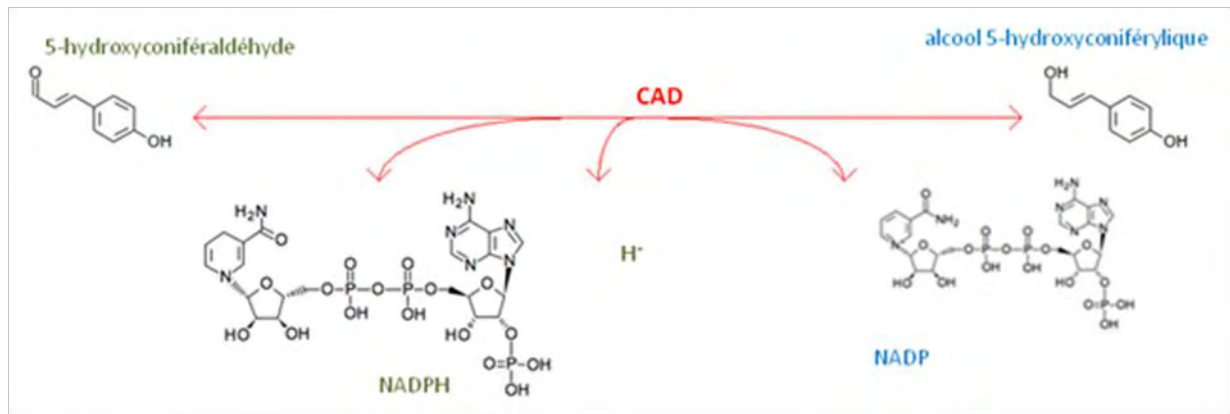


Figure I-33 : Réaction enzymatique catalysée par l'Alcool Cinnamylique Déshydrogénase. (<http://www.genome.jp/kegg/>).

(Kawasaki *et al.* 2006), suggérant une implication possible de cette enzyme dans la biosynthèse de composés de défense

Des constructions antisens permettant la sous-expression de la CCR chez le tabac ont permis de montrer une accumulation plus importante de phénols liés aux parois, y compris de la féruloyl-tyramine, de l'acide sinapique et de l'acide férulique (Piquemal *et al.* 1998 ; Ralph *et al.* 1998 ; O'Connell *et al.* 2002).

#### I.3.2.1.6 Alcool Cinnamylique Déshydrogénase (CAD) et CAD-like

La CAD permet la transformation NADPH- et  $Zn^{2+}$ -dépendante des hydroxycinnamaldéhydes en leurs alcools correspondants (figure I-33). Deux isoformes très différentes par leurs séquences et leurs structures mais possédant des activités enzymatiques semblables ont été identifiées tout d'abord chez l'Eucalyptus (Goffner *et al.* 1992) puis chez la plupart des espèces d'angiospermes. L'isoforme CAD2 (par référence à la nomenclature établie chez l'Eucalyptus) est une alcool deshydrogénase à longue chaîne et à zinc qui a été clonée en parallèle chez le tabac (Halpin *et al.* 1992) et chez l'Eucalyptus (Grima-Pettenati *et al.* 1993 ; Feuillet *et al.* 1993). C'est une enzyme homo- ou hétéro-dimérique qui accepte les 3 hydroxycinnamaldéhydes comme substrats.

L'isoforme de type CAD1 de type « short chain dehydrogenase » a été identifiée chez l'eucalyptus et le tabac (Goffner *et al.* 1992 et 1998, Damiani *et al.* 2005) et constitue une enzyme monomérique acceptant le coniféraldéhyde comme meilleur substrat.

La CAD2 est codée par de petites familles multigéniques chez les angiospermes (Boudet *et al.* 2004). Le génome d'*Arabidopsis* comprend 9 gènes codant pour des protéines CAD-like, ces gènes étant distribués en 4 classes différentes (Sibout *et al.* 2003 ; Kim *et al.* 2004). Sur ces 9 CADs putatives, la CAD-C et la CAD-D (AtCAD4 et 5) semblent être les CAD *bona fide* impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et fortement homologues aux CADs typiques dont l'activité enzymatique a pu être prouvée (EgCAD2 ; Grima-Pettenati *et al.* 1993). Des doubles mutants *cad-C/cad-D* ont été caractérisés et montrent un phénotype très sévère : une réduction de 40% du contenu en lignines de la tige et une réduction de 94% du contenu en alcool coniferylique et sinapylique (Sibout *et al.* 2003 et 2005). De manière très intéressante, il a pu être montré récemment que les gènes *CAD-C* et *CAD-D* constituaient des composants essentiels de la défense des plantes face à des souches virulentes et avirulentes de *P. syringae* (Tronchet *et al.* 2010), possiblement *via* des processus SA-dépendants. En effet, l'expression des gènes *CAD-C* et surtout *CAD-D* est activée en réponse à *P. syringae* et les mutants *cad-C*, *cad-D* et particulièrement *cad-C/cad-D* sont fortement sensibles à ce pathogène.

Un second groupe de CAD chez *Arabidopsis* comprend AtCAD1, AtCAD6 et AtCAD9, des enzymes qui ne possèdent pas d'activité CAD caractéristique et qui semblent former une sous famille de CAD-like (nommées également ELI chez le persil et le peuplier) impliquées dans les interactions plantes-pathogènes. AtCAD1 est activée par *P. syringae* (Tronchet *et al.*





2010) alors qu'IbCAD1 et ELI-3 sont des protéines CAD-like fortement homologues à CAD1 qui ont été identifiées dans le cadre de réponses de défense chez la patate douce (Kim *et al.* 2010) et le persil (Schmelzer *et al.* 1989). La diversité des CAD tant dans leurs activités enzymatiques que dans leurs spécificités de réponse indique qu'elles sont impliquées non seulement dans les processus développementaux mais également dans la synthèse d'une lignine de défense différente de la lignine classique. Ainsi, il a été montré que les unités syringyl sont préférentiellement polymérisées durant la HR chez le blé (Menden *et al.* 2007) alors que des cellules de lin élicitées par *Fusarium oxysporum* induisent une activité CAD sinapaldéhyde-dépendante (Hano *et al.* 2006).

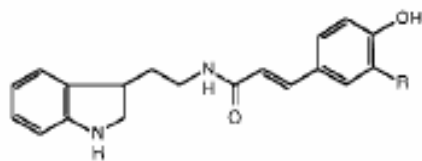
### I.3.2.2 Dérivés d'acides hydroxycinnamiques

En fonction des espèces et selon l'environnement de la plante, une partie des dérivés hydroxycinnamiques produits dans la plante peuvent s'accumuler dans la cellule sous forme d'acide chlorogénique ou de sinapoylmalate ou encore être directement estérifiés dans la paroi sans passer par des transformations conduisant à la synthèse de lignines.

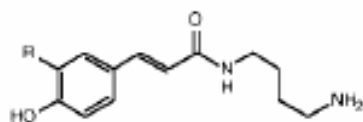
#### I.3.2.2.1 Les dérivés solubles

L'acide chlorogénique, ou acide 5-*O*-caféoyl quinique, est la forme combinée la plus répandue de l'acide caféique dans la nature. Au moins 3 autres isomères existent selon la fonction alcool de l'acide quinique qui est estérifiée par l'acide caféique. La synthèse de l'acide chlorogénique est initiée *via* au moins 3 voies différentes. Dans la première voie, l'hydroxycinnamoyl-CoA : quinate hydroxycinnamoyl transferase (HQT) catalyse la formation d'acide chlorogénique depuis le caféoyl-CoA et l'acide quinique (Niggeweg *et al.* 2004 ; Mahesh *et al.* 2007). La seconde voie est basée sur la synthèse de p-coumaroylquininate par l'HCT, suivie d'une hydroxylation par la C3H (voir aussi paragraphe I.3.2.1.1 ; Hoffmann *et al.* 2003). Les formes glucosidées du radical caféoyl pourraient servir d'intermédiaires actifs dans la troisième voie proposée (Villegas et Kojima 1986).

Le rôle de l'acide chlorogénique dans la plante n'est que partiellement connu mais il semblerait qu'il intervienne de façon prépondérante dans les réponses de défense (Shadle *et al.* 2003). Chez le tabac, il est le composé phénolique soluble le plus abondant et est considéré comme une réserve rapidement mobilisable d'un métabolite central de la voie, potentiellement modifiable en fonction des besoins de la cellule (Maher *et al.* 1994). Par ailleurs, son accumulation à proximité du site d'infection déclenchant une HR en réponse au VMT (Legrand *et al.* 1971 ; Tanguy et Martin 1972) participerait au pouvoir tampon contre les ROS libérés lors du stress oxydatif (Rice-Evans *et al.* 1997).



4-Coumaroyltryptamine (R = H)  
 Feruloyltryptamine (R = OCH<sub>3</sub>)



4-Coumaroylputrescine (R = H)  
 Feruloylputrescine (R = OCH<sub>3</sub>)

Figure I-34 : **Exemples de phénolamines.**

Couplage d'un acide hydroxycinnamique à une amine aromatique (figure du haut) ou à une amine à chaîne aliphatique (figure du bas).

#### I.3.2.2.2 Les acides hydroxycinnamiques estérifiés aux parois

Les esters de CoA semblent être la source principale d'acides hydroxycinnamiques estérifiés aux parois (Meyer *et al.* 1991). L'acide *p*-coumarique, l'acide férulique et le déhydrodiférulate sont les composés détectés le plus souvent (Iiyama *et al.* 1990). Ces composés sont liés aux polysaccharides des parois par des liaisons esters et aux polymères de lignine par des liaisons esters ou éthers (Iiyama *et al.* 1994 ; Ishii 1997). De tels réarrangements pariétaux permettent de renforcer les liens entre polysaccharides et lignine et assurent la rigidité et l'hydrophobicité de la paroi.

L'accumulation de composés phénylpropanoïdiques liés à la paroi a souvent été décrite comme participant aux réponses de défense des plantes. Il a été montré dès 1985 que des cellules de haricot élicitées par une préparation de *Colletotrichum lindemuthianum* accumulaient du matériel phénolique lié aux fractions cellulosiques et héli-cellulosiques et des acides hydroxycinnamiques libres (Bolwell *et al.* 1985). Ce matériel phénolique a pu être identifié dans des cultures cellulaires de persil élicitées par des préparations de *Phytophthora megasperma* accumulent de la vanilline, du 4-hydroxybenzaldéhyde, de l'acide férulique et de l'acide *p*-coumarique dans leurs parois (Kauss *et al.* 1993) alors qu'une forte accumulation de dérivés pariétaux d'acides férulique et *p*-coumarique a pu être observés dans plusieurs autres cas de tissus élicités ou infectés (Nicholson et Hamerschmidt 1992 ; Ikegawa *et al.* 1996 ; Keller *et al.* 1996c ; Franke *et al.* 1998). Un dépôt massif d'acides hydroxycinnamiques couplé aux renforcements pariétaux par néo-synthèse de lignine permettrait de limiter l'accessibilité des composés de la paroi aux enzymes lytiques pathogènes.

#### I.3.2.3 Biosynthèse des phénolamines

Les phénolamines sont des composés formés d'une partie phénolique dérivée d'un acide hydroxycinnamique couplée à une amine. Les phénols peuvent être l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique ou l'acide férulique alors que l'amine peut être une polyamine à chaîne aliphatique de type putrescine ou une amine aromatique de type tyramine (figure I-34). Les phénolamines constitués d'une polyamine sont solubles alors que celles constituées par les amines aromatiques sont insolubles et souvent associées à la paroi. Les phénolamines s'accumulent chez de nombreuses plantes supérieures (Martin-Tanguy 1985) et sont présentes dans de nombreux tissus (Facchini *et al.* 2002). Impliquées notamment dans le développement floral et la reproduction (Martin-Tanguy *et al.* 1978 ; Havelange *et al.* 1996), les phénolamines sont fréquemment retrouvées accumulées en forte corrélation avec une augmentation de la résistance de la plante contre une attaque pathogène (Edreva *et al.* 2007). La biosynthèse de ces composés est assurée des enzymes de type N-hydroxycinnamoyltransférase qui utilisent comme substrats les acides hydroxycinnamiques estérifiés au CoA. C'est le cas notamment des hydroxycinnamoyl-CoA Putrescine N-Hydroxycinnamoyl Transférases (PHT) qui catalysent le couplage entre la putrescine et un

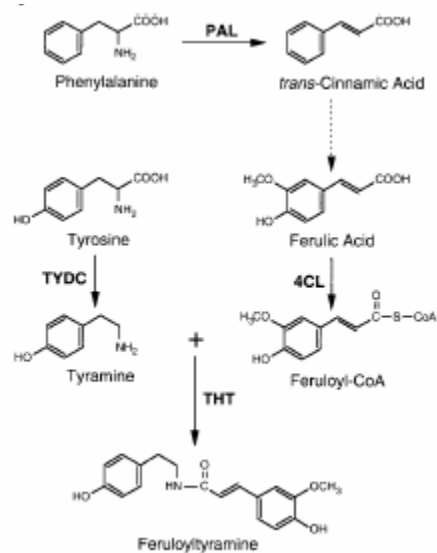


Figure I-35 : Voie de biosynthèse de la féruloyltyramine.

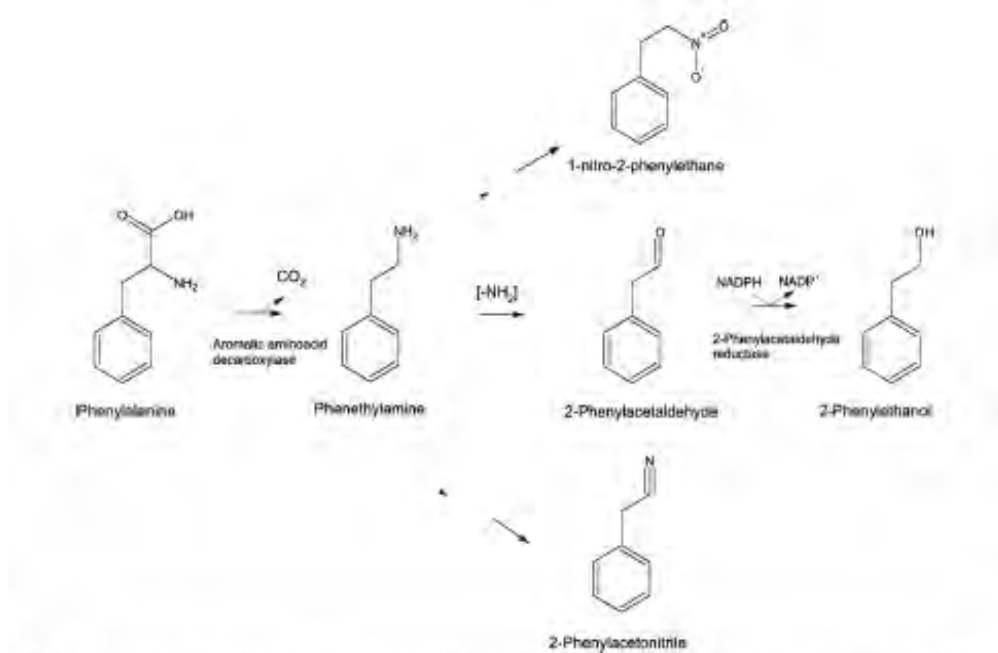


Figure I-36 : Voie de biosynthèse putative des phénylpropanoïdes volatils chez la tomate. (Tieman *et al.* 2006).

acide hydroxycinnamique estérifié au CoA (Meurer-Grimes *et al.* 1989 ; Negrel *et al.* 1992). Les PHT sont notamment responsables de la synthèse de la caféoyl- et de la féruloyl-putrescine, deux composés identifiés comme étant des marqueurs potentiels des réponses de défense induites chez des cellules de tabac BY2 (Galis *et al.* 2006) et chez *Nicotiana attenuata* (Kaur *et al.* 2010). En revanche, ces deux composés sont présents en teneur moins importante dans des tissus de pomme de terre traités par un éliciteur oligosaccharidique par rapport à leur teneur dans des tissus sains (Matsuda *et al.* 2005).

D'autres types de phénolamines participent aux réactions de défense, en particulier la féruloyl-tyramine (figure I-35) et la coumaroyl-tyramine, qui sont estérifiées sur les fonctions amines des tyrosines pariétales en réponse au VMT et participent ainsi au renforcement de la paroi cellulaire (Fleurence et Negrel 1987). Une enzyme à activité hydroxycinnamoyl-CoA Tyramine N-Hydroxycinnamoyl Transférase (THT) a été identifiée chez le tabac (Negrel et Javelle 1997 ; Farmer *et al.* 1999) et s'accumule fortement en réponse à l'élicitation et à la blessure (Farmer *et al.* 1999).

#### I.3.2.4 Biosynthèse de composés phénoliques volatils

Les plantes disposent d'un arsenal de composés volatils d'une grande diversité chimique et capables d'apporter une réponse adaptative à des stress biotiques (pour revue Dicke *et al.* 2009). Récemment a pu être caractérisée une nouvelle voie de formation de composés volatils à noyau phénylpropane (Tieman *et al.* 2006 ; figure I-36). Une petite famille de gènes a été identifiée chez la tomate, les *LeAADC* (pour Aromatic Amino acid De Carboxylase), qui codent des enzymes capables de produire du 2-phényléthanol à partir de phénylalanine (figure I-36), mais également de tyrosine. Une surexpression de *LeAADC1A* ou *LeAADC2* chez la tomate conduit à une accumulation 10 fois supérieure de 2-phenylacétaldéhyde, de 2-phényléthanol et de 1-nitro-2phényléthane (Tieman *et al.* 2006). Une phénylalanine décarboxylase a également été caractérisée chez le pétunia (Kaminaga *et al.* 2006). La fonction physiologique de ces enzymes est méconnue ; toutefois, une tyrosine décarboxylase identifiée chez le persil est activée en réponse à une préparation de *Phytophthora megasperma* (Kawalleck *et al.* 1993), suggérant un rôle potentiel de ces composés volatils dans les interactions entre plantes et microorganismes.

#### I.3.2.5 Biosynthèse des flavonoïdes et des stilbènes

Parmi les voies dérivées du métabolisme des phénylpropanoïdes, la voie de biosynthèse des flavonoïdes permet la formation de la plus large variété de métabolites, près de 9000, toutes espèces confondues (Williams et Grayer 2004). La première étape de ce métabolisme est catalysée par la Chalcone Synthase (CHS), une enzyme qui utilise le *p*-coumaroyl-CoA comme substrat sur lequel elle catalyse la condensation de 3 manonyl-CoA. La chalcone issue de cette réaction enzymatique est la structure de base des flavonoïdes,

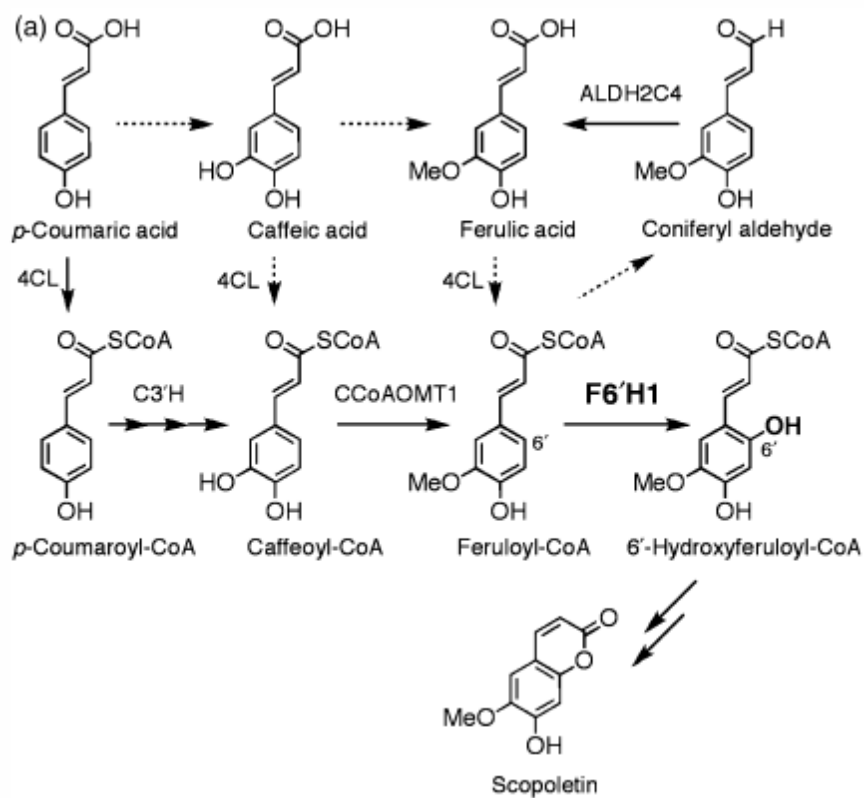


Figure I-37 : **Voie de biosynthèse des coumarines.**

La 3*p*-O-méthylation du caféoyl-CoA est principalement prise en charge par la CCoAOMT1. L'ortho-hydroxylation du féruloyl-CoA est catalysée par la F6'H1, laquelle est suivie par une trans/cis isomérisation de la chaîne latérale et une lactonisation afin de former de la scopolétine. (Kai *et al.* 2008).

laquelle va donner naissance à de très nombreuses classes qui se différencient selon les substitutions présentes sur leur cycle. Les principales classes sont les chalcones, les auronnes, les flavones, les flavonones, les flavonols, les dihydroflavonols, les anthocyanes, les proanthocyanidines et les isoflavonoïdes (pour revue Petersen *et al.* 1999 ; Winkel-Shirley 2001a et b).

Les flavonoïdes ont des rôles biologiques particulièrement variés. Ils sont impliqués dans la protection contre les UV, les interactions symbiotiques, la pigmentation, la fertilité mâle et la régulation du transport de l'auxine (pour revue Buer *et al.* 2010). Mais les flavonoïdes ont également un rôle très important dans la défense des plantes dans la mesure où certaines des phytoalexines majeures sont synthétisées *via* les flavonols (kaempférol et quercétine), les flavonones, les auronnes, les proanthocyanidines et les isoflavonoïdes (pour revue Harborne 1994 ; Feucht et Treutter 1999 ; Dixon 2001 ; Treutter 2005).

Les stilbènes sont des polyphénols constitués de deux cycles aromatiques liés par une chaîne à deux carbones portant une double liaison (C6C2C6). Ils sont synthétisés chez un petit nombre de plantes comme le pin, la vigne ou l'arachide (Vogt *et al.* 2010). Le resvératrol est le stilbène le plus répandu. Il est synthétisé par la STilbène Synthase (STS).

Les stilbènes ont un rôle très important dans la défense des plantes. Ils constituent souvent des phytoalexines dont la synthèse est activée en réponse à la perception de pathogènes chez le sorgho et le raisin (Liswidowati *et al.* 1991 ; Hain *et al.* 1993 ; Yu *et al.* 2005). Cette importance a notamment été démontrée chez le tabac. Ainsi, l'introduction du gène de la STS chez le tabac conduit à une augmentation de la résistance à *Botrytis cinerea* (Hain *et al.* 1993).

#### I.3.2.6 Biosynthèse des coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques qui dérivent des acides hydroxycinnamiques par simple cyclisation oxydative de la chaîne latérale à 3 carbones. Elles sont formées d'un cycle aromatique et d'un cycle pyrone (figure I-37). Les coumarines dérivent donc du métabolisme des phénylpropanoïdes (Brown 1962 ; Kai *et al.* 2006) ; malgré tout, leur biosynthèse est encore mal connue (Kai *et al.* 2008). Les coumarines sont distribuées dans un certain nombre de familles de plantes, notamment les Apiaceae, les Solanaceae et les Umbelliferae (Keating et O'Kennedy 1997 ; Zobel 1997). Elles sont supposées être impliquées dans les défenses des plantes dans la mesure où leur accumulation est fortement induite en réponse à de nombreux stress (Tietjen et Matern 1983 ; Hamerski et Matern 1988 ; Matern 1991 ; Shimizu *et al.* 2005) et où elles possèdent une activité antimicrobienne (Valle *et al.* 1997 ; Carpinella *et al.* 2005). Par ailleurs, il a été montré chez le tabac que le niveau d'accumulation de scopolétine (obtenu par génie génétique) et le niveau d'induction des défenses étaient positivement corrélés (Chong *et al.* 2002 ; Gachon *et al.* 2004).





## I.4 OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE ET PRESENTATION

### I.4.1 Hypothèses et objectifs des travaux de thèse

Pour survivre dans des conditions environnementales changeantes, les plantes ont développé un grand nombre de mécanismes moléculaires participant à la mise en place de réponses adaptatives spécifiques en fonction de la nature et de l'intensité des stimuli perçus. Durant l'évolution, le  $Ca^{2+}$  a émergé comme un second messager majeur et ubiquitaire chez les eucaryotes, capable de réguler un grand nombre de processus cellulaires en réponse à une multitude de stimuli internes (hormones) et externes de nature biotique ou abiotique. Parmi ces stimuli, la cryptogéine est un éliciteur peptidique sécrété par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, capable de provoquer une mort cellulaire programmée localisée ou HR et d'induire la protection du tabac contre le pathogène *Phytophthora nicotianae*. La liaison de la cryptogéine à son récepteur est suivie d'un influx prolongé de  $Ca^{2+}$  dans des cellules de tabac et la signature spécifique de cet éliciteur se caractérise par une augmentation biphasique de la concentration en  $Ca^{2+}$  cytosolique libre. Outre un grand nombre d'événements de signalisation cellulaire bien connus, la cryptogéine induit l'expression  $Ca^{2+}$ -dépendante du gène codant la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), enzyme d'entrée dans la voie des phénylpropanoïdes.

Mon travail de thèse visait (i) à mieux comprendre le rôle potentiel du métabolisme des phénylpropanoïdes dans les voies de défense activées par la cryptogéine, (ii) à étudier le couplage entre la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans ce métabolisme et la signalisation calcique, (iii) à identifier de potentiels effecteurs des voies de signalisation induites par la cryptogéine ainsi que des acteurs contribuant à la mise en place des réponses adaptatives. Des suspensions cellulaires de tabac BY-2 exprimant la sonde calcique aequorine ont été utilisées pour mener à bien ce projet.

La démarche expérimentale est basée sur les hypothèses suivantes :

*Hypothèse 1. La cryptogéine induit un remodelage du métabolisme des phénylpropanoïdes.*

Cette hypothèse s'appuie sur le fait que le métabolisme des phénylpropanoïdes permet la biosynthèse d'un très grand nombre de composés impliqués dans les réponses de défense, y compris des phytoalexines et des composés importants pour le renforcement de la paroi. Nous avons donc effectué une étude approfondie du métabolisme des phénylpropanoïdes et plus particulièrement de la voie de biosynthèse des monolignols comprenant des analyses d'expression de gènes clés, des mesures d'activités enzymatiques ainsi que des analyses quantitatives et qualitatives de composés à noyau phénylpropane.



*Hypothèse 2. Le remodelage du métabolisme phénolique est sous le contrôle du signal calcique.*

Partant du fait que l'induction du gène *PAL* en réponse à la cryptogéine était dépendante d'un influx continu de calcium, nous avons fait le postulat que le calcium pouvait être impliqué plus largement dans les modifications du métabolisme des phénylpropanoïdes induites par l'élévation des cellules. Nous avons vérifié cette hypothèse en utilisant des composés pharmacologiques capables de bloquer le signal calcique induit.

*Hypothèse 3. Induction sélective par le calcium de l'expression des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes.*

La signature calcique générée en réponse à la cryptogéine comprend différentes composantes dont un premier pic précoce et un plateau prolongé. Nous avons émis l'hypothèse que chacune de ces deux phases était capable de moduler sélectivement l'expression de gènes cibles. Cette hypothèse a pu être testée grâce à l'utilisation ciblée de composés pharmacologiques capables de bloquer le signal calcique ou d'inhiber l'activité de protéines liant le calcium.

*Hypothèse 4. La cryptogéine induit de nombreux gènes impliqués dans les réponses de défense de la plante.*

Compte tenu du peu de données disponibles sur les effecteurs des voies de signalisation induites par la cryptogéine et les acteurs des réponses adaptatives apportées par la cellule, nous avons décidé de réaliser une analyse globale des modifications du transcriptome induites, qui a permis de mettre en évidence différentes catégories fonctionnelles plus ou moins fortement impliquées dans la transduction du signal cryptogéine, ainsi que de révéler un certain nombre de cibles potentielles pour de futures études fonctionnelles.

#### **I.4.2 Présentation des travaux de thèse.**

Mes travaux de thèse sont présentés au sein de deux chapitres distincts.

Le premier chapitre est divisé en deux parties : la première est constituée d'une publication, resoumise après révision pour publication dans le journal « Plant Cell & Environnement », et la seconde rassemble des résultats complémentaires qui n'ont pas fait l'objet d'une publication. Je présente dans le premier chapitre les données obtenues sur le remodelage du métabolisme des phénylpropanoïdes par la cryptogéine. En particulier, je montre que ce remodelage est sous la stricte dépendance du calcium et conduit à l'accumulation pariétale d'acides hydroxycinnamiques. Je montre également que les



différentes composantes du signal calcique peuvent être décomposées et sont responsables de l'activation sélective de gènes clés du métabolisme des phénylpropanoïdes.

Le deuxième chapitre est constitué par un second article, prochainement soumis à publication, et présente les résultats de l'analyse transcriptomique globale du tabac. En particulier, je mets en évidence l'existence d'une modulation importante du transcriptome de tabac en réponse à la cryptogéine. Par ailleurs, je présente un certain nombre de gènes candidats susceptibles de coder des protéines clés pour l'établissement des défenses de la cellule.



**Chapitre II. REPONSES INDUITES PAR LA  
CRYPTOGEINE : ROLE DU METABOLISME  
DES PHENYLPROPANOÏDES VIA DES  
MECANISMES DEPENDANTS DU SIGNAL  
CALCIQUE.**





**Partie 1. Article 1. CRYPTOGEIN, A FUNGAL ELICITOR, REMODELS THE PHENYLPROPANOID METABOLISM OF TOBACCO CELL SUSPENSION CULTURES IN A CALCIUM-DEPENDENT MANNER.**

**Running title: Ca<sup>2+</sup>-dependent remodelling of phenylpropanoid metabolism**

**II.1.1 Avant-propos**

Les résultats présentés dans la première partie du chapitre I ont été publiés dans *Plant, Cell & Environment*.

**II.1.2 Résumé**

Les cellules de plantes utilisent des voies de signalisation calciques pour transcrire des stimuli biotiques et / ou abiotiques en réponses adaptatives. Cependant, le couplage entre signalisation calcique, régulation transcriptionnelle et processus biochimiques en aval reste méconnu. Afin de mieux comprendre ces relations, nous avons élicité des cellules de tabac BY-2 avec la cryptogéine et nous avons étudié l'impact des variations calciques induites par cet éliciteur et mesurées grâce à l'aequorine (un senseur de calcium) sur (i) les niveaux de transcrits de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes (quantifié par RT-qPCR) et (ii) sur l'accumulation de composés phénoliques (dosés en spectrométrie de masse). Nous avons ainsi montré que la plupart des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes étaient surexprimés en réponse à la cryptogéine et que des composés phénoliques s'accumulaient au niveau des parois (principalement l'acide 5-hydroxyfêrulique). Ces deux processus sont liés et dépendent de l'influx calcique induit par la cryptogéine. La régulation transcriptionnelle des gènes de la voie des phénylpropanoïdes est corrélée de manière non-linéaire avec l'intensité du stimulus et avec les différentes composantes de la signature calcique spécifique de la cryptogéine. Par ailleurs, des inhibiteurs de calmoduline augmentent la sensibilité des cellules à des concentrations faibles en cryptogéine. Ces résultats nous ont conduit à proposer un modèle de couplage entre le signal cryptogéine, la signalisation calcique et la réponse transcriptionnelle. Selon ce modèle, le calcium interviendrait dans le contrôle de la transcription *via* l'action coordonnée de deux modules de décodage calcique ayant des effets opposés.



# Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner

NICOLAS AMELOT<sup>1</sup>, AUDREY CARROUCHE<sup>1</sup>, SAÏDA DANOUN<sup>1</sup>, STÉPHANE BOURQUE<sup>3</sup>, JACQUES HAIECH<sup>4</sup>, ALAIN PUGIN<sup>3</sup>, RAOUL RANJEVA<sup>2</sup>, JACQUELINE GRIMA-PETTENATI<sup>2</sup>, CHRISTIAN MAZARS<sup>2</sup> & CHRISTIAN BRIERE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse, UPS, UMR 5546 Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France, <sup>2</sup>CNRS, UMR 5546; BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France, <sup>3</sup>UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne Plante-Microbe-Environnement, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cédex, France and <sup>4</sup>UMR CNRS 7200, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie 74, route du Rhin, F-67401 Illkirch, France

## ABSTRACT

Plant cells use calcium-based signalling pathways to transduce biotic and/or abiotic stimuli into adaptive responses. However, little is known about the coupling between calcium signalling, transcriptional regulation and the downstream biochemical processes. To understand these relationships better, we challenged tobacco BY-2 cells with cryptogein and evaluated how calcium transients (monitored through the calcium sensor aequorin) impact (1) transcript levels of phenylpropanoid genes (assessed by RT-qPCR); and (2) derived-phenolic compounds (analysed by mass spectrometry). Most genes of the phenylpropanoid pathway were up-regulated by cryptogein and cell wall-bound phenolic compounds accumulated (mainly 5-hydroxyferulic acid). The accumulation of both transcripts and phenolics was calcium-dependent. The transcriptional regulation of phenylpropanoid genes was correlated in a non-linear manner with stimulus intensity and with components of the cryptogein-induced calcium signature. In addition, calmodulin inhibitors increased the sensitivity of cells to low concentrations of cryptogein. These results led us to propose a model of coupling between the cryptogein signal, calcium signalling and the transcriptional response, exerting control of transcription through the coordinated action of two decoding modules exerting opposite effects.

**Key-words:** *Nicotiana tabacum* (tobacco BY-2); calcium signalling; modelling; transcription regulation.

**Abbreviations:** 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamylalcohol dehydrogenase; CCoAOMT, caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; COMT caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase; F5H, ferulate

5-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl CoA:quinic acid shikimate hydroxycinnamoyltransferase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase.

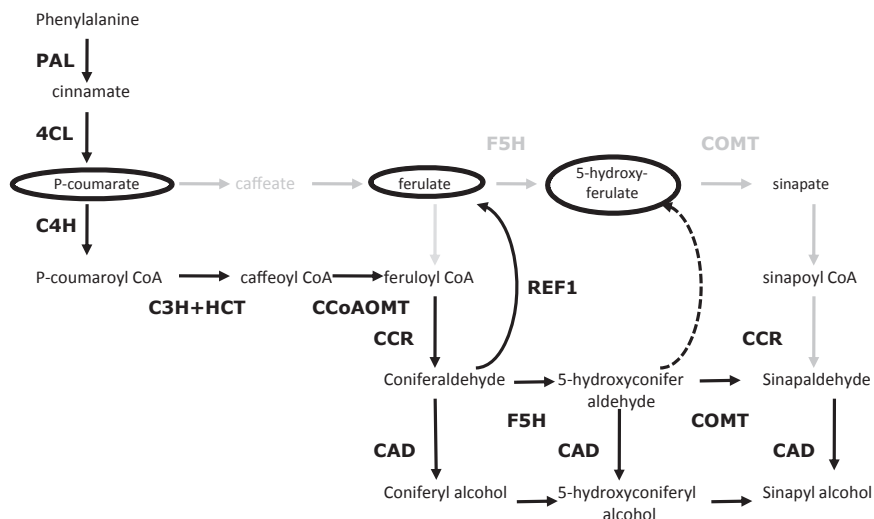
## INTRODUCTION

Plant cells use calcium-based signalling pathways to transduce a variety of external and/or internal stimuli into adaptive responses (for review, see Sudha & Ravishankar 2002; White & Broadley 2003; Hetherington & Brownlee 2004; Lecourieux, Ranjeva & Pugin 2006; McAinsh & Pittman 2009; Kudla, Batistic & Hashimoto 2010). A paradigm establishing the central role of calcium in a complex regulatory network with multiple interacting components has been inferred, at the single cell level, from the multifaceted approach used to study guard-cell physiology (Allen & Schroeder 2001; Allen *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2001; Israelsson *et al.* 2006). As a general feature, in response to variations of abiotic (light, temperature, drought, etc.) and/or biotic (symbionts, pathogens, etc.) environment including stressful conditions that plants have to face, free calcium concentration varies in cells (Ward, Pei & Schroeder 1995; Pauly *et al.* 2000; Lecourieux *et al.* 2002; Xiong *et al.* 2007). These changes control basic cellular functions including ion and molecule transport and most probably gene expression (Lecourieux *et al.* 2002; Kaplan *et al.* 2006; Kim & Kim 2006; Moscattello *et al.* 2006). Indeed, the identification of transcriptional regulators modulated by calcium and calmodulin (Kim *et al.* 2009) supports the importance of calcium in the transcriptional process during plant responses to endogenous and exogenous stimuli.

It is also interesting to note the evidence that the calcium signature itself and some of its components (e.g. amplitude, duration) are correlated to gene expression. For instance, during the establishment of symbiosis in root hairs, a correlation between the number of Ca<sup>2+</sup> spikes and the transcript level of the Early Nodulation 11 (*ENOD11*) gene was showed (Miwa *et al.* 2006). The authors suggested that a

Correspondence: C. Brière. e-mail: briere@scsv.ups-tlse.fr





**Figure 1.** Biosynthetic routes for phenolic compounds adapted from the model proposed by Nair *et al.* (2004) for *Arabidopsis thaliana*. Encircled compounds accumulate in tobacco BY-2 cell walls in response to cryptogein. Light grey arrows indicate routes that are unlikely to occur *in planta*. Dotted arrow indicates a hypothetical route for the biosynthesis of 5-hydroxyferulate (see Results section). PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl CoA:quininate/shikimate hydroxycinnamoyltransferase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase; COMT, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; REF1, reduced epidermal fluorescence1.

minimum of 36 spikes is required for *ENOD11* induction. Similarly, the shape of the calcium signal in response to salt stress was shown to be very important for the control of salt-stress genes. Using the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase loss of function mutant in the moss *Physcomitrella patens*, a sustained elevation of free calcium was observed instead of a transient elevation. This sustained level of calcium down-regulates salt-stress-induced genes, rendering the mutant plants more susceptible to salt stress (Oudeimat *et al.* 2008). These examples illustrate how the calcium-dependent processes underlying the calcium signature can control gene expression. It may thus be hypothesized that calcium, as a signal, interferes with the various steps involved in the conversion of a stimulus into a biological output. Surprisingly, little is known about the relationships linking calcium to transcriptional regulation, protein synthesis and enzyme activities, and *in fine* the remodelling of the biochemical processes downstream (Kudla *et al.* 2010).

For a better understanding of the connections between these different events and to identify critical regulatory steps (Weckwerth 2003) or signalling hubs, we took advantage of the biological model consisting of tobacco cell suspension cultures challenged with cryptogein. Cryptogein, a polypeptide elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, induces free calcium changes in the cytosol ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) in tobacco cells and enhances the transcription of the gene encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), the enzyme catalyzing the first committed step of the phenylpropanoid pathway (Lecourieux *et al.* 2002). Although this biological model has been extensively studied at different levels of the signalling pathway (Garcia-Brügger *et al.* 2006), it is still not known if other genes of the

multi-branched pathway are differentially regulated in response to cryptogein, and there are no data showing changes in enzyme activities or increases in the amounts/concentrations of phenolic compounds.

In the present paper, we made use of this simplified biological system to evaluate qualitative and quantitative changes in successive steps of elicitor-induced signalling pathways, including calcium-transient generation, transcriptional regulation and metabolism reorientation.

Our work aimed at bridging the different steps involved in the signalling pathway that converts the initial perception of cryptogein (input) into the final response (output) that consists here of the changes induced in the metabolism of phenolic compounds (Fig. 1). We reasoned that quantitative parameters and time dependence are essential to get a deeper insight into the regulatory processes and may shed light on overlooked properties. In this way, we have addressed the following questions:

- How do free calcium concentrations vary with time when cells are challenged with increasing concentrations of cryptogein?
- Are all genes coding for the enzymes of the phenylpropanoid pathway induced by cryptogein in a calcium-dependent manner?
- How does cryptogein remodel phenylpropanoid metabolism?

On these grounds we propose an integrated model that could explain key features of the input/output network linking cryptogein signal perception to gene expression through calcium signalling.

Gene	Amplicon size	upper 5'	lower 5'
<i>18S rRNA</i>	171bp	cgcgctacactgatgtattc	gtacaaagggcagggacgta
<i>PAL</i>	94bp	gacaaaagtgttcacagcaatg	aaacagatwggagaggagca
<i>PAL A</i>	228bp	cctcgtcgaccacgccttgc	taattcagctccaagtctc
<i>PAL B</i>	242bp	acacattgccacattcagca	caccattgggaccaacagcc
<i>C4H</i>	124bp	tcaacacaatggtggaatgc	actttgggacgtttggttca
<i>4CL</i>	89bp	cttctcaacctccaacatt	ctaacaacaaaagccactgga
<i>4CL1</i>	178bp	ttcttgaggttaatacagaag	gggaatttggtctcagcgg
<i>4CL2</i>	179bp	tttcttgaggttgatacaacg	ggaaatttggtcgaacagta
<i>COMT</i>	132bp	cctgcaaatgggaaggtgat	cagtcctttcttgcctcct
<i>C3H</i>	142bp	tggtgaggtgatcaagaac	tatgggaggaaggggaagtc
<i>HCT</i>	127bp	ggctgccaatccatgatgct	gcaacagattgactgccatca
<i>CCoAOMT</i>	96bp	acacctatggaatggatca	cctgttgagttccaatacga
<i>CCoAOMT 1</i>	89bp	aatttgccagctacctgttgg	ttggtgccacaaatagacgat
<i>CCoAOMT 2</i>	92bp	gaactattgtccatttgggca	acgaatgatacagaacagggga
<i>CCoAOMT 3</i>	130bp	tttacagggtagttcatggca	ggtaacatcgacaatgcaacct
<i>CCoAOMT 4</i>	102bp	cattggctgctgattctaga	aaatcctccattgcctgtaa
<i>CCoAOMT 5</i>	113bp	acgtatgattcatatttgggat	caatccttgatcaacggctagg
<i>CCoAOMT6</i>	121bp	cacatatgattcatttctgtgg	caattctgggatcagctgcaaaa
<i>F5H</i>	100bp	agcccggacaaggaagat	cccaccaagccaaggta
<i>CCR</i>	99bp	gacttctgcaaaaacaccaa	caccaaactgactcctttt
<i>CAD</i>	121bp	cagaacaagcagcacctcta	atgtgtcccactcctcctaa
<i>AADC1A</i>	209bp	cttgtgtgagagatatggca	catggctcctctatgggataa
<i>AADC2</i>	121bp	ttgatacgtgggaaagtgtgt	caccaactacaccaaggaagaa

Table S1. **Primers and amplicon sizes.**

## MATERIALS AND METHODS

### Products

Cryptogein was purified according to Bonnet *et al.* (1996) and dissolved in water as a 100  $\mu\text{M}$  stock solution. [<sup>3</sup>H]-S-adenosyl-L-methionine (specific activity 0.37 TBq mmol<sup>-1</sup>) was from MP Biochemicals (Illkirch, France) and [<sup>14</sup>C(U)]-L-phenylalanine (specific activity 6.8 GBq mmol<sup>-1</sup>) was from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). A 5 mM stock solution of native coelenterazine (Interchim, Montluçon, France) in methanol was stored at -20 °C in 10  $\mu\text{L}$  aliquots. All other compounds were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Radiolabelled trans-cinnamic acid was obtained by the enzymatic conversion of 0.185 MBq of [<sup>14</sup>C(U)]-L-phenylalanine by 0.007 units of phenylalanine ammonia lyase (Sigma-Aldrich) in Tris-HCl buffer pH 8.5 at 30 °C for 2 h. After stopping the reaction with 6  $\mu\text{L}$  6 M HCl, cinnamic acid was extracted in 2  $\times$  1 mL diethyl ether, evaporated to dryness and taken up in 50  $\mu\text{L}$  MeOH.

### Cell culture and luminescence measurements

Transgenic tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow BY-2 lines) expressing cytosolic apo-aequorin (Takahashi *et al.* 1997) were grown and processed according to Pauly *et al.* (2001). Cells harvested at late exponential growth phase were washed twice and resuspended at a density of 20% (packed cell volume) in the suspension buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MES KOH, pH 5.8), supplemented with 2  $\mu\text{M}$  coelenterazine to reconstitute active aequorin for luminescence measurements. Subsequently, cells were incubated at room temperature overnight in the dark on a rotary shaker (130 r.p.m.). Measurements of luminescence and calcium calibration were carried out as previously described (Pauly *et al.* 2001).

### Elicitor treatments

Cells in suspension medium were transferred into a glass vial and challenged with the indicated concentrations of effectors. After given times of incubation, cell aliquots were collected and filtered under vacuum on a 37  $\mu\text{m}$  mesh nylon membrane and immediately frozen in liquid nitrogen.

### Quantitative real-time RT-PCR

Tobacco BY-2 cell samples were ground in liquid nitrogen and total RNAs were isolated using the Nucleospin II RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 5  $\mu\text{g}$  total RNA in a 20  $\mu\text{L}$  reaction volume containing 50 ng random primers, 10 mM dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  RNAsOUT (40 units) and 200 units of SuperScript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 50 min at 50 °C followed by 5 min at 85 °C, cDNAs were purified

using the PCR Clean-Up system (Promega, Madison, WI, USA). Two  $\mu\text{L}$  cDNAs were used as templates in a quantitative real-time PCR assay (10  $\mu\text{L}$ ) performed on the sequence detection system ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). After an initial denaturation of 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C followed by 1 min at 60 °C were performed. Amplification specificity was checked by melting-curve analysis, and PCR efficiency was determined using standard curves constructed with serial dilutions of PCR products as templates. The 18S rRNA was used as an internal control. Quantification of expression ratios was performed according to the mathematical model developed by Pfaffl (2001). Primers and amplicon sizes are given in Table S1. In the case of multigene families, primers have been designed to hybridize either to all known genes of the class postulated to have a role in lignin biosynthesis and/or specifically to one gene member (Table S1).

### Measurement of enzymatic activities of PAL and CCoAOMT

Cell samples were ground in liquid nitrogen and weighed (approximately 2 g sample<sup>-1</sup>) before being extracted for 30 min in 4 mL of protein extraction buffer [2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DDT, antiprotease (P9599 Sigma, Sigma-Aldrich)], 10% glycerol, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5) at 4 °C under gentle shaking. After a 30 min centrifugation (10 000  $\times$  g, 4 °C), the supernatant was collected and desalted on a PD10 column equilibrated with the same buffer at pH 7.5 for CCoAOMT activity or pH 8.8 for PAL activity measurements. PAL activity was assayed by spectrophotometry. The reaction mixture (1 mL) contained 50  $\mu\text{g}$  protein extract and 1 mM L-phenylalanine (Sigma-Aldrich) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8 buffer. The formation of cinnamic acid was monitored for 10 min by measuring absorption at 290 nm, and PAL activity was determined from the slope of the absorption curve using the extinction coefficient of cinnamic acid at 290 nm = 10000 m<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

CCoAOMT activity was determined by radiometric assay. The reaction mixture contained 10  $\mu\text{L}$  of protein extract, 3.7 kBq [<sup>3</sup>H]-S-adenosyl-L-methionine, 40  $\mu\text{M}$  S-adenosyl-L-methionine, 40  $\mu\text{M}$  caffeoyl-CoA in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 (total volume 50  $\mu\text{L}$ ). After 30 min of incubation at 30 °C, the reaction was stopped with 10  $\mu\text{L}$  3 M NaOH and incubated for a further 10 min at 37 °C to allow feruloyl-CoA hydrolysis before adding 40  $\mu\text{L}$  1 M HCl to stop the reaction. Ferulic acid was extracted 10 min in 200  $\mu\text{L}$  of hexane/ethyl acetate (1:1 v/v) and 150  $\mu\text{L}$  of the organic phase was collected and evaporated overnight before the addition of 8 mL of scintillation cocktail for radioactivity counting.

### Radioactivity measurements

[<sup>14</sup>C]-cinnamic acid was added to the cells (0.007 MBq g<sup>-1</sup> fresh cells) immediately before treatment with cryptogein.





After 4 h of incubation at 20 °C in the dark and under shaking, cell aliquots were filtered under vacuum and frozen immediately. A 1 mL aliquot of filtrate was collected and transferred into a scintillation vial containing 8 mL of Ready Safe cocktail (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) to measure residual radioactivity in the medium. Frozen cell samples were weighed before grinding in 80% EtOH with glass beads (Fastprep system, MP Biomedicals, Illkirch, France). Ground cells were then extracted for 30 min at 4 °C in 5 mL 80% EtOH under gentle shaking, and centrifuged 10 min at 3000 × g. A 1 mL aliquot of supernatant was collected for measuring the radioactivity of ethanol-soluble compounds (total radioactivity). Another 1 mL aliquot of the supernatant was added to a PVPP column, which selectively complexes phenolic compounds (radioactive soluble phenolics). Radioactive non-phenolic products were recovered in the pass through (radioactive soluble non-phenolics) and the distribution of the radiolabel was calculated as: radioactive soluble phenolics = total radioactivity – radioactive non-phenolics. The remaining supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in water, and a 200 µL aliquot was collected for counting the radioactivity incorporated into the non-soluble fraction.

#### Extraction and analysis of soluble and wall-bound phenolics

Frozen cell samples were ground in liquid nitrogen, and the powder was weighed before being extracted in 5 mL 80% EtOH for 30 min at 4 °C under gentle shaking in the dark. After 10 min centrifugation at 3000 × g, the supernatant was collected for analysis of soluble phenolics. Phenolic material contained in the ethanol-insoluble fraction was extracted according to Bolwell, Robbins & Dixon (1985). The pellets were resuspended in 5 mL of 4.25 M NaOH and hydrolyzed for 6 d at 4 °C followed by 1 d at 37 °C in the dark under gentle shaking. After 15 min centrifugation at 4500 × g, the supernatant was collected, acidified to pH 1 with 12 M HCl then extracted twice in ethyl acetate. The organic phase was collected, and evaporated to dryness under N<sub>2</sub>. The residue was re-dissolved in 100 µL of water/methanol (1/1 v/v) for analysis by UPLC-QTOF using a Waters ACQUITY UPLC System (Waters, Milford, MA, USA). Separation was achieved using an ACQUITY UPLC BEH C18 column (100 mm, 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size; Waters) maintained at 40 °C, with a mobile phase flow rate of 0.30 mL min<sup>-1</sup> in isocratic mode. The mobile phase contained 32% methanol and 0.1% formic acid in water. The injection volume was 2 µL with partial loop. A time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI-MS) interface was used for mass spectrometry analysis (Micromass, Manchester, UK). Data acquisition was performed using negative ion mode over an m/z range 50–1000. The general conditions were: source temperature 130 °C, capillary voltage –2.8 kV and cone voltage 40 V, extraction cone –4 V, ion guide –1 V, the collision energy 5 eV, desolvation temperature 350 °C, desolvation flow 750 L h<sup>-1</sup>, the nebulizer 30 L h<sup>-1</sup>, and data were acquired using a scan

time of 0.5 s. Leucine-enkephalin (M–H)<sup>-</sup> (m/z 554.2615) was used for the lock mass of the lock spray. MassLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK) was used for data analysis.

Phenolic compound identification was based on comparison of retention times of commercial standards, accurate mass measurements and MS/MS fragmentation analysis (collision energy: 15 eV).

#### Statistical analysis

Statistical tests and multivariate analysis [principal component analysis (PCA)] were carried out using the R statistical software (R Development Core Team 2009).

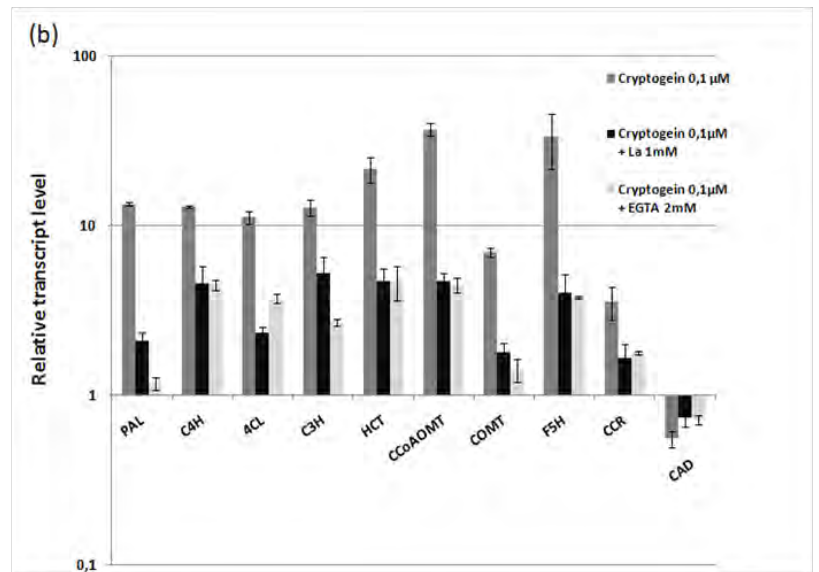
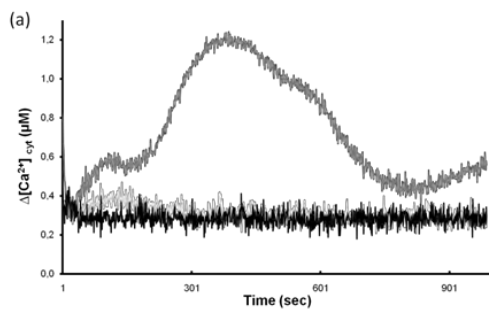
## RESULTS

### Cryptogein induces a biphasic calcium signature in tobacco BY-2 cells

Cryptogein induces biphasic calcium variations in the cytosol of BY2 cells (Fig. 2a). This response is characterized by an increase of free cytosolic calcium  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  starting as early as 2 min after elicitation, reaching a maximum after about 5 min, followed by a sustained elevation (plateau) of cytosolic free calcium lasting for more than an hour. This cytosolic calcium variation was inhibited in cells co-incubated with 1 mM La<sup>3+</sup>, illustrating the absolute requirement of an external calcium influx. The maximum calcium elevation (peak value) and the plateau value increased in a dose-dependent manner but with different EC<sub>50</sub> values (Fig. 2b). Thus, the maximum plateau value is reached for very low cryptogein concentrations (less than 100 nM), while the peak value continues to increase for cryptogein concentrations above 1 µM. Fitting a simple one-site binding model to experimental data enabled us to estimate the EC<sub>50</sub> values at 128 nM cryptogein for the calcium peak (Bmax = 0.9 µM) and to 17 nM cryptogein for the calcium plateau (Bmax = 0.1 µM), a value close to the measured K<sub>d</sub> of cryptogein binding to cell membranes (Bourque *et al.* 1999). This suggests either the existence of two cryptogein receptors, with low and high affinities, and involved in the generation of the calcium-peak or the sustained plateau, respectively, or the existence of only one type of cryptogein receptor, but interacting with two types of protein complexes with different affinities.

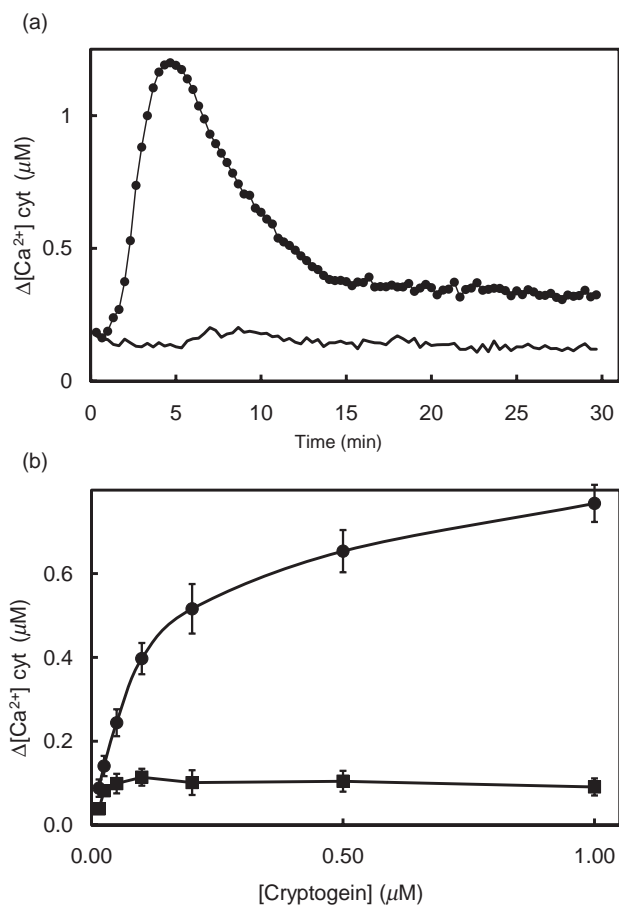
### Cryptogein strongly increased the number of transcripts of genes of the common phenylpropanoid biosynthetic pathway

We measured the transcript levels of genes encoding enzymes involved in the synthesis of phenylpropanoids and lignin (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *HCT*, *C3H*, *COMT*, *CCoAOMT*, *F5H*, *CCR* and *CAD*), as well as of three genes known to be involved in defence responses: *HSR203J*, a cell death response marker (Pontier *et al.* 1994), and two PR genes, *PR1* and *PR3* (Ward *et al.* 1991). Transcript levels in tobacco



**Figure S1. Comparison between lanthanum chloride and EGTA pre-treatments on cryptogein-induced phenylpropanoid genes expression in tobacco BY-2 cells.**

(a) Time course of cytosolic calcium variation in response to 0.1 μM cryptogein in the absence (dark grey trace) or presence of either 1 mM La<sup>3+</sup> (black trace) or 2 mM EGTA (light grey trace). Data show one representative experiment out of three. (b) Relative transcript levels assessed by RT-qPCR in cells treated for 3 hours with 0.1 μM cryptogein in the absence (dark grey bars) or presence of either 1 mM La<sup>3+</sup> (black bars) or 2 mM EGTA (light grey bars). Transcript levels are expressed as means ±SE (n=3) of transcript ratios relative to control cells (H<sub>2</sub>O treatment).



**Figure 2.** Cryptogein-induced calcium signatures in tobacco BY-2 cells. (a) Time-course of calcium variation in BY-2 cells induced either by H<sub>2</sub>O (trace) or cryptogein (1  $\mu M$ , bullets) (data from one representative experiment). (b) Dose-dependence of (l) peak value and (n) plateau value (means  $\pm$  SE of three independent experiments).

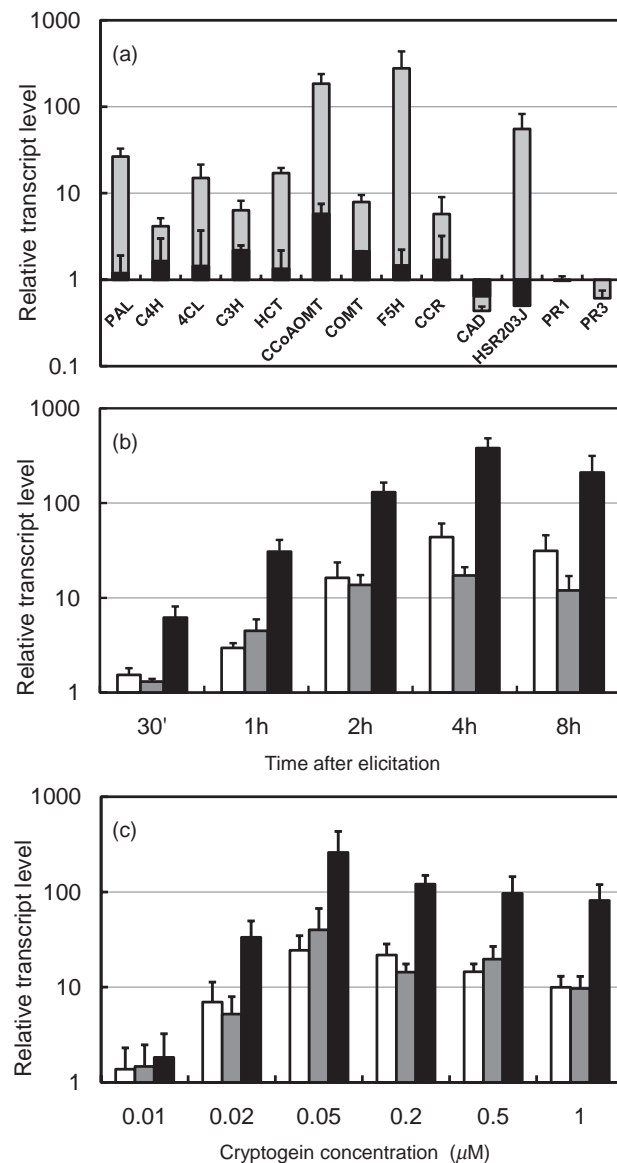
BY-2 cells were measured using RT-qPCR after treatments of cells with various concentrations of cryptogein (from 10 nM to 1  $\mu M$ ) and different durations (from 30 min to 8 h). The ratios of transcript levels in treated cells to that in control cells are presented in Fig. 3.

After a cryptogein treatment of 3 h, the transcript levels of the majority of the genes tested were strongly enhanced, but to different extent, ranging from fourfold for *C4H* to about 200-fold for *CCoAOMT* and *F5H*. In the core pathway, *PAL*, *C4H* and *4CL* transcript accumulation was increased on average by 26-, 4- and 15-fold, respectively. In contrast, transcript accumulation of *CAD*, the last gene of the monolignol biosynthesis pathway, was decreased by about twofold. Interestingly, cryptogein had no effect on the transcription of the two defence marker genes (*PR1* and *PR3*) while the expression of the cell death response marker *HSR203J* was strongly up-regulated (55-fold on average).

Transcript accumulation of tested genes was strongly inhibited when cells were challenged with cryptogein in the presence of 1 mM La<sup>3+</sup>, a calcium channel blocker (Fig. 3a),

or in the presence of the calcium chelator EGTA (Fig. S1), showing that calcium influx was required for the transcriptional response.

*De novo* synthesis of proteins was also required to allow the transcriptional response to cryptogein, as shown by its complete suppression by a 30 min pretreatment of the cells with cycloheximide prior to the addition of cryptogein (Fig. S2).



**Figure 3.** Effects of cryptogein on transcript accumulation of phenylpropanoid genes in tobacco BY-2 cells. (a) Relative transcript levels of genes of phenylpropanoid in cells challenged for 4 h with 0.1  $\mu M$  cryptogein in the absence (grey) or presence (black) of 1mM La<sup>3+</sup>. (b) Time-course of *PAL* (white), *HCT* (grey) and *CCoAOMT* (black) transcript accumulation induced by 0.1  $\mu M$  cryptogein. (c) Dose-dependence of transcript levels of *PAL* (white), *HCT* (grey) and *CCoAOMT* (black) on a 4-hour cryptogein treatment. Transcript levels assessed by RT-qPCR are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ) of transcript ratios relative to control cells (H<sub>2</sub>O treatment).

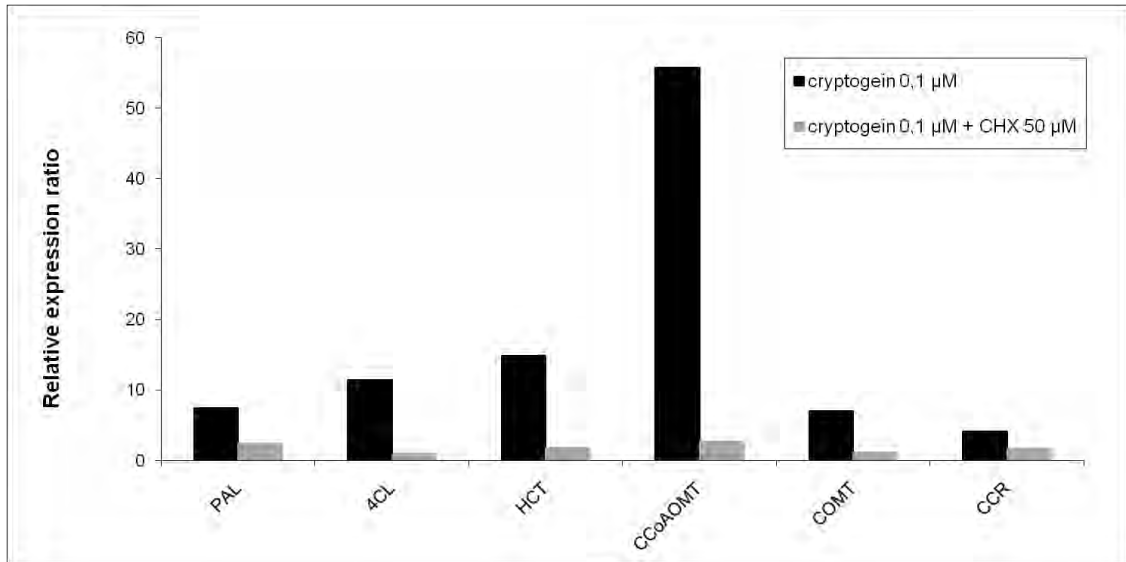


Figure S2. **Effect of a cycloheximide pre-treatment on the cryptogein-induced accumulation of phenylpropanoid gene transcripts.**

Transcript levels were assessed by RT-qPCR in tobacco BY-2 cells treated for 3 hours with 0.1 µM cryptogein. Relative transcript levels are ratios of transcript numbers assessed in treated cells to those of CHX only-treated cells. Grey bars: cells pre-incubated during 30-minutes with 50 µM cycloheximide before cryptogein treatment, black bars: cells treated with cryptogein only (data from one experiment).

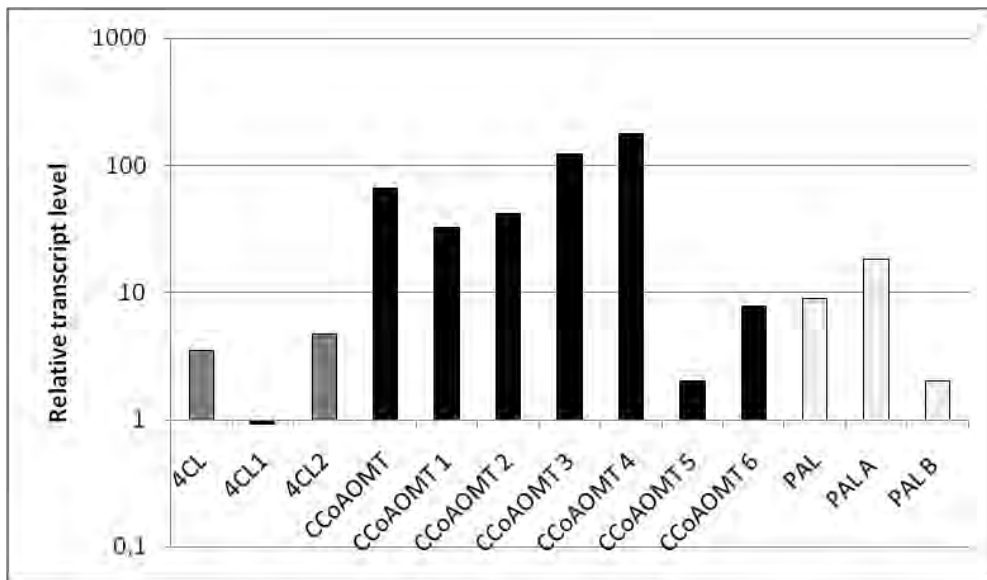


Figure S3. **Relative transcript levels of genes coding for PAL, 4CL and CCoAOMT isoforms.**

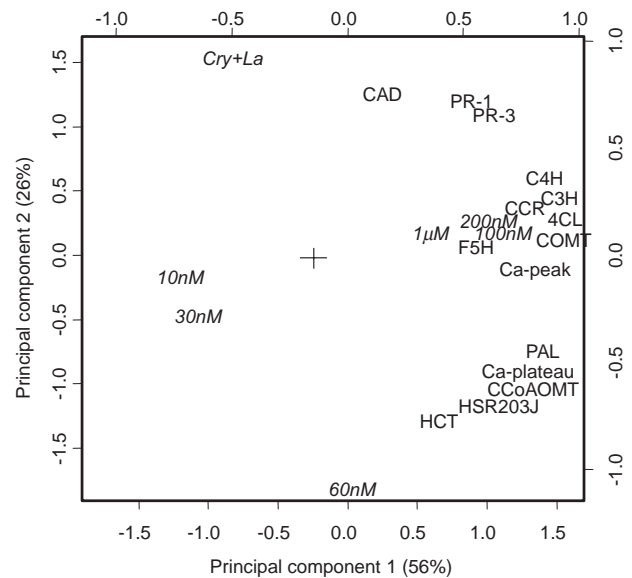
Transcript levels were assessed by RT-qPCR in tobacco BY-2 cells treated for 3 hours with 0.1 µM cryptogein. Relative transcript levels are ratios of transcript levels assessed in treated cells versus transcript levels obtained in control (H<sub>2</sub>O treated) cells (data from one representative experiment of two).

Because many genes of the phenylpropanoid pathway belong to small gene families, we examined transcript accumulation in response to cryptogein for each known isoform of three strongly induced genes. For PAL and 4CL, only the expression of one gene member was up-regulated, PAL A and 4CL2, respectively. Transcript levels of *CCoAOMT* genes were highly and equally up-regulated upon cryptogein treatment except *CCoAOMT5* which was only weakly activated in comparison with the other family members (Fig. S3). These data show that the intensity of the transcriptional response within a gene family may be specific either for a particular gene or for a set of genes.

The magnitude of the transcriptional response to cryptogein increased with time and depended upon the intensity of the stimulus. As exemplified with *PAL*, *CCoAOMT* and *HCT*, the transcript levels of the most activated genes increased after the cryptogein treatment as early as 30 min and continued increasing for several hours (Fig. 3b). Different induction kinetic patterns were observed depending on the gene considered. Transcript levels of some genes like *CCoAOMT* reached a maximum after 4 h of treatment then decreased, while transcripts of other genes like *COMT* and *HSR203J* continued to accumulate for 8 h.

Furthermore, the intensity of the transcriptional response was strongly dependent upon the intensity of the stimulus (Fig. 3c). Similar dose-response curves were observed for the different genes of the phenylpropanoid pathway, showing a strong correlation between these genes in terms of dose dependence. Dose-response curves were non-linear and biphasic: the effect of cryptogein began to be significant at 20 nM, reached a maximum between 50 and 100 nM (depending on the gene considered), and then decreased fairly sharply while increasing the cryptogein concentration (Fig. 3c). As observed for the kinetic patterns, differences in the dose-response curves were observed between genes.

Thus, in order to analyse the correlations between gene transcript ratios in dose-response experiments, we performed a PCA of the correlations between kinetic data obtained for all studied genes. Briefly, this multivariate analysis allows representing the correlations between variables and/or the proximities between observations on planes graphically, with a minimal loss of information. 'Calcium-peak' and 'Calcium-plateau' values measured at different concentrations of cryptogein were included in this analysis in order to analyse the correlations between transcript ratios and these two characteristics of the calcium signature. This analysis led to the definition of two groups of up-regulated genes in addition to the group formed by *CAD*, *PR1* and *PR3* that are not up- or even down-regulated (Fig. 4). The first group (*4CL*, *C4H*, *C3H*, *COMT*, *F5H*, *CCR*) is correlated with the 'Ca-peak' variable and is co-localized with observations made at 100 nM, 200 nM and 1  $\mu$ M cryptogein. It corresponds to genes whose transcript accumulation reached a maximum for cryptogein concentrations above 100 nM. The second group (*PAL*, *HCT*, *CCoAOMT* and *HSR203J*), correlated to the 'Ca-plateau' variable, corresponds to genes whose activation was maximal at 60 nM cryptogein and then decreased for higher concentrations.



**Figure 4.** Principal component analysis. Analysis of transcription ratio data plus calcium-peak and calcium-plateau values from dose-response experiments. Symbols 10nM to 1  $\mu$ M represent the cryptogein concentration used in experiments. Cry + la = Co-treatment with  $\text{La}^{3+}$ . Planes defined by the first two principal components are displayed.

### Cryptogein-induced enhancement of transcription correlates with increased activities of enzymes of the phenylpropanoid pathway

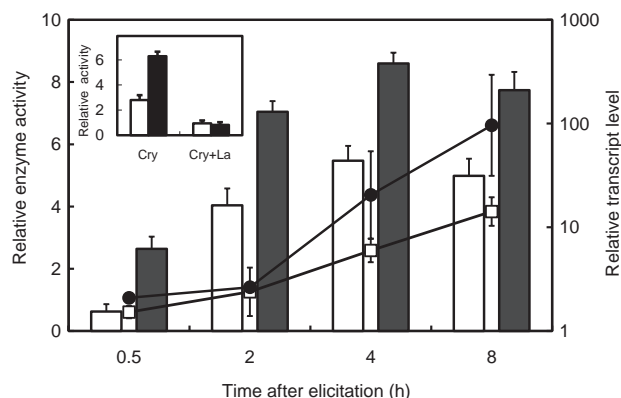
In order to evaluate whether transcriptional activation was correlated with the activation of the corresponding enzymes, we assayed the enzymatic activities of PAL and *CCoAOMT* whose corresponding genes were among the most activated. These activities were strongly increased (2.5 $\times$  for PAL, 6 $\times$  for *CCoAOMT*) in BY2 cells challenged with 0.1  $\mu$ M cryptogein for 4 h as compared with control cells (Fig. 5). These increases were totally inhibited when the cells were treated by 1 mM  $\text{La}^{3+}$  (Fig. 5 inset). A kinetic study showed that the cryptogein-induced increase of these enzyme activities began as early as 30 min after elicitation for *CCoAOMT* (2 h for PAL) and increased continuously during the whole experiment (8 h). This continuous increase is consistent with the increases in transcript levels of the corresponding genes (Fig. 5), indicating that cryptogein-induced enhancement of transcript accumulation resulted in an increase of enzymatic activities.

### Cryptogein induces accumulation of cell-wall associated phenolic compounds

From the said results, we reasoned that the distribution of phenolics (metabolic remodelling) might be significantly altered in cells challenged with cryptogein. To address this question, cells were fed with [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-cinnamic acid and incubated with cryptogein. After 4 h of incubation, the cell

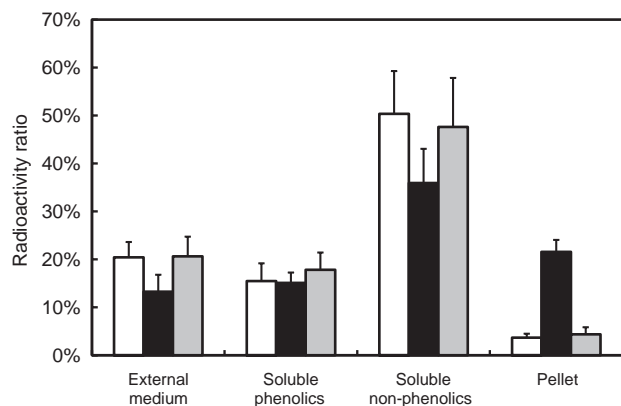






**Figure 5.** Time course of relative enzymatic activities of PAL and CCoAOMT. Activities were measured in total protein extracts from cells challenged with 0.1  $\mu\text{M}$  cryptogein: PAL (white squares) and CCoAOMT (black circles). Bars: relative transcript levels of CCoAOMT (black bars) and PAL (white bars). Inset: Effect of 1 mM  $\text{La}^{3+}$  on PAL and CCoAOMT activities measured after a 4-h treatment. Enzyme activities are expressed relative to control cells ( $\text{H}_2\text{O}$  treatment). Means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

suspension was filtered and radioactivity was measured in different fractions: external medium, phenolic soluble fraction, non-phenolic soluble fraction and insoluble fraction (containing insoluble phenolics). Compared with control cells, cryptogein-treated cells showed a slight decrease of residual radioactivity in the external medium and in the soluble fraction containing non-phenolic compounds (including radiolabelled free cinnamic acid), but an increase in the insoluble fraction (Fig. 6). The variations of radioactivity in the different fractions were inhibited by 1 mM  $\text{La}^{3+}$ , suggesting that, in line with what we showed for gene expression and enzymatic activities, the putative remodelling of phenolic metabolism is a calcium-dependent process. The decrease of radioactivity observed in the soluble non-



**Figure 6.** Distribution of radioactivity in tobacco BY-2 cell suspensions incubated for 4 h with [<sup>14</sup>C(U)]-cinnamic acid. At  $t = 0$  h, cells were treated with water (control, white bar), 0.1  $\mu\text{M}$  cryptogein (black bar) or 0.1  $\mu\text{M}$  cryptogein + 1 mM  $\text{La}^{3+}$  (grey bar). Relative radioactivity is expressed as the ratio of the activity measured in one compartment over the total radioactivity added to the cell suspension. Means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

**Table 1.** Cryptogein effect on the accumulation of insoluble phenolic compounds in tobacco BY-2 cells

Phenolic compound	Ratio (mean $\pm$ SE)	<i>P</i> value
<i>p</i> -coumaric acid	3.3 $\pm$ 1.0	0.04
ferulic acid	1.9 $\pm$ 0.3	0.05
5-hydroxyferulic acid	184 $\pm$ 112	0.005
4-hydroxybenzaldehyde	1.8 $\pm$ 0.3	0.06

For each compound, ratio between treated versus control cells was calculated based on their relative amounts measured by MS/MS. Data are means and standard errors from four independent experiments. Paired-*t*-test was used for statistical comparisons between amounts (Log transformed).

phenolic fraction and the concomitant increase measured in the insoluble fraction in response to cryptogein strongly suggest an accumulation of phenolics in the cell walls.

In order to identify these insoluble phenolic compounds, cell wall pellets were hydrolyzed with NaOH in order to release associated esterified phenolics that were further analysed by MS/MS. Intermediate compounds of the 'core' phenylpropanoid pathway were found to be significantly increased in cryptogein-treated samples as compared with controls, that is, *p*-coumaric acid, ferulic acid and 5-hydroxyferulic acid which was found only as traces in control samples but at a high level in cryptogein-treated cells. In addition, a small increase in 4-hydroxybenzaldehyde was also observed in treated cells (Table 1).

### Calcium controls the cryptogein-induced response

The data reported previously are consistent with the existence of non-linear relationships between different steps of cryptogein signalling in tobacco cells and highlight the crucial role of the steps associated with the generation of the calcium signature. They further suggest the possible coexistence of regulatory modules differing in their sensitivity to calcium and/or effector concentration, and able to modulate the response at the transcriptional level. These results raise questions on the respective roles of the two phases of the cryptogein-induced calcium signature and on the potential involvement of calcium sensor proteins.

To address these questions, we disturbed the cryptogein-induced response either by modulating the calcium response at a key step of the time course, or by using inhibitors of calcium-sensor proteins, and we further investigated the effects of these perturbations on the transcript levels of representative genes.

### Sustained calcium elevation plays a key role in the cryptogein-induced response

In order to determine the relative importance of the transient peak and of the sustained phase of calcium elevation (plateau) in cryptogein-induced transcriptional regulation, we applied 1 mM  $\text{La}^{3+}$  either just before the cryptogein

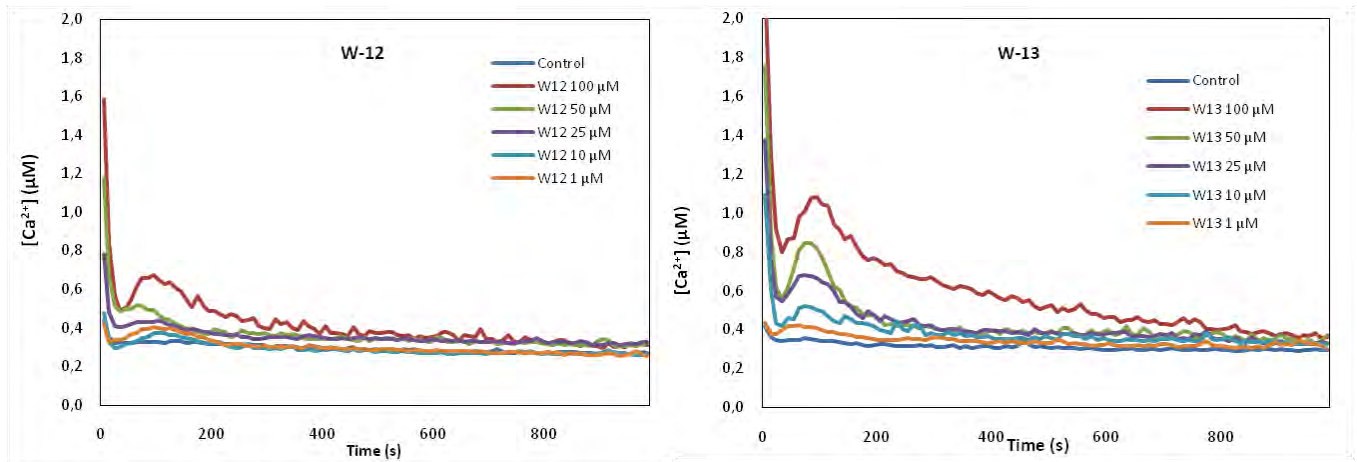


Figure S4. Cytosolic calcium variations induced in tobacco BY-2 cells by calmodulin interactors.

W12 (low affinity,  $K_d = 250\mu\text{M}$ ) and W13 (high affinity,  $K_d = 50\mu\text{M}$ ).

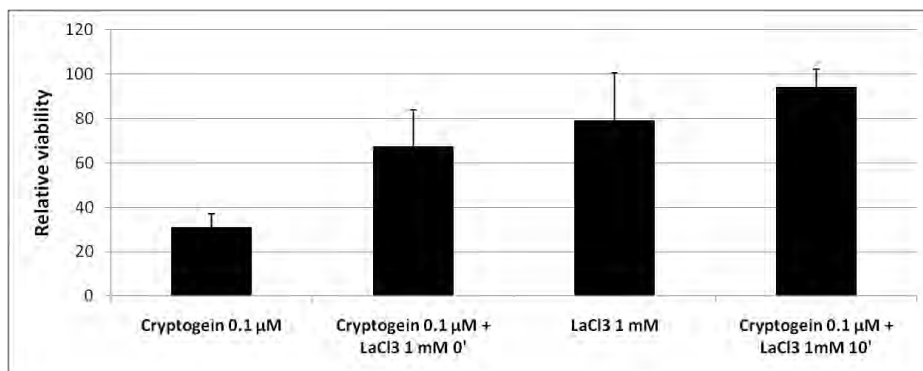
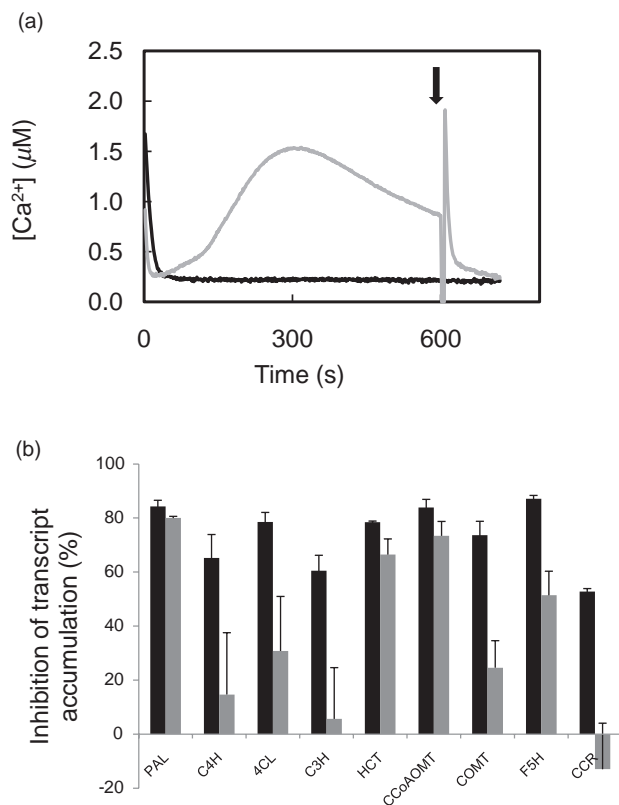


Figure S5. Role of the different components of the calcium signature in the cryptogein induced cell death.

Tobacco BY2 cells were treated for 24 hours with 0,1 µM cryptogein. 1 mM LaCl3 was added either at the same time than cryptogein either 10 minutes after cryptogein treatment. Relative viability of treated cells to that of control cells is showed (means  $\pm$  SE of three experiments).





**Figure 7.** Effect of inhibiting calcium influx on cryptogein-induced calcium variations (a) and transcript accumulation (b) in tobacco BY-2 cells. 1 mM  $\text{La}^{3+}$  was added at  $t = 0$  (black line and black bars) or  $t = 10$  min (grey line and grey bars) after treating cells with  $0.5 \mu\text{M}$  cryptogein. In (b), data are expressed as the percentage of inhibition of the transcript accumulation induced by cryptogein alone (means  $\pm$  SE of three experiments).

treatment, thus suppressing the whole calcium response (dark grey curve, Fig. 7a), or 10 min after cryptogein treatment (arrow) in order to maintain the first peak while suppressing the sustained plateau (light grey curve, Fig. 7a). After a 3-h treatment, we measured the accumulated level of transcripts of phenylpropanoid genes in each condition (Fig. 7b), and cell viability after 24 h (Fig. S5).

Adding lanthanum just before or 10 min after the cryptogein treatment resulted in both cases in a strong reduction of transcript levels of *PAL*, *HCT* or *CCoAOMT* (Fig. 7b) as compared with cryptogein treatment alone (see also Fig. 3a). Furthermore, no significant difference ( $P = 0.05$ ) was observed between the inhibitory effects of the two treatments with lanthanum. In contrast, cryptogein-induced accumulation of transcripts of *C4H*, *4CL*, *C3H*, *COMT* and *CCR* was only slightly modified by the addition of lanthanum after 10 min, suggesting that transcriptional regulation of these genes is mainly dependent of the early calcium influx. It is noteworthy that these two subsets of genes are identical to those identified by the PCA, suggesting a possible link between the intensity of the stimulus (PCA; Fig. 4), the two different phases of the calcium response (Fig. 7) and gene expression.

### Regulators with low and high affinity for calcium control the transcriptional response

To assess the possibility of regulatory effects downstream of the calcium signal, we evaluated the effects of compounds able to interact with calmodulins or CaM-like proteins on cryptogein-induced responses. We used W-13, known as a calmodulin inhibitor ( $K_d = 50 \mu\text{M}$ ), and W-12 (a molecule of the same family as W-13 with a H/Cl substitution and a lower affinity for CaM,  $K_d = 250 \mu\text{M}$ ), as negative control.

By themselves, these drugs provoked changes in cellular calcium (Dagher *et al.* 2008) but in a differential manner (Fig. S4). Within 2 min, the calmodulin inhibitor W-13 induced a transient dose-dependent increase in cytosolic calcium, followed by a rapid decrease to the resting level. In contrast, W-12, here considered as the negative counterpart of W-13, induced significantly lower calcium variations in the cytosol. In subsequent experiments, these two compounds were used at a final concentration of  $50 \mu\text{M}$  for which the calcium level returned to the basal level within 10 min. In order to investigate the effect of these two drugs either on the calcium response or on the transcriptional response induced by cryptogein, W-13 or W-12 were added to the cell suspension 10 min before cryptogein treatment. Then, cytosolic calcium variations were recorded for 15 min, and the cells were collected after 4 h for transcriptional analysis. The calcium response induced by high concentrations of cryptogein ( $0.25 \mu\text{M}$  and above) was not modified by either inhibitor, but when cryptogein was added at low concentrations ( $<50 \text{ nM}$ ), the sustained calcium elevation (plateau value), and to a lesser extent the peak value, were significantly increased by W13 (Fig. 8a), but not by W12 (not shown). When added alone, these compounds had no effect on the transcript level of phenylpropanoid genes (not shown). When added before cryptogein-treatment, they had no effect on the transcript increase induced by concentrations of cryptogein above 100 nM, but a strong enhancement of the cryptogein effect was mediated by the CaM inhibitors at low concentrations of cryptogein, that is, 25 nM (Fig. 8b). As expected, this effect was higher with the calmodulin inhibitor W-13 than with its negative counterpart W-12.

These results confirm the importance of the plateau phase of the calcium signature in the increase of transcript levels induced by cryptogein. Furthermore, the differential effect of anti-CaM compounds, between low and high cryptogein treatments, is consistent with the hypothesis that two calcium decoding modules, one with low affinity and the other with high affinity for calcium, are involved in the regulation of this response.

### Modelling the coupling between cryptogein-induced calcium and transcriptional responses

The results presented previously show the existence of correlations between the different phases of the

The model used to describe the relationship between cryptogein concentration “C” and transcript ratio “R” (measured 4 hours after treatment) was inspired from enzymatic kinetic laws for one ligand and two binding sites (Adair-Klotz model) and Hill phenomenological equation. Here the ligand is cryptogein, the observable variable is the transcript ratio, and the binding sites correspond by analogy to the two putative decoding modules. Thus the equilibrium reads as follows:

$$R = \frac{1 + S1 (K1 \cdot C)^{n1} + S2 (K1 \cdot K2 \cdot C^2)^{n2}}{1 + (K1 \cdot C)^{n1} + (K1 \cdot K2 \cdot C^2)^{n2}} \quad (1)$$

Where K1, S1, and n1 are the association constant, the maximum response and the Hill coefficient for component 1 (respectively K2, S2, and n2 for component 2). For a given condition Ki values and Hill coefficients were supposed to be the same for all genes, while coefficients S1 and S2 were gene dependent.

Estimated values of the coefficients for three genes (data from Fig. 10a):

$$K1 = 23.3 \mu\text{M}^{-1}; K2 = 24.9 \mu\text{M}^{-1}; n1 = 3.9; n2 = 2.7$$

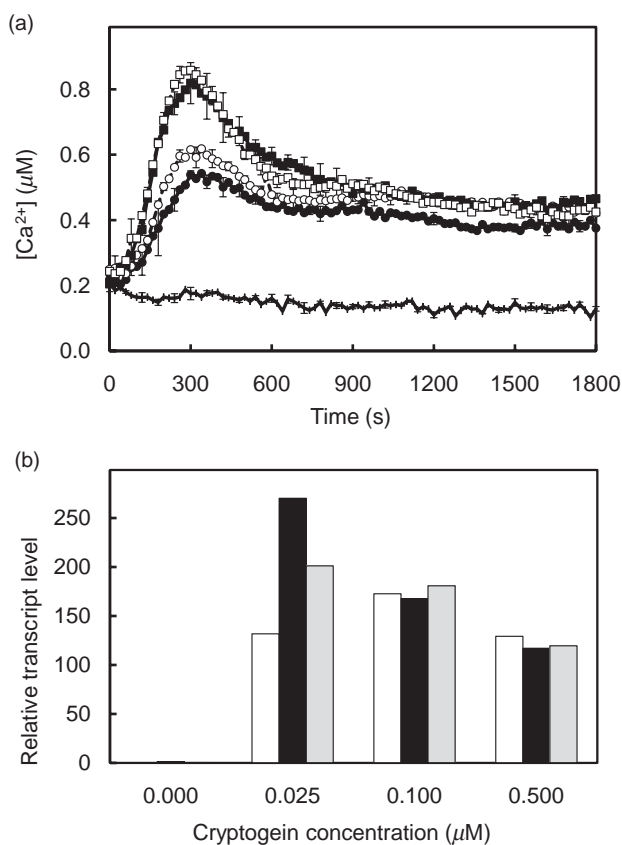
	PAL	HCT	CCoAOMT
S1	58.2	101.9	678
S2	13.5	77.6	11.6

Estimated values of the coefficients for CCoAOMT (data from Fig. 10b):

$$S1=411.2; S2=123.3; n1=3.9; n2=2.7; K2=30.5$$

	Cryptogein	W12 + Cryptogein	W13 + Cryptogein
K1 ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	33.1	41.4	52.8

Figure S6. Mathematical formulation of the model described Fig 9.



**Figure 8.** Effects of calmodulin inhibitors W12 and W13 on the cryptogein-response. (a) Effects of W13 preincubation on the cryptogein-induced calcium signature. Bullets: 50 nM cryptogein; empty bullets: 50  $\mu M$  W13 + 50 nM cryptogein; square: 250 nM cryptogein; empty square: 50  $\mu M$  W13 + 250 nM cryptogein (means  $\pm$  SE of 2 replicates). (b) Effects of W12 (negative control) and W13 preincubation on cryptogein-induced *CCoAOMT* transcript accumulation. Control (white bar), W12 (grey bar) and W13 (black bar). Inhibitors (50  $\mu M$ ) were added to cells 10 min before cryptogein. Data are representative of two independent experiments.

cryptogein-induced calcium signature and the transcriptional response: the calcium-plateau value correlates positively with transcript accumulation, while an increase of the calcium-peak value above a threshold correlates negatively with transcript accumulation. Furthermore, they support the hypothesis of two decoding modules (involving different calcium sensors) able to modulate the response to cryptogein and which could explain the observed correlations.

To test this hypothesis and verify its coherence with the experimental data, we used computer modelling and built a model of the non-linear system coupling the cryptogein signal to calcium and transcriptional regulation. The model can be described as follows (see scheme in Fig. 9).

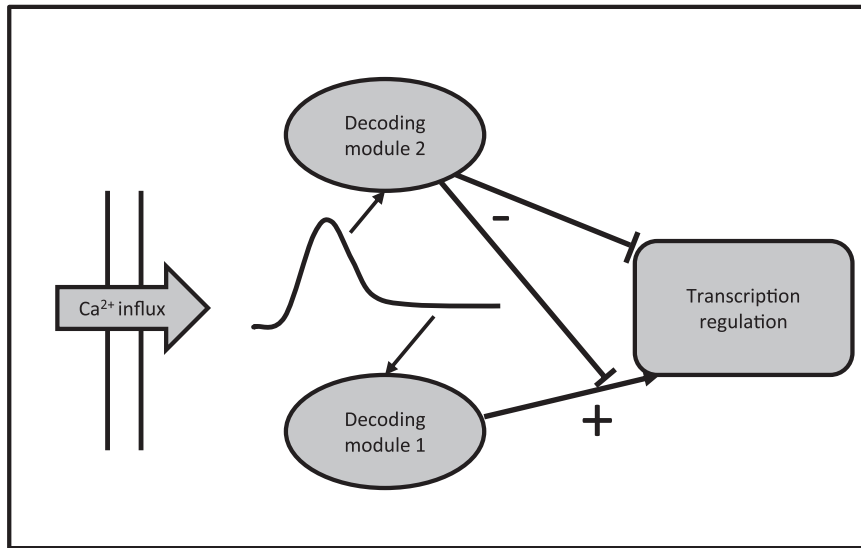
The perception of cryptogein triggers opening of calcium channels, which results in an influx of external calcium. This calcium influx activates calcium-dependent mechanisms that depend upon the strength of the stimulus (= cryptogein concentration). At low concentrations of cryptogein

(10–50 nM), the concerted activation of calcium channels and transporters results in a small but sustained elevation of free cytosolic calcium concentration (= plateau value). This increase (or influx) is nevertheless sufficient to activate calcium-sensors belonging to a high affinity decoding module (module 1), which in turn will enhance transcription of response genes. For higher cryptogein concentrations (>50 nM), the larger calcium influx triggers the release of calcium from internal stores and/or the opening of additional plasma-membrane calcium channels, resulting in a large transient increase of cytosolic calcium (= peak value) followed by a slow return to the plateau value through the action of homeostatic mechanisms. This has two consequences: (1) the activation of high affinity module 1 because of sustained calcium elevation, and thus differential expression of responsive genes; and (2) the activation of other calcium responsive effectors of a low-affinity module (module 2), which has an inhibitory effect on the transcription of the same genes. This results in equilibrium between activation-inhibition mechanisms through the activation of these two modules, linking the transcriptional response to the cryptogein concentration in a non-linear manner.

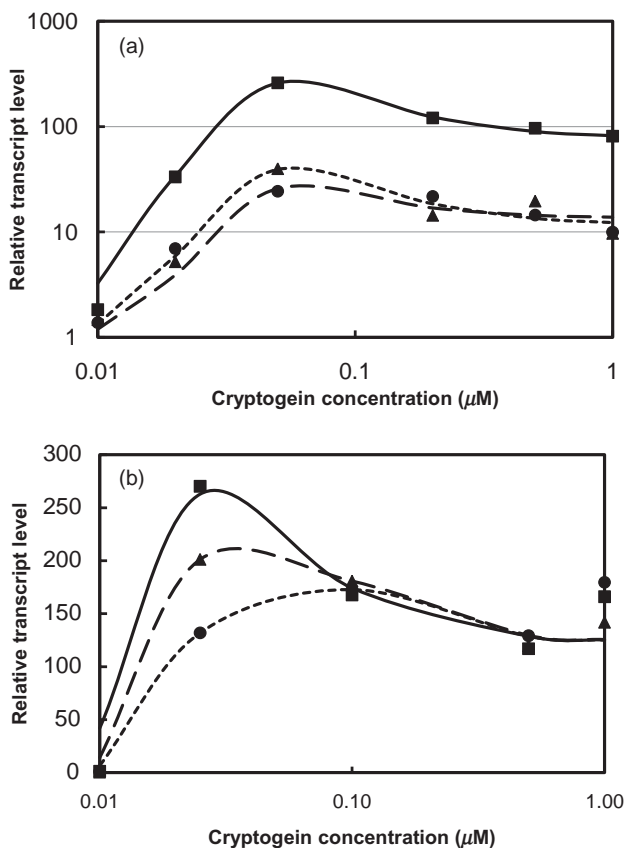
We used a simple phenomenological approach to formalize this model using a two-component system derived from chemical binding kinetics (Fig. S6). In this model, each component (modules 1 and 2) is characterized by an ‘apparent’ affinity constant for cryptogein ( $K_1$  and  $K_2$ , respectively), a parameter defining its maximum activity ( $S_1$  and  $S_2$ , respectively), and a Hill coefficient ( $n_1$  and  $n_2$ , respectively) to account for cooperativity. This model integrates, in a simple way, all the steps between cryptogein binding and transcriptional activation, and thus its parameters depend implicitly on the characteristics of the calcium decoding modules. This model fits well to experimental dose-response curves obtained for the transcription of *PAL*, *HCT* and *CCoAOMT* (Fig. 10a). Interestingly, the  $K$ -values for cryptogein estimated for each component were both very close to the  $K_m$  value of the dose-response curve observed for the calcium plateau (30 nM), which is in the range of  $IC_{50}$  values measured for cryptogein binding to its receptor. In order to test the model further, we used it to fit the effect of calmodulin inhibitors on cryptogein-induced transcription. A good fit to experimental curves was obtained (Fig. 10b) by increasing the affinity parameter  $K_1$  that corresponds to the ‘apparent’ affinity of the ‘activation’ module (the other parameters being held constant). Interestingly, the  $K_1$  value estimated for the W13 experimental curve was greater than its value estimated for W12.

The hypothetical mechanisms at the basis of this simple model seem to be sufficient not only to fit dose-response curves but also to the effect of anti-calmodulin compounds on the transcriptional response to cryptogein. It is worth noting that this model was built on assumptions derived from observed correlations between calcium and expression data only. However, by modifying only two parameter values, the model was able to simulate (at least qualitatively) the effect of anti-calmodulin compounds. Considering that data from anti-CaM experiments were not used to





**Figure 9.** Proposed model for regulation of cryptogein-induced transcriptional response by calcium.



**Figure 10.** Fits of the two-component model described in Fig. 9 to experimental data. (a) Dose-response curves for transcript accumulation of *PAL* (circle), *HCT* (triangle) and *CCoAOMT* (square) induced by a 4-h treatment with cryptogein. (b) Effect of anti-CaM compounds on *CCoAOMT* transcript accumulation induced by cryptogein: control (circle), W-12 pre-treatment (triangle), W-13 pre-treatment (square). Experimental data (symbols) and theoretical curves (lines). Parameter values are given in Fig. S6.

derive the model, this last result is in some extent a first step in the validation of this model.

## DISCUSSION

In this work, our aim was to build an integrated view of the relationships linking the calcium response to the short-term responses induced at the transcriptional and metabolic levels by the necrotizing elicitor cryptogein in BY-2 cells. For this purpose, we first carried out a quantitative analysis of the biological responses at different levels, and then exploited these data to propose a simple coupling model between calcium variations and transcriptional regulation of genes of the phenylpropanoid pathway.

### Cryptogein increases transcription of most genes of the phenylpropanoid pathway

In BY-2 cells, cryptogein induced an increase of transcript levels for most of the genes of the phenylpropanoid pathway, with expression ratios ranging from 4 (e.g. *CAH*) to more than 100 (e.g. *CCoAOMT*), but with the noticeable exception of *CAD*, which catalyzes the last step leading to lignin monomers, which was not induced or was even repressed for high concentrations of elicitor. These transcriptional responses occurred early after elicitation (less than 30 min for the most activated gene *CCoAOMT*) and transcript accumulation continued increasing for several hours, reaching a maximum after 4 h for *PAL*, *HCT* and *CCoAOMT*. For other activated phenylpropanoid genes like *COMT*, their transcripts continued to accumulate for at least 8 h after treatment. Depending on the gene, these responses were totally or partially, suppressed when calcium influx was blocked by lanthanum. This is consistent with the calcium-dependence of the biological responses to cryptogein shown in previous works (Lecourieux *et al.* 2002).



An increased accumulation of transcripts of genes coding for key enzymes of the phenylpropanoid pathway (PAL, 4CL, CCoAOMT, C4H) in response to elicitors has been previously reported in various plant species (Kauss *et al.* 1993; Dixon & Paiva 1995; Suzuki *et al.* 2003; Hano *et al.* 2006; Shinya *et al.* 2007). In particular, cryptogein activates transcription of the PAL gene in tobacco cells (Suty *et al.* 1995; Lecourieux *et al.* 2002). In this work, we extended the study to a larger set of genes belonging to the phenylpropanoid pathway and quantified corresponding transcript levels.

The transcription of *HSR203J*, a marker of hypersensitive response in tobacco (Pontier *et al.* 1994), was strongly increased by the cryptogein treatment as previously shown (Lecourieux *et al.* 2002). In contrast, *PR1* and *PR3*, two genes involved in defence responses through the salicylic acid pathway (Ward *et al.* 1991; Keller *et al.* 1996a), were not differentially expressed in BY-2 cells. This is in agreement with the known biological effect of cryptogein in tobacco, which induces cell death through a hypersensitive response, while the salicylic pathway has been shown not to be involved in the HR response (Keller *et al.* 1996a).

### Phenolic metabolism changes in response to cryptogein

In tobacco BY-2 cells, cryptogein induced an early accumulation of cell-wall-bound phenolic compounds (*p*-coumaric acid, ferulic acid, 5-hydroxyferulic acid, 4-hydroxybenzaldehyde), whereas no consistent variation of free soluble phenolics was detected after a 4-h treatment. The accumulation of cell-wall-bound phenylpropanoid derivatives has often been described as a form of biochemical defence in response to elicitors. For instance, Bolwell *et al.* (1985) reported an accumulation of phenolic material bound to cellulosic and hemi-cellulosic fractions and of free hydroxycinnamic acids in bean cells. Some of the phenolic-bound esters identified in this study were also found in cells treated with elicitor fractions from other oomycetes. It is the case of extracts from *Phytophthora megasperma* that induced accumulation of cell-wall-bound 4-coumaric acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin (Kauss *et al.* 1993). Cell-wall-bound 4-hydroxybenzaldehyde and tyramine amides were also detected in suspension cultures of potato treated with an elicitor extract of *Phytophthora infestans* (Keller *et al.* 1996b).

Because in response to cryptogein, CAD transcript levels are slightly down-regulated whereas most upstream genes are up-regulated, it is conceivable that the CAD substrate (coniferaldehyde) could not (at least in part) be converted into coniferyl alcohol, but rather redirected to ferulic acid by oxidation. Such a hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase (*REF1*, AtALDH2C4) activity has been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* (Nair *et al.* 2004). The identification of this enzyme inverted the conventional model of flux, ferulate and sinapate being products of coniferaldehyde and sinapaldehyde oxidation, rather than being precursors in their synthesis. In support of the hypothesis that cell-wall-bound ferulate could originate from coniferaldehyde, we

recently identified within the publicly available tobacco databases, a sequence highly homologous to AtALDH2C4. Furthermore, we have shown that this gene was significantly over-expressed by five times in BY-2 cells challenged with cryptogein (Amelot *et al.*, unpublished data).

An increased amount of 4-hydroxybenzaldehyde was also observed in cryptogein-treated cells. Although the origin of this compound is unknown, one could hypothesize the existence of a 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity in tobacco. Such a synthase activity, which converts 4-coumaric acid to hydroxybenzaldehyde, was found in tissue cultures of *Vanilla planifolia* (Podstolski *et al.* 2002) and in hairy root cultures of *Daucus carota* (Sircar & Mitra 2008).

Taken together, our results clearly show a reorientation of the phenylpropanoid metabolism in response to cryptogein, resulting in the incorporation of new cell wall phenolic compounds which likely reinforce the cell wall barrier. Moreover, they suggest a new possible route accounting for the accumulation of ferulic acid in tobacco BY-2 cells.

### Calcium controls the cryptogein-induced responses

Our results showed that the phenylpropanoid genes belong to two distinct subsets that respond differentially to cryptogein treatment. The regulation of these two subsets differs by their sensitivity to stimulus intensity (i.e. cryptogein concentration) as well as by their correlation with one particular phase of the calcium signature (peak and/or plateau). Indeed, the long-lasting influx of calcium responsible for the sustained increased level of cytosolic calcium (plateau) is necessary for the appropriate transcriptional response of genes induced by low concentrations of cryptogein (i.e. *PAL*, *HCT* and *CCoAOMT*). Thus, a positive correlation is observed at low cryptogein concentrations between the sustained calcium elevation and transcript accumulation of these genes, while at higher concentrations the calcium peak value was negatively correlated with transcription. On the other hand, the activation of *C4H*, *4CL*, *C3H*, *COMT* and *CCR* genes seems to rely on higher cryptogein concentrations. Furthermore, it appears that the early phase of the calcium response is mainly responsible for their transcriptional response. Such differential responsiveness to calcium response would allow the plant to selectively activate genes of the phenylpropanoid pathway.

To explain these results, one might consider that different calcium stores involved in the generation of the cryptogein-induced calcium signature (Lecourieux *et al.* 2002; Kadota *et al.* 2004; Garcia-Brügger *et al.* 2006) contribute differently to the subsequent biological responses. However, computer simulations of our two-component model rather suggest the existence of two different calcium decoding modules, with low and high affinity for calcium, associated with the main calcium peak and the sustained phase (plateau), respectively, and displaying either an inhibiting or an activating effect.

This model is also supported by the specific effect of calmodulin inhibitor W13 on the transcriptional response





to low cryptogein concentrations only, which suggests the involvement of calmodulins or calmodulin-like proteins in the transduction process. This effect could be simulated with our model by increasing the value of the 'apparent' affinity coefficient of the 'activation' component (Fig. 10). One may thus hypothesize that W13 inhibits calcium-binding proteins (such as CaMs, CMLs or potentially other EF-hand proteins) involved either in the control of calcium homeostasis (channels or pumps) and/or in signal transduction. It is known that some Ca-channels are regulated by calmodulin (Tadross, Dick & Yue 2008); Ca<sup>2+</sup>-CaM is also involved in the control of calcium pumps (Boursiac & Harper 2007). Thus, according to our model, increasing the channel activity or inhibiting pump activity would result in an increase of the calcium-resting level (plateau value), which could in turn activate calcium-dependent transcription complexes. When the cryptogein concentration is higher (> 0.1 μM), activation is already at its maximum, and thus cannot be enhanced further, but for genes like *PAL* or *CCoAOMT*, inhibition can still be increased, leading to a transcriptional response lower than the one obtained at low cryptogein. Globally, anti-CaMs appear to shift the cryptogein concentration at which the transcriptional response is maximal towards lower values.

The non-linear relationship between the calcium signal and downstream responses highlights the complex regulatory properties of calcium and reinforces the concept of calcium signature, considered here as an 'observable' giving an overview at the whole population level of the underlying calcium-dependent processes thought to encode/decode information required for the specificity of the final responses. As the calcium signature observed at the level of a population represents the integral of calcium signals occurring in each individual cell, the possibility to measure calcium signals at the single cell level will be invaluable to further interpret the observed data at the mechanistic level. Finally, the identification of calcium- or CaM-dependent transcription factors involved in the regulation of genes of the phenylpropanoid pathway in tobacco should bring new insights in understanding cryptogein signalling.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sabine Grat for her technical assistance in cell culture maintenance and Nathalie Ladouce for her help in RT-qPCR analysis. Raoul Ranjeva thanks the Miller Institute for Basic Research (UC Berkeley) for supporting him with a Miller Visiting Professorship. Nicolas Amelot thanks the *Association pour la Recherche sur les Nicotianae* for financial support. This work was supported by a grant from the *Agence Nationale pour la Recherche* (ANR-06-BLAN-370) and by the *Centre National de la Recherche Scientifique*.

## REFERENCES

Allen G.J. & Schroeder J.I. (2001) Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling. *Science STKE* **2001**, RE13.

- Allen G.J., Chu S.P., Harrington C.L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y.Y., Grill E. & Schroeder J.I. (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053–1057.
- Bolwell G.P., Robbins M.P. & Dixon R.A. (1985) Metabolic changes in elicitor-treated bean cells. Enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components. *European Journal of Biochemistry* **148**, 571–578.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P. & Ricci P. (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181–192.
- Bourque S., Binet M.N., Ponchet M., Pugin A. & Lebrun-Garcia A. (1999) Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34699–34705.
- Boursiac Y. & Harper J.F. (2007) The origin and function of calmodulin regulated Ca<sup>2+</sup> pumps in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 409–414.
- Dagher R., Briere C., Feve M., Zeniou M., Pigault C., Mazars C., Chneiweiss H., Ranjeva R., Kilhoffer M.C. & Haiech J. (2008) Calcium fingerprints induced by Calmodulin interactors in eukaryotic cells. *Biochimica Biophysica Acta* **1793**, 1068–1077.
- Dixon R.A. & Paiva N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**, 1085–1097.
- Garcia-Brügger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D. & Pugin A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* **19**, 711–724.
- Hano C., Addi M., Bensaddek L., et al. (2006) Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* **223**, 975–989.
- Hetherington A.M. & Brownlee C. (2004) The generation of Ca<sup>2+</sup> signals in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 401–427.
- Israelsson M., Siegel R.S., Young J., Hashimoto M., Iba K. & Schroeder J.I. (2006) Guard cell ABA and CO<sub>2</sub> signaling network updates and Ca<sup>2+</sup> sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 654–663.
- Kadota Y., Goh T., Tomatsu H., Tamauchi R., Higashi K., Muto S. & Kuchitsu K. (2004) Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant and Cell Physiology* **45**, 160–170.
- Kaplan B., Davydov O., Knight H., Galon Y., Knight M.R., Fluhr R. & Fromm H. (2006) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients reveal ABRE-related sequences as Ca<sup>2+</sup>-responsive *cis* elements in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**, 2733–2748.
- Kauss H., Franke R., Krause K., Conrath U., Jeblick W., Grimmig B. & Matern U. (1993) Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiology* **102**, 459–466.
- Keller H., Bonnet P., Galiana E., Pruvot L., Friedrich L., Ryals J. & Ricci P. (1996a) Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 696–703.
- Keller H., Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D. & Strack D. (1996b) Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **42**, 389–396.
- Kim J. & Kim H.Y. (2006) Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling. *FEBS Letters* **580**, 5251–5256.



- Kim M.C., Chung W.S., Yun D.J. & Cho M.J. (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant* **2**, 13–21.
- Kudla J., Batistic O. & Hashimoto K. (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, **22**, 541–563.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R. & Pugin A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell* **14**, 2627–2641.
- Lecourieux D., Ranjeva R. & Pugin A. (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**, 249–269.
- McAinsh M.R. & Pittman J.K. (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytologist* **181**, 275–294.
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G.E. & Downie J.A. (2006) Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *The Plant Journal* **48**, 883–894.
- Moscatiello R., Mariani P., Sanders D. & Maathuis F.J.M. (2006) Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2847–2865.
- Nair R.B., Bastress K.L., Ruegger M.O., Denault J.W. & Chapple C. (2004) The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *The Plant Cell* **16**, 544–554.
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Graziana A., Muto S., Ranjeva R. & Mazars C. (2001) The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* **30**, 413–421.
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Van der Luit A.H., Moreau M., Trewavas A.J., Ranjeva R. & Mazars C. (2000) Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* **405**, 754–755.
- Paffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Podstolski A., Havkin-Frenkel D., Malinowski J., Blount J.W., Kourteva G. & Dixon R.A. (2002) Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* **61**, 611–620.
- Pontier D., Godiard L., Marco Y. & Roby D. (1994) hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant Journal* **5**, 507–521.
- Qudeimat E., Faltusz A.M., Wheeler G., Lang D., Brownlee C., Reski R. & Frank W. (2008) A PIIB-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19555–19560.
- R Development Core Team (2009) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M. & Waner D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 627–658.
- Shinya T., Galis I., Narisawa T., Sasaki M., Fukuda H., Matsuoka H., Saito M. & Matsuoka K. (2007) Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism. *Plant and Cell Physiology* **48**, 1404–1413.
- Sircar D. & Mitra A. (2008) Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* **165**, 407–414.
- Sudha G. & Ravishankar G. (2002) Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **71**, 181–212.
- Suty L., Blein J., Ricci P. & Pugin A. (1995) Early changes in gene expression in tobacco cells elicited with cryptogein. *Molecular Plant Microbe Interactions* **8**, 644–651.
- Suzuki A., Yano A., Nishiuchi T., Nakano T., Kodama H., Yamaguchi K. & Shinshi H. (2003) Comprehensive analysis of early response genes to two different microbial elicitors in tobacco cells. *Plant Science* **173**, 291–301.
- Tadross M.R., Dick I.E. & Yue D.T. (2008) Mechanism of local and global Ca<sup>2+</sup> sensing by calmodulin in complex with a Ca<sup>2+</sup> channel. *Cell* **133**, 1228–1240.
- Takahashi K., Isobe M., Knight M.R., Trewavas A.J. & Muto S. (1997) Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in tobacco suspension-culture cells. *Plant Physiology* **113**, 587–594.
- Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Metraux J.P. & Ryals J.A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3**, 1085–1094.
- Ward J.M., Pei Z.-M. & Schroeder J.I. (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *The Plant Cell* **7**, 833–844.
- Weckwerth W. (2003) Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 669–689.
- White P.J. & Broadley M.R. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**, 487–511.
- Xiong T.C., Bourque S., Lecourieux D., Amelot N., Grat S., Briere C., Mazars C., Pugin A. & Ranjeva R. (2007) Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**, 1209–1215.

Received 9 August 2010; received in revised form 1 September 2010; accepted for publication 3 September 2010

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Comparison between lanthanum chloride and EGTA pretreatments on cryptogein-induced phenylpropanoid genes.

**Figure S2.** Effects of a cycloheximide pretreatment on cryptogein-induced transcript accumulation of phenylpropanoid genes.

**Figure S3.** Effect of cryptogein on transcript accumulation of genes coding for isoforms of *PAL*, *4CL* and *CCoAOMT*.

**Figure S4.** Cytosolic calcium responses to calmodulin inhibitors in tobacco BY-2 cells.

**Figure S5.** Assessment of cryptogein-induced cell death in tobacco BY-2 cells.

**Figure S6.** Model formulation.

**Table S1.** Primer and amplicon sizes.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



**Partie 2. CRYPTOGEINE ET METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES :  
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.**

**II.2.1 Avant-propos**

Dans cette partie sont présentés des résultats complémentaires à ceux de la publication 1 sur l'implication du métabolisme des phénylpropanoïdes dans les réponses à la cryptogéine. Ils concernent notamment l'estimation de la teneur en CCoAOMT dans des cellules de tabac BY2 élicitées, l'étude de la synthèse des composés phénoliques solubles et volatils en réponse à la cryptogéine et les premiers résultats d'un travail s'attachant à visualiser les modifications pariétales des cellules de tabac en réponse à une élicitation. Enfin, je montre les résultats issus d'une analyse comparative entre les effets d'une élicitation par la cryptogéine (induisant une HR) et les effets d'une élicitation par les oligogalacturonates (n'induisant pas une HR) sur le métabolisme des phénylpropanoïdes.



## II.2.2 Matériel et méthodes

### II.2.2.1 Traitements au cycloheximide

Le Cycloheximide (CHX ; Sigma-Aldrich) est dissous dans de l'éthanol 50% à une concentration de 50 mM. Cette solution stock est conservée à -20°C. Pour le traitement des cellules de tabac BY-2, le CHX est utilisé à une concentration finale de 50 µM. Les cellules sont traitées pendant 30 minutes avec le CHX préalablement aux traitements contrôle H<sub>2</sub>O ou cryptogéine.

### II.2.2.2 Immunodétection de la CCoAOMT

Des suspensions cellulaires de tabac BY2 ont été traitées pendant 4 heures avec 0.1 µM de cryptogéine, 1 mM de LaCl<sub>3</sub>, 0.1 µM de cryptogéine + 1 mM de LaCl<sub>3</sub> ou de l'H<sub>2</sub>O et ont été récoltées comme décrit précédemment (II.1.5).

Les cellules ainsi récoltées et filtrées ont été broyées dans un mortier avec de l'azote liquide. La poudre obtenue a été transférée dans un eppendorf 1,5 ml contenant 500 µl de tampon de lyse (50 mM Hepes KOH pH 7,5 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 mM DTT ; 100 µM PMSF ; 2 µM de leupeptine et 100 µl d'antiprotéase Sigma P9599). Le lysat est centrifugé à 3000 rpm et à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant récupéré est aliquoté et conservé à -80°C.

L'électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée selon la méthode de Laemmli (Laemmli 1970). Une fois dénaturés 5 minutes à 100°C, les échantillons protéiques ont été déposés sur un gel de polyacrylamide composé d'un gel de séparation à 12,5% et d'un gel de concentration à 4%. La migration s'est effectuée à ampérage constant de 15 mA dans du tampon d'électrophorèse (25 mM Tris ; 192 mM Glycine ; 0,1% SDS).

Après séparation par électrophorèse, les échantillons protéiques sont transférés sur membrane de nitrocellulose pendant 2 heures et 15 minutes à 75 V dans du tampon de transfert (25 mM Tris ; 0,19 M Glycine ; 20% méthanol). Après transfert, les protéines sont révélées avec une solution de rouge Ponceau (0,1% dans de l'acide acétique à 5%).

La membrane est ensuite incubée une nuit dans du TTBS (25 mM Tris-HCl pH 7 ; 0,5 M NaCl ; 0,1% Tween 20) additionné de lait en poudre (5% Régilait) afin de saturer les sites non spécifiques de la membrane. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du tampon TTBS, la membrane est incubée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante avec la solution d'anticorps primaires (anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la CCoAOMT-1 de tabac fournis par M. Legrand de l'IBMP de Strasbourg) dilués au 1/10 000<sup>ème</sup> dans du tampon TTBS contenant également 1 mg/ml de BSA et 0.02% d'azide. Après 3 lavages de 10 minutes, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec la solution d'anticorps secondaires couplés à la HRP (HorseRadish Peroxydase) dilués au 1/5 000<sup>ème</sup> dans du TTBS + 5% de lait en poudre (Régilait).





Les complexes formés lors de l'immunodétection sont révélés par chimioluminescence avec le réactif ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences). Les membranes sont ensuite placées dans une cassette en contact avec un film d'autoradiographie (Kodak Biomax MR Film) pour 5 minutes, 20 minutes ou toute une nuit.

#### II.2.2.3 Extraction et analyse des composés phénoliques totaux solubles.

Des cellules de tabac BY2, traitées pendant 4 heures avec de l'H<sub>2</sub>O ou avec 0,5 µM de cryptogéine, ont été récoltées selon la méthode décrite en II.1.5. Ces cellules ont été broyées à l'azote liquide et les composés solubles extraits de la poudre résultante dans 5 ml d'EtOH 80%. Après une incubation de 30 minutes à 4°C et une centrifugation à froid de 10 minutes à 4000 rpm, l'extrait a été soumis à évaporation afin d'éliminer la fraction éthanolique et le volume réajusté à 5 ml de H<sub>2</sub>O. Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C.

Afin de déterminer la quantité totale de composés phénoliques solubles accumulés, une analyse selon la méthode de Folin-Ciocalteu a été menée (Slinkard et Singleton 1977). Les composés phénoliques sont dosés par mesure de l'absorption à 760 nm et par comparaison à une courbe standard réalisée avec des quantités connues d'un composé standard (acide gallique).

Une analyse en HPLC a ensuite été entreprise afin d'identifier ces composés phénoliques solubles par méthode de comparaison des standards. Les échantillons filtrés (0,45 µm, Whatman) ont été analysés au cours de « runs » de 60 minutes sur une colonne de silice C18 (Waters Nova-Pack C18 4µM 4.6\*250 mm) montée sur une HPLC (Spectra Physics) comprenant une pompe SP 8800 et un détecteur à UV (Spectra UV 100). Les composés ont été détectés à 340 nm au fur et à mesure de leur élution dans les solvants suivants : solvant A méthanol/H<sub>2</sub>O/acide acétique 10/88/2 et solvant B méthanol/H<sub>2</sub>O/acide acétique 88/10/2, et selon les étapes suivantes : 100% solvant A au démarrage de l'analyse puis 70% solvant A/30% solvant B après 35 minutes, 34% solvant A et 66% solvant B à 50 minutes et 100% solvant B à 55 minutes.

Une confirmation de l'identification des échantillons par LC-MS a par la suite été menée selon la même méthode que celle décrite au paragraphe II.1.5.

#### II.2.2.4 Etude et mesure de la formation de composés volatils.

Des cellules de tabac BY2 ont été traitées pendant 4 heures avec de l'H<sub>2</sub>O ou 0,1 µM de cryptogéine. L'analyse de l'expression des gènes *NtAADC1A* et *NtAADC2*, orthologues putatifs de gènes impliqués dans la formation de composés volatils chez la tomate a été réalisée selon le même protocole que précédemment (cf. Chapitre II.1.5). Les paires d'amorces utilisées et la taille de l'amplicon sont indiquées sur le tableau II-S1.

La formation de composés volatils par éventuelle décarboxylation de la phénylalanine ou de l'acide cinnamique (cf. figure I-36) a été détectée par captage du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> émis par des



suspensions cellulaires incubées avec de la [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-L-Phénylalanine ou de l'acide [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-Cinnamique (marqués uniformément). Le  $^{14}\text{CO}_2$  émis a été capté sur un papier filtre imbibé par 40  $\mu\text{l}$  de KOH 1 M et maintenu dans l'espace de tête situé au dessus de la suspension cellulaire durant la totalité de l'expérience réalisée dans des récipients hermétiquement clos. En fin d'expérience, le papier filtre a été transféré dans une fiole de comptage contenant 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auquel ont été ajoutés 8 ml de liquide scintillant (Ready safe, Beckman) puis la radioactivité mesurée au compteur à scintillation.

### II.2.2.5 Analyses microscopiques

#### *Préparation des échantillons pour la microscopie*

1,5 ml de cellules de tabac BY2 ont été traitées pendant 4, 8 ou 12 heures avec 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine, prélevées, fixées 1 heure dans un tampon Cacodylate de Sodium 0,1  $\mu\text{M}$  pH 7,5 additionné de glutaraldéhyde à 2,5% puis conservées à 4°C. 200  $\mu\text{l}$  de cellules fixées sont ensuite déposées sur une lame à puits sur lesquelles 0,5 ml d'agarose bas point de fusion à 5% a été rajouté. Après solidification de la goutte, les échantillons sont ensuite déshydratés par bains successifs d'éthanol 20, 40, 60 et 80 % de 2 x 15 minutes chacun. Finalement, les échantillons sont placés 1 heure dans de l'éthanol absolu, puis enrésinés progressivement dans de la résine LRWhite (8 heures dans un mélange LRWhite 25% / EtOH 75%, 15 heures dans un mélange LRWhite 50% / EtOH 50%, 8 heures dans un mélange LRWhite 75% / EtOH 25% et 15 heures dans du LRWhite 100%). Les échantillons sont ensuite placés dans des gélules de petite taille remplies de LRWhite pur et polymérisés à 70°C pendant 16 heures.

#### *Analyse de l'autofluorescence des cellules*

Des coupes semi-fines (1  $\mu\text{m}$ ) de cellules fixées ont été observées en épifluorescence à l'aide d'un microscope à champ large (DMIRB, Leica, Microsystems, Wetzlar, Germany) équipé d'un objectif 40X et d'un bloc filtre pour la fluorescence (excitation 340-380 nm, émission 425 nm). Les images ont été acquises avec une caméra couleur tri-CCD CoolView (Photonic Sciences, UK).

#### *Coloration au bleu de toluidine*

Des coupes semi-fines (1  $\mu\text{m}$ ) des échantillons contenus dans les gélules ont été réalisées (Ultracut E, Reichert-Jung, Capovani Brothers Inc., Scotia, USA) et colorées pendant 30 secondes à 60°C par du bleu de toluidine 0,5% en solution dans du carbonate de calcium à 2,5% et pH 11.



#### II.2.2.6 Mesure du taux de mort cellulaire dans des cellules de tabac BY2.

La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un marqueur de viabilité fluorescent : le Di Acétate de Fluorescéine (FDA) selon une méthode décrite par Lachaud *et al.* (2010a). Les cellules de tabac ont été préparées selon le protocole décrit au chapitre II.1.5 puis après traitement resuspendues à un PCV de 10% dans le même tampon additionné de Ficoll (w/v 10%) pour éviter leur sédimentation pendant la mesure. Pour la mesure, 2 ml de suspension cellulaire ont été déposés dans une cuve en quartz de 4 ml munie d'un barreau magnétique permettant l'agitation continue des cellules. Après l'ajout de 0,001% (w/v) de FDA, l'intensité de la fluorescence a été mesurée toutes les 30 secondes pendant 2 minutes avec un spectrofluorimètre SFM 25 (Kontron Instruments) à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm et une longueur d'onde d'émission de 510 nm. La pente de la courbe (= taux d'augmentation de la fluorescence) qui dépend de la vitesse de désestérification de la sonde est proportionnelle au nombre de cellules viables dans l'échantillon. La viabilité cellulaire relative d'un échantillon cellulaire à un temps t après un traitement donné est calculée comme le ratio entre le taux d'augmentation de fluorescence mesurée dans l'échantillon traité et le taux mesuré dans un échantillon témoin.



### II.2.3 Résultats

#### II.2.3.1 Analyse des niveaux de transcrits des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes : résultats complémentaires.

##### *L'induction des gènes nécessite une néo-synthèse protéique*

Le cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, a été utilisé pour déterminer si l'augmentation par la cryptogéine du nombre de transcrits des gènes de la voie des phénylpropanoïdes induite par la cryptogéine requérait une néo-synthèse protéique. Des cellules de tabac BY2 ont été pré-incubées pendant 30 minutes en présence de 50  $\mu\text{M}$  de CHX avant d'être traitées avec 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine pendant 3 heures. Tous les gènes testés sont activés en réponse à la cryptogéine, ainsi que cela a déjà été montré, alors que le prétraitement au CHX inhibe quasi-totalement l'induction cryptogéine-dépendante des gènes (figure S2). Ainsi, l'induction par la cryptogéine du gène *CCoAOMT* est inhibée à 95% par le prétraitement au CHX, suggérant que l'augmentation du niveau de transcrits suite à la perception de la cryptogéine nécessite la mise en place d'une synthèse protéique *de novo*.

##### *Induction différentielle de gènes codant des isoformes d'enzymes clés de la voie des phénylpropanoïdes*

Il est connu que, dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, plusieurs isoformes d'une enzyme donnée coexistent et sont activées différemment selon les stimuli perçus. Nous avons donc étudié le profil d'expression de gènes codant des isoformes de trois enzymes de la voie : PAL, CCoAOMT et 4CL. Pour cela, nous avons généré des amorces spécifiques de chaque isoforme en ciblant la partie 3'UTR du gène correspondant (*cf.* tableau S1).

En réponse à la cryptogéine, le niveau de transcrits de l'isoforme A de la PAL est beaucoup plus augmenté (20x) que celui de l'isoforme B qui ne l'est que faiblement (2x). En ce qui concerne la 4CL, seuls les transcrits de l'isoforme 2 sont accumulés contrairement à ceux de l'isoforme 1 qui restent au même niveau que chez les témoins. En ce qui concerne la CCoAOMT, les transcrits des gènes codant les 4 isoformes de la classe I sont fortement augmentés (100x) par la cryptogéine (figure S3) alors que ceux des CCoAOMT 5 (classe II) et 6 (classe III) ne le sont que très peu (2x) ou moyennement (8x). Ces données confirment l'existence d'une spécificité de réponse selon le stimulus, encodée au niveau transcriptionnel par l'accumulation différentielle des transcrits d'isoformes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

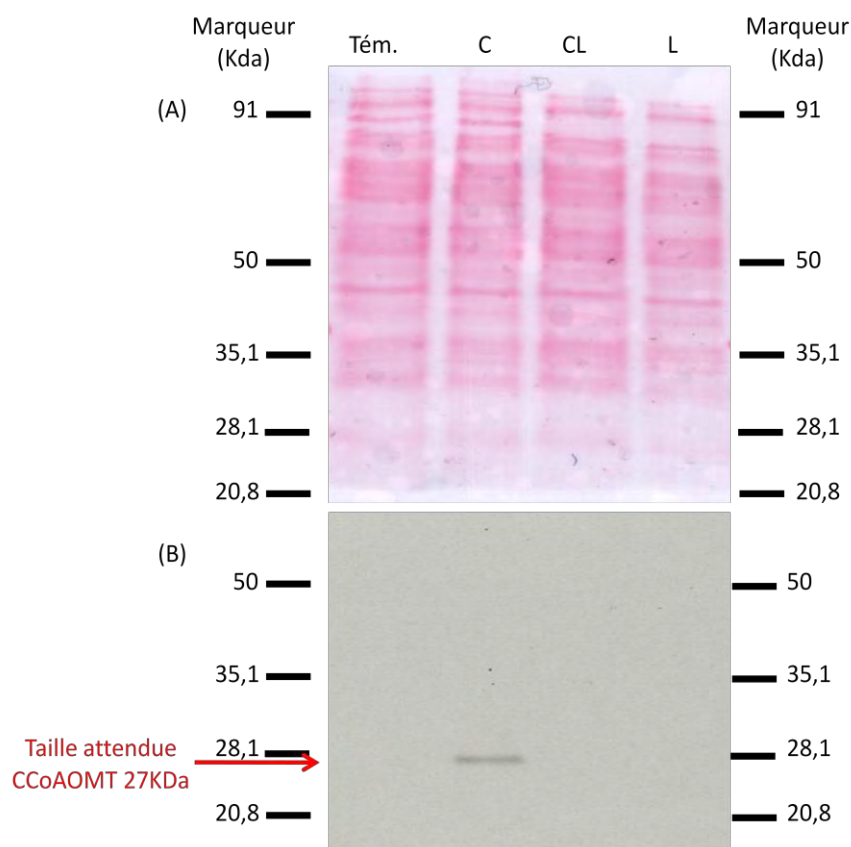


Figure II-1. **Immunodétection de la CCoAOMT par Western Blot.** Les protéines ont été extraites de cellules de tabac BY-2 traitées avec de l'H<sub>2</sub>O (Tém), 1 μM de cryptogéine (C.), 1 μM de cryptogéine + 1 mM de La<sup>3+</sup> (CL) ou 1 mM de La<sup>3+</sup> seul (L). 8 μg d'extraits protéiques totaux ont été déposés sur chaque piste. (A) Coloration au rouge Ponceau du gel d'électrophorèse. (B) Immunodétection de la CCoAOMT (Western blot). Temps d'exposition du film : 20 min.

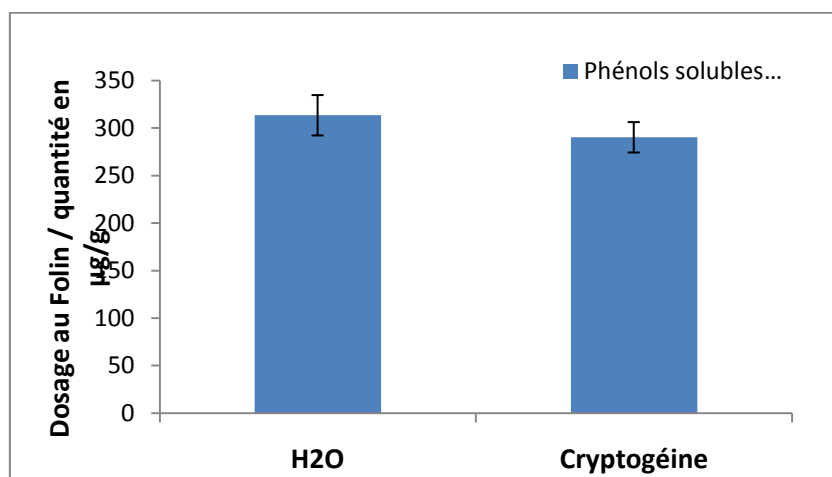


Figure II-2. **Dosage des composés phénoliques solubles totaux dans des cellules de tabac BY2.**

Analyse par la méthode de Folin-Ciocalteu de fractions phénoliques extraites de cellules de tabac BY-2 traitées par de l'H<sub>2</sub>O ou 0,5 μM de cryptogéine. Les données sont exprimées comme la moyenne de 10 répétitions biologiques indépendantes ± SD.



### II.2.3.2 La protéine CCoAOMT s'accumule en réponse à la cryptogéine.

Les travaux présentés dans la première partie de ce chapitre nous ont permis d'identifier les transcrits du gène *CCoAOMT* comme étant les plus fortement accumulés au sein de la voie des phénylpropanoïdes en réponse à un traitement cryptogéine (cf. figure 3). Par ailleurs, nous avons montré que l'activité enzymatique de la CCoAOMT était également augmentée en réponse à la cryptogéine (près de 6x la valeur témoin, cf. figure 5). Afin de vérifier que ces augmentations du nombre de transcrits et d'activité enzymatique étaient bien corrélées à une synthèse accrue de la protéine, nous avons réalisé, par immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques (fournis par l'équipe de M. Legrand, IBMP Strasbourg), une estimation comparative des quantités de CCoAOMT dans des extraits protéiques de cellules traitées et non traitées. Les protéines totales de cellules de tabac BY2 élicitées ou non par la cryptogéine ont été extraites et séparées par une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La coloration de la membrane au rouge ponceau a permis de montrer l'homogénéité des dépôts et la qualité du transfert des différents extraits protéiques (figure II-1 A). La même membrane a été utilisée pour réaliser une immunodétection en Western Blot (figure II-1 B). Dans nos conditions d'expérience, une seule bande est détectée dans les extraits protéiques issus de cellules élicitées par la cryptogéine, à une taille approximative de 27KDa. Cette taille correspond parfaitement au poids moléculaire attendu de la CCoAOMT I de tabac (Maury *et al.* 1999). Bien que les quantités déposées soient identiques, aucune détection n'a pu être détectée dans la situation témoin. Il semble donc que la perception de la cryptogéine induise dans la cellule de tabac, non seulement une accumulation de transcrits, mais également une synthèse accrue de la protéine CCoAOMT. Par ailleurs, un traitement au  $La^{3+}$  conduit aux mêmes résultats qu'en situation témoin, *i.e.* une absence d'immunodétection de la protéine. Cette observation souligne l'importance des signaux calciques dans les réponses conduisant à la surexpression du gène *CCoAOMT*, à la sur-accumulation de la protéine correspondante ainsi qu'à l'augmentation de l'activité enzymatique.

### II.2.3.3 La cryptogéine n'induit pas l'accumulation de phénylpropanoïdes solubles de type phénolamines.

Nous avons pu montrer par des expériences de marquage radioactif que l'ensemble du métabolisme des phénylpropanoïdes était perturbé par la perception d'un éliciteur fongique tel que la cryptogéine (cf. Chapitre II publication 1). En particulier, l'élicitation conduit à une forte accumulation de phénylpropanoïdes liés à la paroi, alors qu'aucune différence n'a été observée au niveau des composés phénoliques solubles (cf. figure 6). Le dosage global de composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu dans les fractions solubles extraites de cellules traitées et non traitées corrobore ce dernier résultat (II-2). En effet, la compilation des résultats de 10 expériences biologiques indépendantes indique que dans des cellules

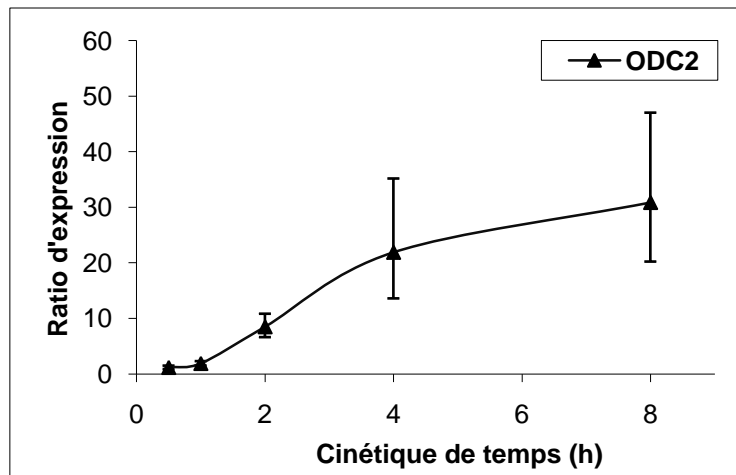


Figure II-3. **Cinétique d'accumulation de transcrits du gène *ODC* dans des cellules de tabac BY-2 élicitées par 0,1 µM de cryptogéine.**

Ratios de transcrits dans les cellules traitées mesurés par RT-qPCR et normalisés par rapport à ceux du gène de ménage *18S*, relatifs à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O. Les données sont exprimées comme la moyenne de 3 répétitions biologiques ± SD.

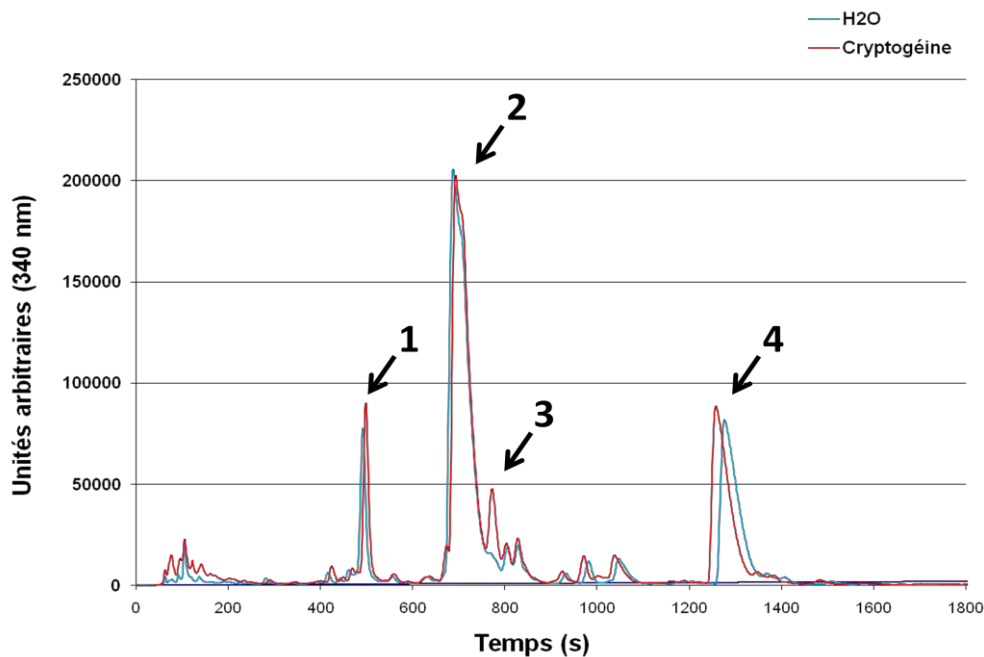


Figure II-4. **Profil HPLC des phénols solubles totaux extraits de cellules de tabac BY-2 traitées par de l'H<sub>2</sub>O ou 0,5 µM de cryptogéine.**

Les pics 2 et 4 représentent la caféoylputrescine et la féruloylputrescine respectivement. Les pics 1 et 3 n'ont pu être identifiés par la méthode de comparaison des standards. Un profil représentatif de 3 répétitions biologiques est montré.

traitées par de l'H<sub>2</sub>O la quantité de phénols solubles est en moyenne de  $313 \pm 21 \mu\text{g} / \text{g}$  de cellules (poids sec) alors que dans des cellules traitées par  $0,5 \mu\text{M}$  de cryptogéine elle est en moyenne de  $290 \pm 16 \mu\text{g} / \text{g}$ .

N'ayant pas observé d'effet global sur la teneur en phénols solubles, excepté dans quelques expériences, nous avons alors recherché d'éventuelles différences au niveau de certaines phénolamines, phénylpropanoïdes solubles importants pour les réponses de défense des plantes (cf. I.3.2.3). En particulier, les phénolamines de type CafféoylPutrescine (CP) et FéruloylPutrescine (FP ; regroupant un acide hydroxycinnamique et une amine à chaîne aliphatique, la putrescine) ont été identifiées comme étant des composés marqueurs des réponses au MJ (Galis *et al.* 2006) et aux Aaglucans (Shinya *et al.* 2007). Nous avons par ailleurs pu montrer que le gène *ODC* codant pour l'ornithine décarboxylase, une enzyme catalysant la dernière étape de la biosynthèse de la putrescine, était fortement activé en réponse à la cryptogéine (figure II-3). En effet, 4 heures après traitement, les transcrits *ODC* sont accumulés 22x plus en réponse à un traitement cryptogéine comparativement à un traitement H<sub>2</sub>O.

Nous avons entrepris une étude par HPLC et LC-MS sur les mêmes extraits phénoliques afin de caractériser d'éventuelles différences qualitatives dans le profil des phénylpropanoïdes solubles synthétisés par des cellules de tabac BY2. Les profils HPLC obtenus à partir d'extraits phénoliques de cellules traitées à l'H<sub>2</sub>O ou à la cryptogéine sont extrêmement semblables (figure II-4). En particulier, il semble qu'il n'y ait aucune différence significative d'accumulation de CP ou de FP entre les deux traitements (pics 2 et 4 respectivement, figure II-4). Sur l'ensemble du spectre, seul le composé élué au niveau du pic 3 est potentiellement accumulé spécifiquement en réponse à la cryptogéine. Malheureusement, ce composé n'a pu être identifié par les diverses techniques employées.

#### II.2.3.4 La cryptogéine induit-elle la synthèse de phénylpropanoïdes volatils ?

Il a été récemment montré chez la tomate que des composés volatils comme le phényléthanol et le phénylacétaldéhyde pouvaient être formés à partir de la décarboxylation de la phénylalanine (Tieman *et al.* 2006). Une telle réaction serait catalysée par des AADC, dont des orthologues putatifs ont pu être identifiés chez le tabac : *NtAADC1A* et *NtAADC2*. L'analyse par RT-qPCR de la transcription de ces gènes dans les cellules de tabac BY-2 montre une accumulation majeure des transcrits en réponse à la cryptogéine (cf. figure II-5), de l'ordre de plusieurs centaines de fois supérieure à celle observée pour un traitement H<sub>2</sub>O. Ces résultats suggèrent donc une activation de la voie conduisant à la formation de composés volatils par décarboxylation de la phénylalanine chez le tabac en réponse à une élicitation fongique. Afin de vérifier l'hypothèse d'une telle formation, nous avons réalisé des essais de radiomarquage métabolique dans lesquels la radioactivité issue de l'incorporation de

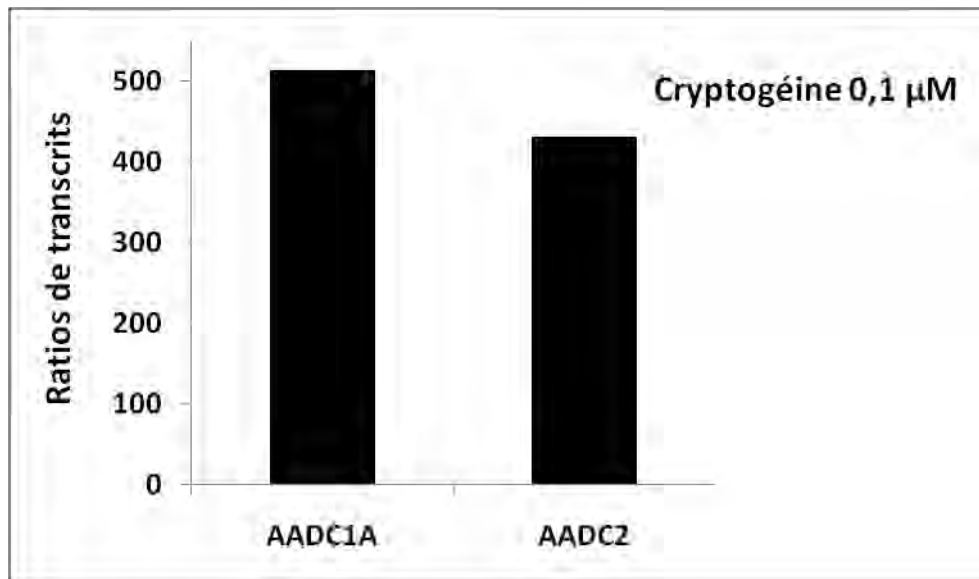


Figure II-5. **Accumulation de transcrits des gènes *AADC1A* et *AADC2* dans des cellules de tabac BY-2 élicitées par 0,1  $\mu$ M de cryptogéine.**

Ratios de transcrits mesurés dans les cellules traitées par RT-qPCR et normalisés par rapport à ceux du gène de ménage *18S*, relatifs à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O. Une expérience biologique représentative de 3 est montrée.

phénylalanine uniformément marquée au  $^{14}\text{C}$  a été dosée dans les différentes fractions cellulaires : milieu externe, fraction soluble (incluant les phénols), fraction insoluble (incluant les protéines et les phénols liés) et fraction volatile.

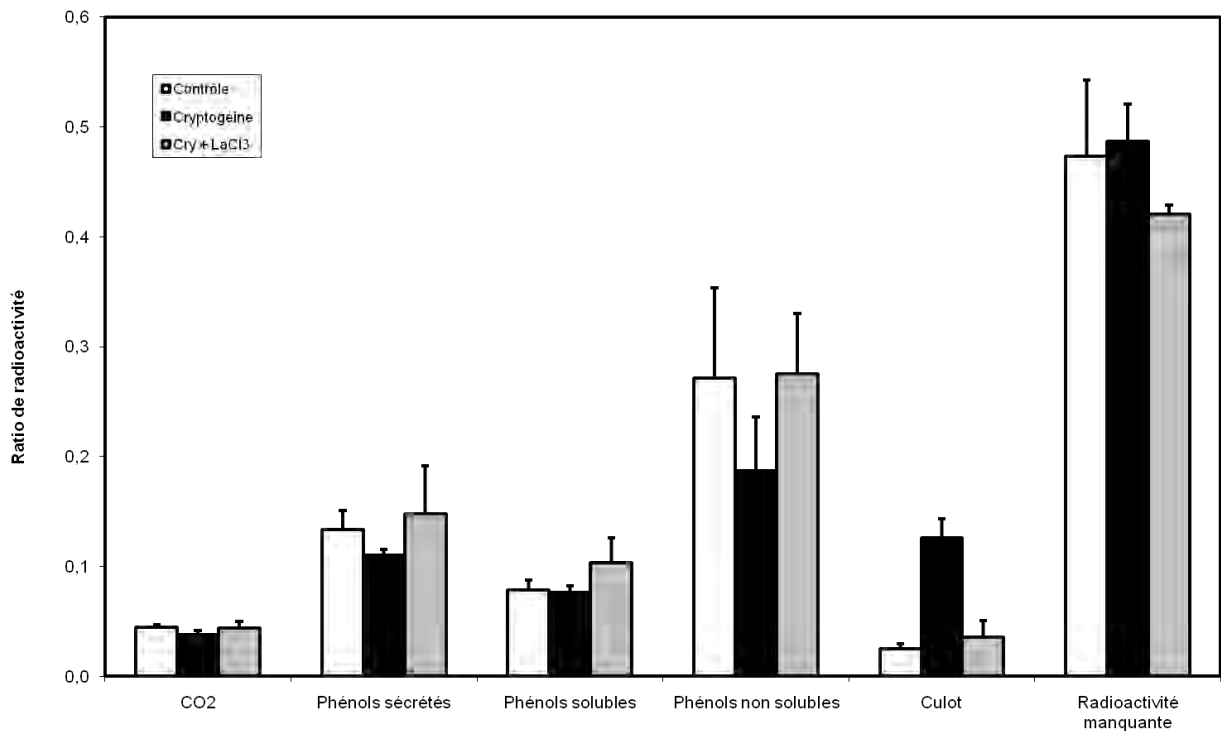
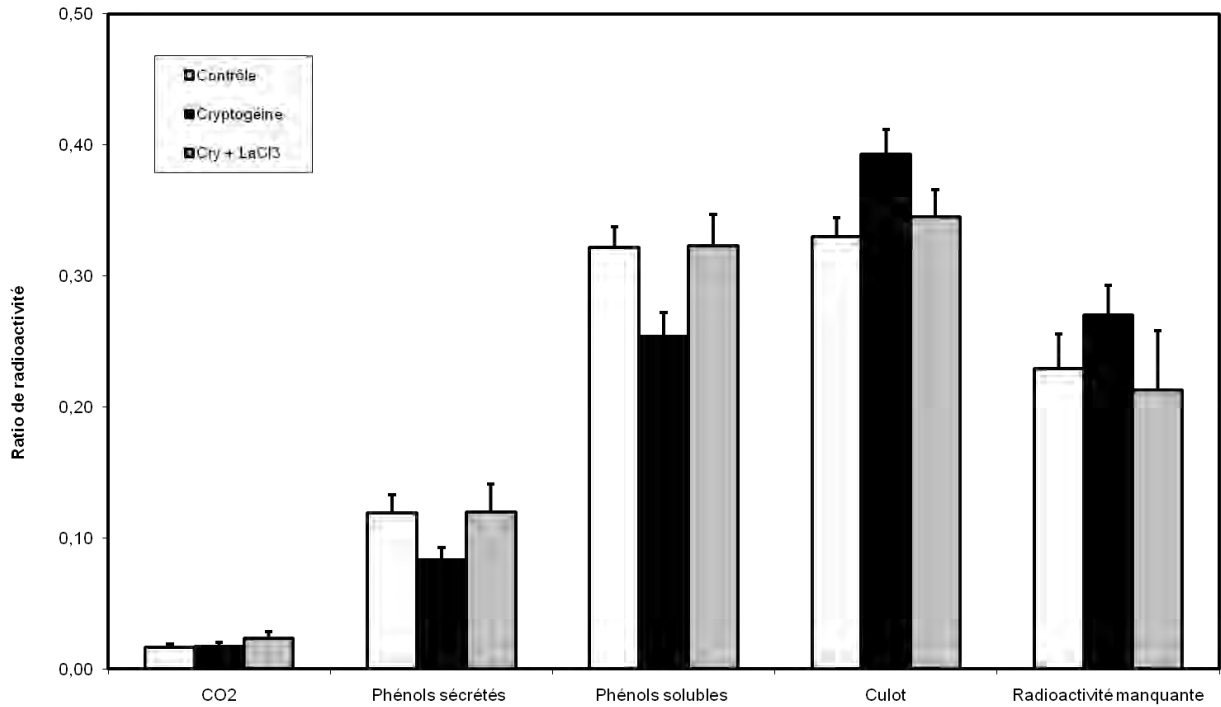
La formation éventuelle de composés volatils a été mesurée par piégeage du  $^{14}\text{CO}_2$  dans l'espace de tête de la suspension cellulaire par du KOH. Un contrôle négatif dans lequel les cellules ont été incubées avec de la phénylalanine marquée uniquement sur le cycle [cycle- $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-L-phénylalanine (aucun  $^{14}\text{CO}_2$  ne pouvant être émis), a montré que la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  détectée était négligeable. En revanche, lorsque les cellules étaient incubées avec de la phénylalanine uniformément marquée au  $^{14}\text{C}$ , une petite mais significative (par rapport au contrôle négatif) quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  a été mesurée à la fois chez le contrôle  $\text{H}_2\text{O}$  et en réponse à la cryptogéine (figure II-6A). Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements, suggérant que l'émission de  $\text{CO}_2$  n'était pas modifiée par la perception de la cryptogéine (figure II-6A). Toutefois, la quantité de radioactivité manquante (= différence entre radioactivité fournie au système et radioactivité totale mesurée) étant systématiquement plus élevée dans les suspensions cellulaires traitées à la cryptogéine, cela laisse supposer un piégeage peut-être incomplet du  $^{14}\text{CO}_2$  émis.

Afin de vérifier si l'étape de décarboxylation n'intervenait pas après transformation de la phénylalanine en acide cinnamique par la PAL, nous avons incubé les cellules avec de l'acide [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-cinnamique et la radioactivité a été mesurée dans les mêmes fractions que précédemment. De manière générale, les effets de la cryptogéine sont qualitativement les mêmes (i.e. accumulation de phénylpropanoïdes liés à la paroi dans la fraction insoluble ; cf. aussi figure 6) ; quantitativement, les différences observées sont principalement dues à l'absence des protéines radiomarquées dans des suspensions cellulaires incubées avec de l'acide cinnamique en comparaison avec le marquage à la phénylalanine radioactive (figure II-6B). Là encore, nous avons pu observer que l'émission de  $^{14}\text{CO}_2$  par les suspensions cellulaires n'était pas significativement modifiée par un traitement à la cryptogéine (figure II-6B), sans toutefois pouvoir éliminer l'hypothèse d'un piégeage partiel du  $\text{CO}_2$ . Cette hypothèse permettrait d'expliquer au moins en partie l'accumulation de transcrits de AADC observée en réponse à la cryptogéine.

#### II.2.3.5 La cryptogéine induit des modifications morphologiques dans des cellules de tabac BY2.

##### *La cryptogéine induit l'accumulation de matériel fluorescent.*

Les plantes soumises à des attaques biotiques répondent par l'activation d'un certain nombre de réponses de défense, parmi lesquelles l'accumulation de composés autofluorescents (Takahashi *et al.* 1999) susceptibles de jouer un rôle dans l'adaptation au stress. Nous avons donc analysé les variations d'autofluorescence de cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine, soit *in vivo*, soit après fixation. Un traitement de 3 heures avec



**Figure II-6. Distribution de la radioactivité dans des cellules de tabac BY2 incubées pendant 4 heures avec (A) de la  $[^{14}\text{C(U)}]\text{-L-Phénylalanine}$  ou (B) de l'acide  $[^{14}\text{C(U)}]\text{-Cinnamique}$  ( $0.2 \mu\text{Ci} / \text{ml}$ ).**

Au temps  $t = 0$ , les cellules ont été traitées avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (contrôle, barre blanche),  $0,1 \mu\text{M}$  de cryptogéine (barre noire) ou  $0,1 \mu\text{M}$  de cryptogéine +  $1 \text{ mM}$  de  $\text{LaCl}_3$ . La radioactivité relative est exprimée comme le ratio entre l'activité mesurée dans un compartiment spécifique et la radioactivité totale apportée au système.

0,5  $\mu\text{M}$  de cryptogéine induit une augmentation de l'autofluorescence des cellules, en particulier dans la zone nucléaire (figure.II-7 A et B). Cette augmentation est supprimée par un prétraitement au lanthane (figure. II-7 C et D). Après fixation de cellules traitées pendant 12 heures par 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine, on observe une nette accumulation de matériel fluorescent par rapport au contrôle (figure II-8 A et B). Ce matériel fluorescent accumulé est localisé non pas au niveau pariétal mais plutôt dans la zone nucléaire et périnucléaire. Un traitement par le  $\text{LaCl}_3$  supprime totalement la différence d'autofluorescence observée en réponse à la cryptogéine (figure II-8 C). Par ailleurs, l'analyse détaillée des spectres issus des images montre que le traitement à la cryptogéine induit un changement de la nature de la fluorescence. En effet, la perception de l'éliciteur provoque un décalage du spectre de la composante bleue vers de plus fortes intensités. Cette modification du spectre d'autofluorescence pourrait être indicative d'une modification de la composition en composés aromatiques dans les cellules traitées.

#### *La cryptogéine induit la formation de vésicules à contenu acide*

Afin de visualiser les différents compartiments de la cellule, notamment le noyau et la paroi cellulaire, nous avons coloré des coupes semi-fines avec du bleu de toluidine, un colorant métachromatique (figure II-9). Des cellules traitées pendant 12 heures avec 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine subissent une rétractation de leur membrane plasmique due à un début de plasmolyse (flèches noires, figure II-9 B). Par ailleurs, ces cellules élicitées forment des structures vésiculaires colorées en rose pâle (flèches blanches, figure II-9 B) indiquant un contenu potentiellement acide. Ces structures ne sont pas observées dans les cellules témoins (figure II-8 A) et ne sont plus observées lorsque le traitement cryptogéine est précédé d'un traitement au  $\text{LaCl}_3$  (figure II-8 C), suggérant que la formation de ces structures est un phénomène  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant. En revanche, aucune différence de coloration n'est observée au niveau des parois cellulaires, et ce, quel que soit le traitement considéré.

#### II.2.3.6 La cryptogéine induit la mort cellulaire dans des cellules de tabac BY-2.

La cryptogéine est connue pour induire une HR-like chez le tabac (cf. I.2.5.6). Afin de vérifier que la cryptogéine induit effectivement la mort cellulaire dans des cellules de tabac BY-2, des tests de viabilité cellulaire ont été menés. Tout d'abord, une cinétique de viabilité a permis de montrer que la mort cellulaire induite par 0,1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine intervenait de manière significative après 8 heures de traitement (figure II-10 A). En effet, 2 heures et 4 heures de traitement ne modifient pas la viabilité cellulaire de manière significative ; en revanche, entre 30% et 40% de mortalité cellulaire sont observés après 8 heures d'élicitation. Vingt-quatre heures après le début de l'induction, seuls 30% des cellules sont encore viables, validant l'effet de la cryptogéine sur des cellules de tabac BY2.

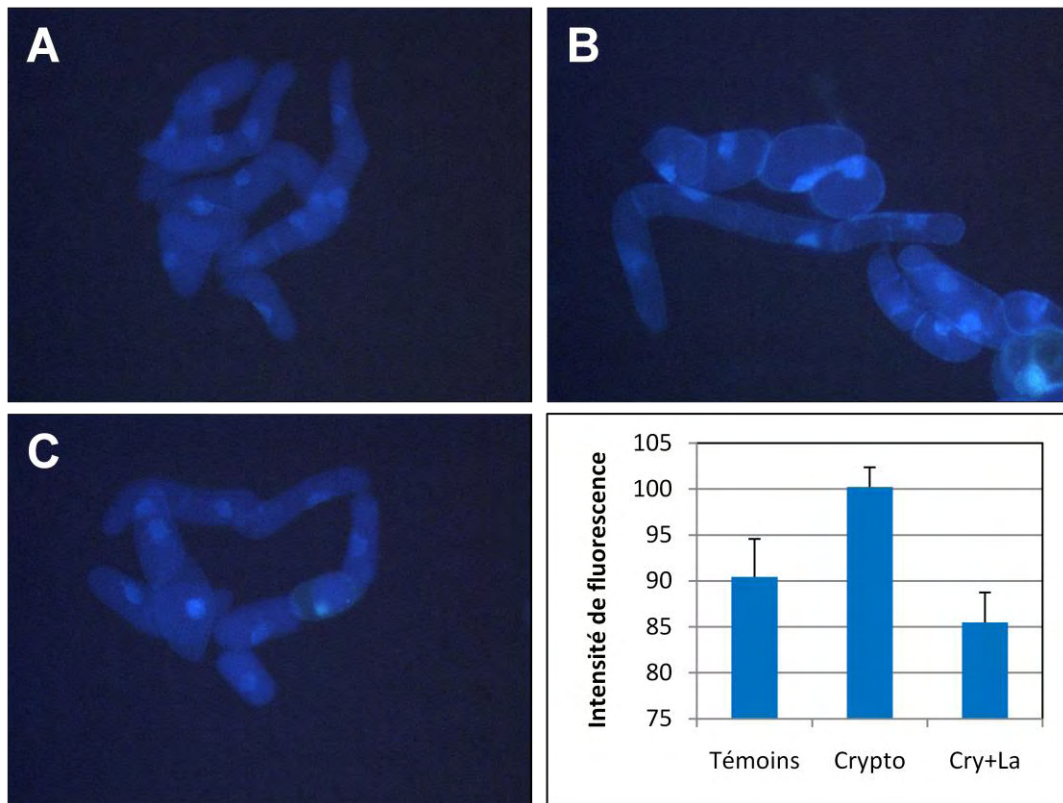


Figure II-7. **Détection de composés autofluorescents dans des cellules de tabac BY-2 *in vivo*.**

Les cellules ont été traitées pendant 3 heures avec de l'H<sub>2</sub>O (contrôle, A), 0,5 μM de cryptogéine (B) ou 0,5 μM de cryptogéine + 1 mM de LaCl<sub>3</sub> (C). L'autofluorescence des cellules a été observée à une longueur d'onde de 425 nm après excitation à 340-380 nm. (D) Intensité de la fluorescence mesurée dans le canal bleu, au niveau des cellules entières ou au niveau du noyau, après soustraction du fond.



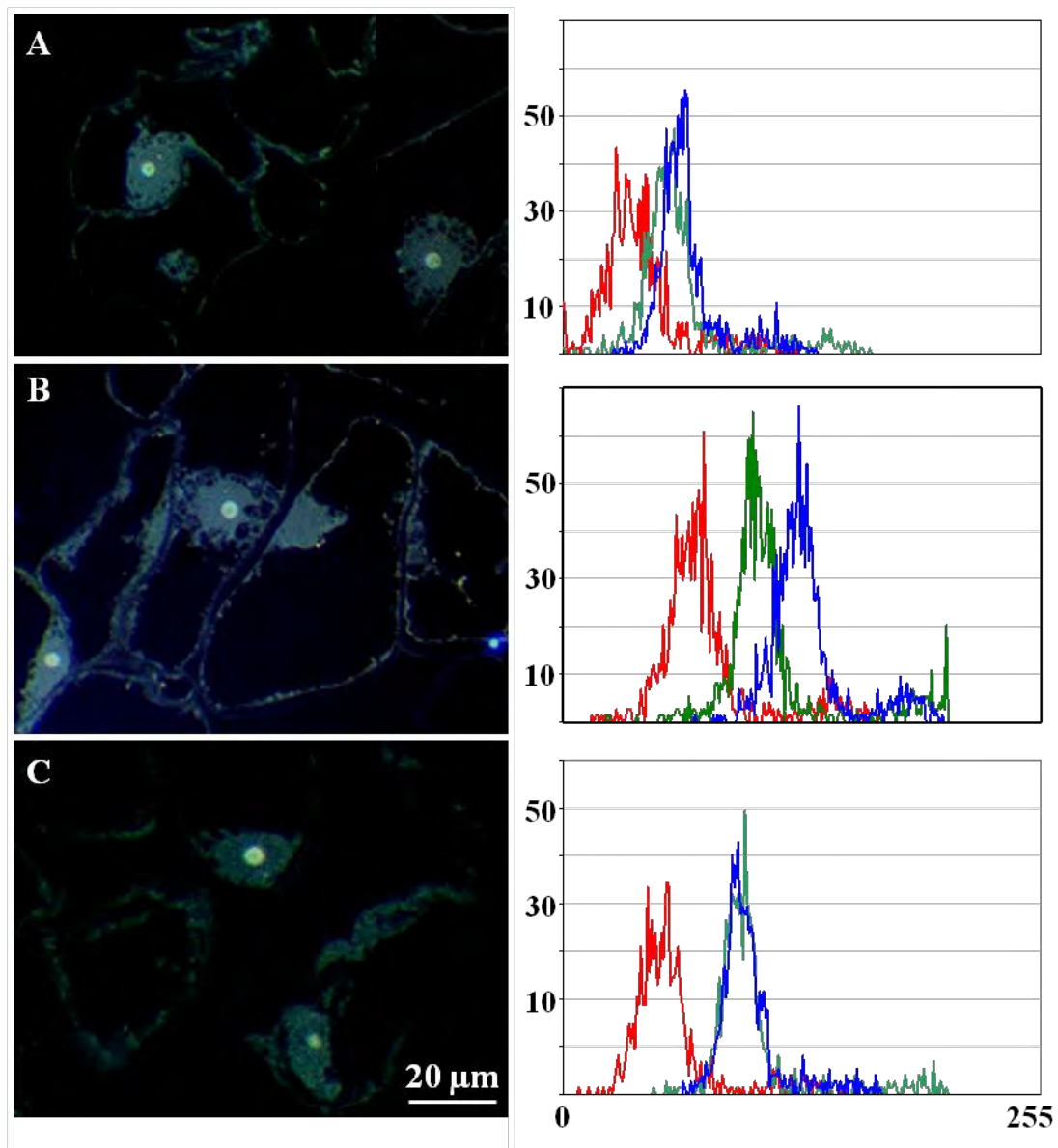
Nous avons ensuite voulu tester l'impact de l'intensité du stimulus, *i.e.* la concentration de cryptogéine, sur la viabilité cellulaire. Des cellules élicitées pendant 24 heures avec 0,1 ou 1  $\mu\text{M}$  de cryptogéine ne montrent aucune différence significative en terme de viabilité cellulaire (figure II-10 B). Ainsi, on observe une mortalité de l'ordre de 70% dans les deux cas de figure. L'ajout de 1 mM de  $\text{LaCl}_3$  préalablement au traitement cryptogéine permet de montrer que l'induction de la mort cellulaire est un phénomène  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant. En effet, le blocage de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule par le  $\text{LaCl}_3$  restaure en grande partie la viabilité cellulaire observée dans des cellules contrôle (figure II-10 B). Par ailleurs, le blocage de l'influx calcique 10 minutes après élicitation par la cryptogéine (la variation calcique correspondant au premier pic de  $\text{Ca}^{2+}$  est donc conservée) restaure complètement la viabilité des cellules, suggérant que le premier pic calcique n'est pas impliqué dans la mort cellulaire déclenchée par la cryptogéine (figure S5).

### II.2.3.7 Analyse comparative cryptogéine/oligogalacturonates

#### II.2.3.7.1 Contexte bibliographique

Durant les interactions plantes-microorganismes, des fragments oligosaccharidiques peuvent être générés par dépolymérisation de polysaccharides pariétaux (Côté et Hahn 1994 ; John *et al.* 1997). Ces fragments peuvent à leur tour éliciter des réponses de défense comprenant notamment le renforcement de la paroi cellulaire, la génération d'un burst oxydatif ou encore la synthèse de métabolites secondaires tels que les phytoalexines (pour revue Ridley *et al.* 2001). Parmi les fragments pectiques, les oligogalacturonates liés en  $\alpha$ -1,4-ont été montrés comme étant des DAMPs, susceptibles d'initier des réponses de défense (Côté et Hahn 1994 ; Ridley *et al.* 2001 ; Denoux *et al.* 2008). Tous les OGs ne sont pas susceptibles d'induire les défenses ; en effet, les oligomères d'un degré de polymérisation compris entre 10 et 15 sont les plus efficaces pour l'élicitation des défenses (Darvill *et al.* 1992). Toutefois, des OGs avec un degré de polymérisation inférieur peuvent également induire les défenses comme cela a pu être montré chez la pomme de terre (Wegener *et al.* 1996).

Les OGs, dont la perception est prise en charge par une kinase pariétale (WAK1 pour Wall-Associated Kinase 1 ; Brutus *et al.* 2010), induisent en particulier des gènes impliqués dans le métabolisme du jasmonate et de l'éthylène mais également un grand nombre de gènes impliqués dans les modifications pariétales, suggérant un rôle important du remodelage de la paroi dans la défense (Moscatiello *et al.* 2006). Par ailleurs, il a été montré que la transduction du signal OGs était dépendante de la signalisation calcique. Des cellules de soja élicitées par des OGs mettent en place un signal calcique fort et transitoire qui précède notamment le choc oxydatif (Navazio *et al.* 2002). Enfin, il a été montré que les modifications transcriptionnelles induites par la perception de ces DAMPs étaient liées au bon déroulement de la signalisation



**Figure II-8. Détection de composés autofluorescents dans des cellules de tabac BY-2.**

Des cellules ont été traitées pendant 12 heures avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  (contrôle, A),  $0,1 \mu\text{M}$  de cryptogéine (B) ou  $0,1 \mu\text{M}$  de cryptogéine +  $1 \text{ mM}$  de  $\text{LaCl}_3$  (C). L'autofluorescence des cellules a été observée à une longueur d'onde de  $425 \text{ nm}$  après excitation à  $340\text{-}380 \text{ nm}$ . Une image représentative de chaque condition (après soustraction du fond) est présentée dans la colonne de gauche. Les spectres d'intensité dans les 3 canaux rouge, vert et bleu ont été extraits et sont présentés dans la colonne de droite.

calcique ainsi qu'à des événements de phosphorylation essentiels à la génération de ce signal (Moscatiello *et al.* 2006).

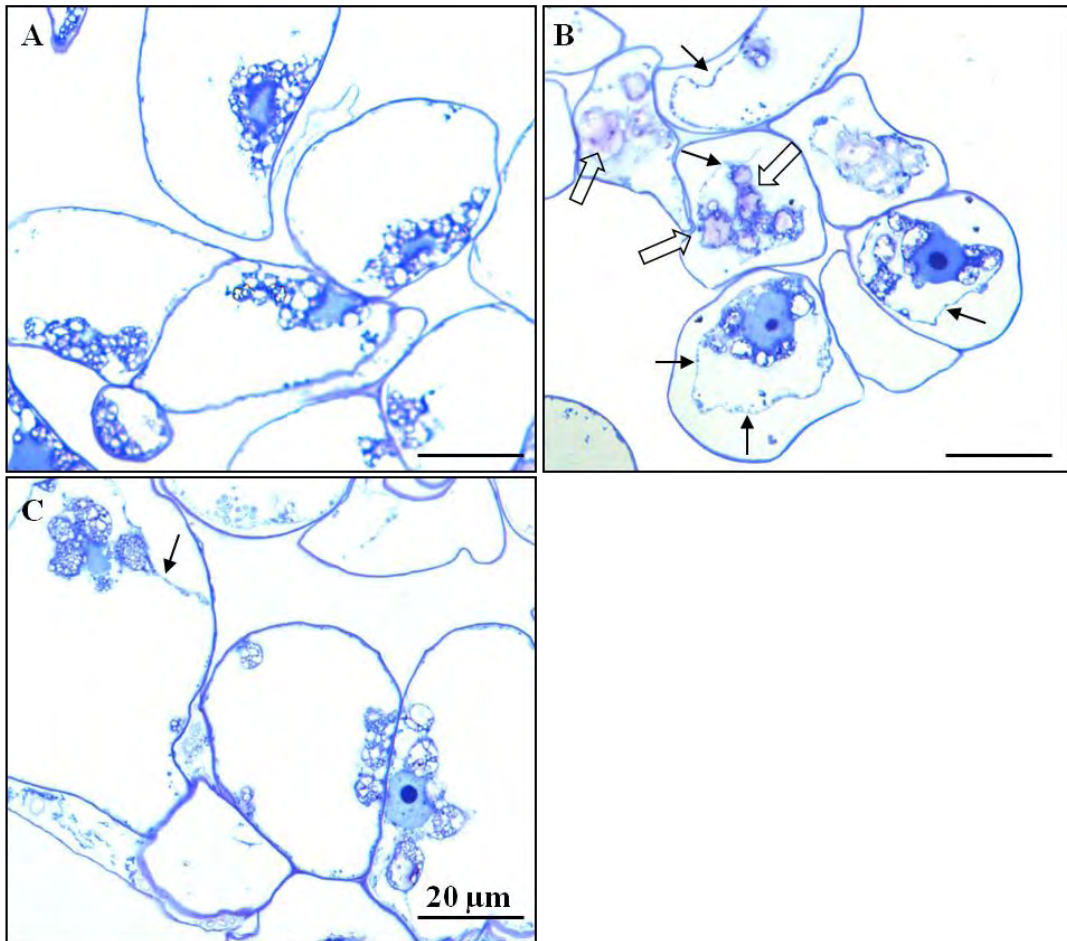
En revanche, et à l'inverse de la cryptogéine, les oligogalacturonates (OGs) n'induisent pas de mort cellulaire programmée, quelque soit leur degré de polymérisation. Dans le but de comparer deux types d'éliciteurs induisant une réponse finale différente, nous avons traité des cellules de tabac BY-2 avec différentes concentrations d'OGs et analysé les effets induits sur le métabolisme des phénylpropanoïdes, tant en terme d'expression génique que d'activité enzymatique.

#### II.2.3.7.2 Les oligogalacturonates induisent une réponse calcique biphasique dans des cellules de tabac BY2.

La réponse aux OGs est caractérisée par une variation bimodale de  $Ca^{2+}$  cytosolique, avec un premier pic très précoce, moins de 2 minutes après élicitation, et un second pic très proche, 1 à 2 minutes après le premier. Le premier pic a une amplitude bien plus grande (~ 1,8  $\mu$ M) que le second (~ 0,8  $\mu$ M). Puis, la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  décroît graduellement jusqu'au retour à un niveau basal dans les 30 minutes (figure II-11). Il n'y a donc pas de phase de plateau calcique prolongé dans le temps comme il a pu être observé en réponse à la cryptogéine. De manière intéressante, alors que le signal induit par la cryptogéine croît de manière continue proportionnellement à la concentration d'éliciteur (cf. figure 1), la courbe dose-réponse induite par les OGs a une forme en cloche, de telle sorte que la valeur du premier pic de  $Ca^{2+}$  augmente rapidement (IC 50 à 20  $\mu$ g / ml) jusqu'à 2  $\mu$ M pour des concentrations d'OGs comprises entre 100 et 150  $\mu$ g / ml, puis décroît pour des concentrations supérieures (figure II-12). Le même type de courbe est observé pour le second pic dont la valeur varie de la même manière que celle du premier pic (figure II-12). Le signal calcique ainsi généré est dépendant d'un influx de  $Ca^{2+}$  dans la mesure où un traitement au  $LaCl_3$  supprime la totalité de la réponse.

#### II.2.3.7.3 Les oligogalacturonates induisent une faible accumulation des transcrits de quelques gènes de la voie des phénylpropanoïdes.

Pour déterminer les relations entre l'intensité du stimulus (*i.e.* la concentration en OGs) et l'accumulation des transcrits, des expériences dose-réponse ont été réalisées. Des cellules de tabac BY2 ont été élicitées pendant 4 heures avec 3 concentrations différentes d'OGs (10  $\mu$ g / ml ; 100  $\mu$ g / ml et 1 mg / ml). Ces cellules ont ensuite été utilisées pour une analyse de la transcription des gènes de la voie des phénylpropanoïdes par RT-qPCR. Le niveau de transcrits de certains gènes de la voie des phénylpropanoïdes est légèrement augmenté après un traitement OGs, la dose optimale étant la dose intermédiaire de 100  $\mu$ g / ml, celle-là même qui induit la plus grande variation calcique (figure II-13). Une élicitation avec 10  $\mu$ g / ml d'OGs n'induit que très faiblement l'expression (~ x2) de seulement 2 gènes,



**Figure II-9. Coloration au bleu de toluidine de cellules de tabac BY-2.**

Des cellules ont été traitées pendant 12 heures avec de l'H<sub>2</sub>O (contrôle, A), 0,1 μM de cryptogéine (B) ou 0,1 μM de cryptogéine + 1 mM de LaCl<sub>3</sub> (C). Les flèches noires indiquent les zones de rétractation de la membrane plasmique. Les flèches blanches pointent les vésicules à contenu acide formées en réponse à la cryptogéine. Une image représentative est présentée pour chacun des 3 traitements.

*HCT* et *CCoAOMT*. Pour 100 µg / ml, les gènes *PAL*, *4CL*, *HCT*, *CCoAOMT* et *COMT* sont surexprimés (entre 2x et 6x) mais dans des proportions bien moindres qu'en réponse à la cryptogéine. Globalement, pour 1 mg / ml, l'expression des gènes considérés (hormis le couple *C3H-HCT*) revient à un niveau équivalent à celle observée en réponse à 10 µg / ml, suggérant l'existence d'une corrélation entre l'intensité du stimulus, l'intensité de la réponse calcique et l'importance de l'accumulation de transcrits. Les gènes *CCR* et *C4H* ne sont pas différenciellement exprimés par rapport au traitement contrôle alors que le gène *CAD* semble lui réprimé en réponse aux OGs (figure II-13).

L'ajout de  $\text{LaCl}_3$  (1 mM) aux suspensions cellulaires avant traitement inhibe totalement les faibles activations d'expression rapportées ci-dessus et supprime également l'inhibition du gène *CAD* (figure II-14).

Par ailleurs, une cinétique d'activation des gènes *PAL*, *HCT* et *CCoAOMT* a permis de confirmer que le gène *CCoAOMT* était le gène le plus activé en réponse aux OGs (figure II-15). Les gènes *CCoAOMT* et *HCT* semblent très légèrement activés dès 30 minutes de traitement bien que la significativité du résultat ne puisse être affirmée. Pour les gènes *HCT* et *CCoAOMT*, le maximum d'activation intervient après 4 heures de traitement alors que l'accumulation des transcrits du gène *PAL* augmente continuellement entre 0.5 et 8 heures. De manière générale, l'activation des gènes de la voie des phénylpropanoïdes est extrêmement faible en réponse aux OGs comparativement à la réponse à la cryptogéine.

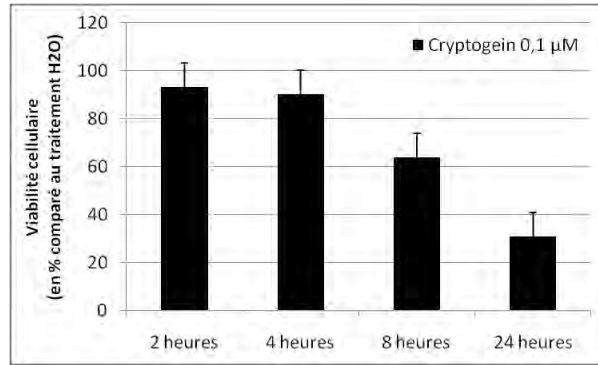
#### II.2.3.7.3 Les activités enzymatiques de la PAL et de la CCoAOMT sont très légèrement modifiées par les OGs.

Afin d'évaluer la corrélation entre accumulation de transcrits et activité protéique, les activités enzymatiques de la PAL et de la CCoAOMT ont été mesurées pour des cellules de tabac élicitées par 100 µg / ml d'OGs. Les activités enzymatiques de la PAL et de la CCoAOMT en réponse aux OGs sont relativement semblables et indiquent que ces deux enzymes sont très peu sensibles à l'élicitation par les OGs (1.4x par rapport à une situation contrôle ; figure II-16). Un prétraitement au lanthane supprime totalement la faible activation mesurée ci-dessus (figure II-16), indiquant que le  $\text{Ca}^{2+}$  jouerait un rôle dans l'activation des enzymes. La faible activation des enzymes est parfaitement corrélée à la faible activation de l'expression des gènes correspondants.

#### II.2.3.7.4 Les OGs induisent une très faible accumulation de composés phénoliques solubles.

De même qu'en réponse à la cryptogéine (cf. chapitre II.2.4.3 et figure II-3), le gène *ODC* codant pour une enzyme responsable de la biosynthèse de la putrescine est aussi activé en réponse à un traitement de 4 heures aux OGs (x4 avec 100 µg / ml d'OGs).

(A)



(B)

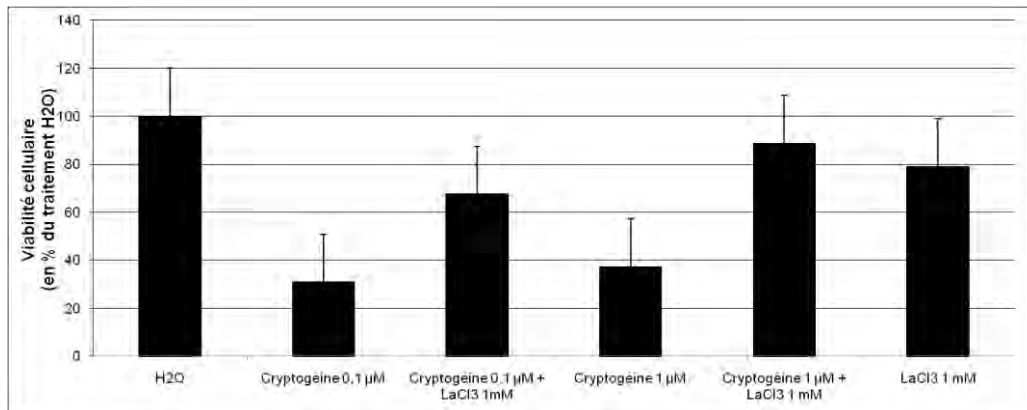


Figure II-10. Effets de la cryptogéine sur la viabilité cellulaire.

(A) Cinétique de diminution de la viabilité cellulaire dans des cellules de tabac BY2 élicitées par 0,1 μM de cryptogéine. La viabilité cellulaire a été mesurée après 2, 4, 8 ou 24 heures de traitement et est exprimée en % de la viabilité cellulaire d'une culture contrôle (moyennes de 3 expériences biologiques ± SD). (B) Dose-dépendance et rôle du calcium dans la diminution de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire a été mesurée après 24 heures de traitement par 0,1 μM ou 1 μM de cryptogéine additionné ou non de 1 mM de LaCl<sub>3</sub>. La viabilité est exprimée en % par rapport à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O (moyennes de 3 expériences biologiques ± SD).

Afin de savoir si des composés phénoliques solubles peuvent être impliqués dans les réponses de défense liées à la perception des OGs, nous les avons dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ces analyses ont permis de montrer que les oligogalacturonates induisaient une très légère accumulation de phénols solubles comparativement à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O (figure II-17). En effet, la compilation des résultats de 4 expériences biologiques indépendantes indique que dans des cellules traitées par de l'H<sub>2</sub>O, la quantité de phénols solubles est en moyenne de  $404 \pm 25 \mu\text{g} / \text{g}$  de cellules (poids sec) alors que dans des cellules traitées par  $0,5 \mu\text{M}$  de cryptogéine elle est en moyenne de  $452 \pm 10 \mu\text{g} / \text{g}$ .

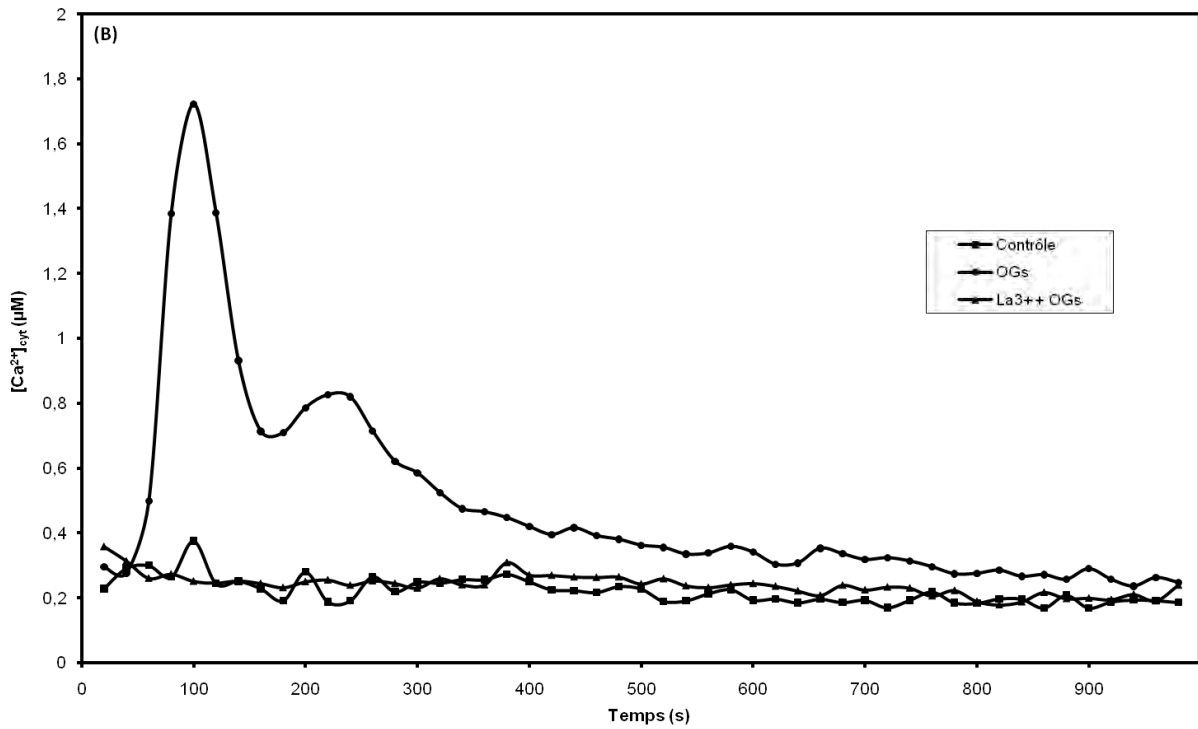


Figure II-11. **Cinétique de la variation calcique cytosolique induite dans des cellules de tabac BY-2 par les OGs.**

Les cellules ont été élicitées par de l'H<sub>2</sub>O (contrôle), 100 µg / ml d'OGs ou 100 µg / ml d'OGs + 1 mM de lanthane.

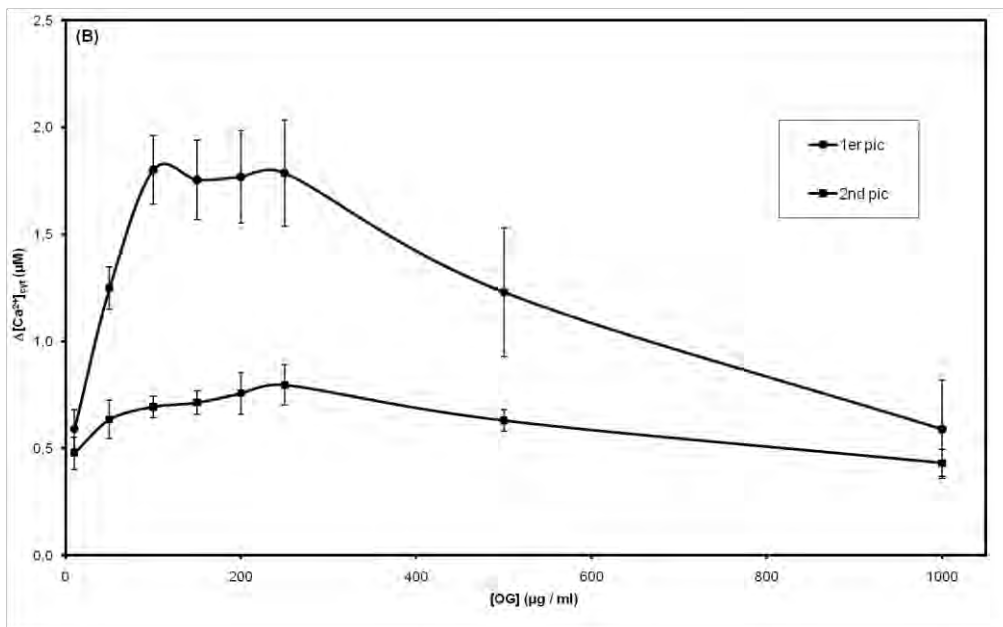


Figure II-12. **Etude de la dose-dépendance des variations calciques cytosoliques induites par les OGs dans des cellules de tabac BY2.**

Les données sont exprimées comme la moyenne de 3 expériences biologiques ( $\pm$ SE).



## II.2.4 Discussion générale et perspectives sur le modèle cryptogéine-phénylpropanoïdes

### *Cryptogéine et gènes de la voie des phénylpropanoïdes*

La cryptogéine induit dans des cellules de tabac BY-2 une augmentation importante du niveau de transcrits de la quasi-totalité des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Les ratios d'induction varient de 4 (pour la *C4H*) à plus de 100 (pour la *CCoAOMT*) avec cependant une exception notable : le gène codant la *CAD*, dernière enzyme de la voie conduisant à la synthèse de monomères de lignine, n'est non seulement pas activé, mais semble même réprimé pour de fortes concentrations en éliciteur. Une telle augmentation du niveau de transcrits des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (notamment *PAL*, *4CL*, *CCoAOMT*, *C4H*) a déjà été observée en réponse à des éliciteurs dans divers modèles végétaux (Kauss *et al.* 1993 ; Dixon et Paiva 1995 ; Suzuki *et al.* 2003 ; Hano *et al.* 2006 ; Shinya *et al.* 2007).

Toutefois, la plupart des enzymes de la voie étant codées chez le tabac par des familles multigéniques comprenant entre 2 et plusieurs dizaines d'isoformes, il est connu que la spécificité de réponse peut être encodée par la modulation différentielle de l'expression des différents membres d'une même famille. Ainsi, comme cela avait pu être montré chez le tabac (Taguchi *et al.* 1998), deux grandes classes de gènes codant pour une activité *PAL* coexistent dans les cellules de tabac BY2 : l'une est particulièrement impliquée dans les réponses de défense et est fortement activée par la cryptogéine (*PAL A*), l'autre est plutôt impliquée dans les processus développementaux et n'est que peu modulée (*PAL B*). La *4CL* est aussi issue de la transcription de petites familles multigéniques divisées en deux sous-classes fonctionnelles (Lee et Douglas 1996). La cryptogéine induit l'expression du gène de la classe 2 (*4CL2*), le gène de la classe 1 (*4CL1*) n'étant tout simplement pas modulé. La *CCoAOMT* compte chez le tabac au moins 6 gènes regroupés au sein de 3 classes fonctionnelles (Maury *et al.* 1999 ; Pinçon *et al.* 2001). En réponse à la cryptogéine, ce sont les isoformes de la classe I qui sont préférentiellement activées alors que les isoformes des classes II (*CCoAOMT 5*) et III (*CCoAOMT 6*) ne le sont que très faiblement. En ce qui concerne le gène *CAD*, il semblerait que là aussi les cellules de tabac BY-12 soient capables de moduler « qualitativement » leur activité alcool déshydrogénase. En effet, si la *CAD* canonique ne semble pas impliquée dans les réponses de défense des plantes, des *CAD* à chaîne courte, aussi appelées *CAD-like* ou encore protéines *ELI* (pour *ELI*cited) sont en revanche activées. En effet, nous avons identifié chez BY-2 trois séquences codant pour des protéines homologues à des *ELI* identifiées chez *Arabidopsis* et chez le persil dans le cadre d'interactions plantes pathogènes (Schmelzer *et al.* 1989 ; Tronchet *et al.* 2010). Ces séquences sont fortement activées en réponse à la cryptogéine (jusqu'à 40 x après 4 heures de traitement ; *cf.* publication 2). Ces résultats confirment l'existence d'une véritable spécificité de réponse encodée au sein même du génome et permettant à la plante une très grande plasticité transcriptionnelle.

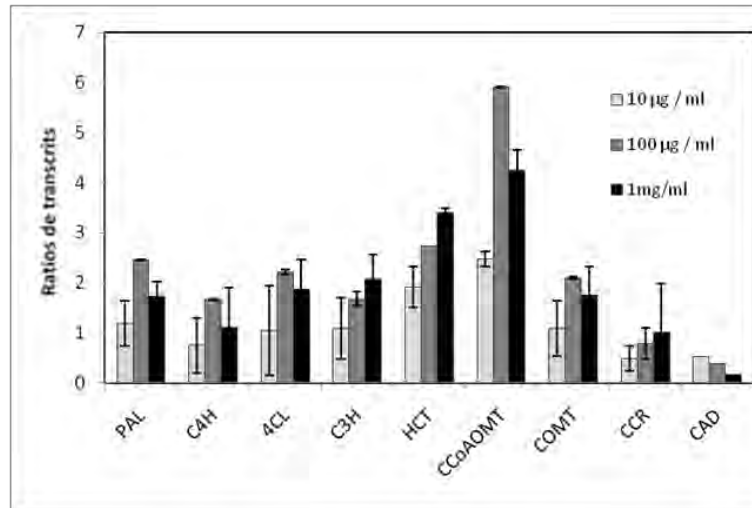


Figure II-13. **Dose-dépendance de l'accumulation de transcrits de gènes de la voie des phénylpropanoïdes en réponse aux OGs.**

Ratios de transcrits de gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans des cellules de tabac BY2 élicitées pendant 4 heures par 10 µg / ml (barres gris clair), 100 µg / ml (barres gris foncé) ou 1 mg / ml (barres noires) d'OGs. Ces résultats ont été obtenus par RT-PCR quantitative, le niveau de transcrits a été normalisé avec l'expression du gène de ménage *18S* et par rapport à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O. Les données sont exprimées comme la moyenne de 2 répétitions biologiques ± SE.

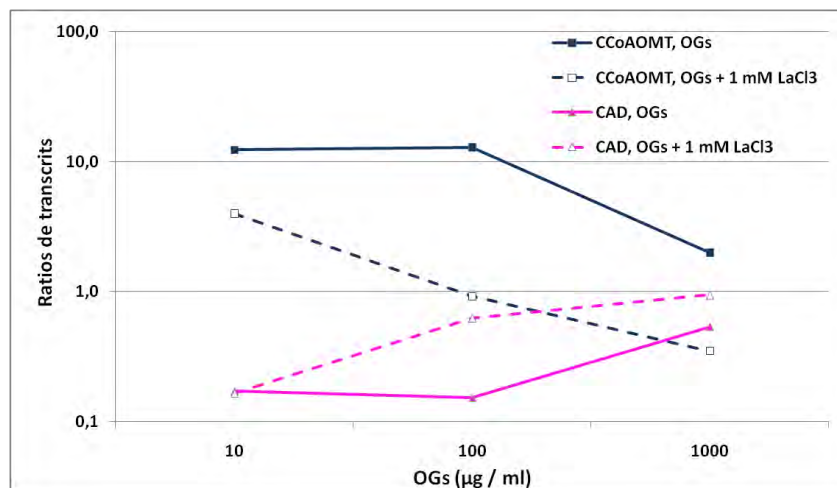


Figure II-14. **Effet du lanthane sur l'accumulation de transcrits des gènes CCoAOMT et CAD induite par les OGs.**

Ratios d'expression des gènes CCoAOMT (courbes bleues) et CAD (courbes roses) dans des cellules de tabac BY2 élicitées pendant 4 heures par 10, 100 ou 1000 µg / ml d'OGs avec ou sans prétraitement avec 1 mM de LaCl<sub>3</sub>. Ces résultats ont été obtenus par RT-PCR quantitative, le niveau de transcrits a été normalisé avec l'expression du gène de ménage *18S* et par rapport à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O. Une expérience biologique représentative de 2 est montrée.

Le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, a été utilisé afin de déterminer si l'activation transcriptionnelle des gènes de la voie des phénylpropanoïdes dépendait d'une néo-synthèse protéique. Les résultats obtenus indiquent que l'activité transcriptionnelle mise en place après la perception de l'éliciteur requiert une synthèse protéique *de novo*, et suggère que les protéines nécessaires à la transduction du signal et/ou à la régulation de cette réponse transcriptionnelle ne sont pas originellement présentes dans la cellule. Des expériences de run-on permettraient de préciser la nature de la régulation transcriptionnelle à l'origine de la variation de transcrits observée pour les gènes de la voie des phénylpropanoïdes. En particulier, il s'agirait de déterminer si l'augmentation du niveau de transcrits est dû plutôt à une modulation de la dégradation des ARNs ou à une activation de la transcription proprement dite.

La transcription du gène *hsr203J*, un marqueur de la HR chez le tabac (Pontier *et al.* 1994), est également fortement activée par le traitement cryptogéine, corrélant des données obtenues en 2002 (Lecourieux *et al.* 2002). En revanche, les gènes *PR1* et *PR3*, codant pour des protéines PR impliquées dans les réponses de défense SA-dépendantes chez les plantes (Ward *et al.* 1991 ; Keller *et al.* 1996a et b) ne sont pas induits. Ces résultats sont en accord avec le fait que les voies dépendantes de l'acide salicylique ne semblent pas impliquées dans la réponse de « HR-like » induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac (Keller *et al.* 1996b).

#### *Modifications du métabolisme phénolique*

Dans les cellules de tabac BY-2, la cryptogéine induit de manière précoce une accumulation de composés phénoliques liés à la paroi (acide *p*-coumarique, acide férulique, acide 5-hydroxyférulique et 4-hydroxybenzaldéhyde). L'accumulation de phénylpropanoïdes liés à la paroi en réponse aux éliciteurs est une réponse de défense souvent décrite comme un renforcement de la barrière à la fois chimique et mécanique que constitue la paroi. Par exemple, il a été montré que des cellules de haricot élicitées par des fragments de paroi de *Colletotrichum lindemuthianum* accumulaient dans leurs propres parois du matériel phénolique lié aux fractions celluloses et héli-cellulosiques (Bolwell *et al.* 1985) ou encore que du matériel phénolique pourrait participer au renforcement de la paroi *via* la production de lignines défensives de type G ou S ou la synthèse de scopolétine, une coumarine impliqué dans les interactions pathogènes-tabac (Chong *et al.* 2002 ; Gachon *et al.* 2004). Certains des composés liés identifiés dans notre étude ont été également trouvés dans des cellules traitées avec des fractions élicitrices d'oomycètes ; par exemple, des extraits de *Phytophthora megasperma* induisent chez le persil l'accumulation pariétale d'acide 4-coumarique, d'acide férulique, d'acide 4-hydroxybenzoïque et de vanilline (Kauss *et al.* 1993). Un extrait de *Phytophthora infestans* est également capable d'éliciter des cultures cellulaires de la pomme de terre et d'induire l'accumulation de 4-hydroxybenzaldéhyde et d'amides de la tyramine liés à la paroi (Keller *et al.* 1996c).

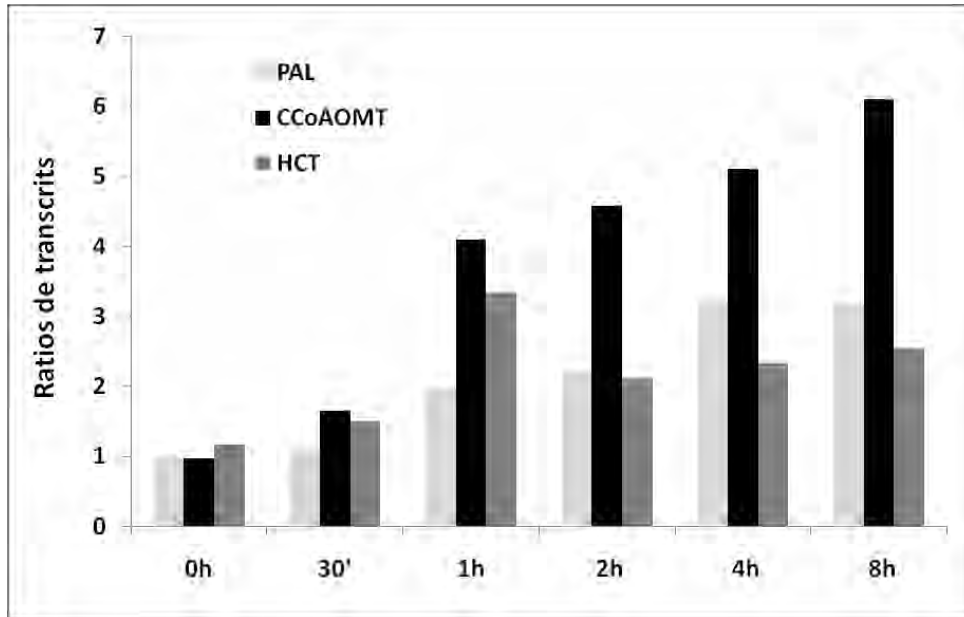


Figure II-15. **Cinétique d'activation des gènes *PAL*, *HCT* et *CCoAOMT* en réponse aux OGs.**

Ratios de transcrits des gènes *PAL*, *HCT* et *CCoAOMT* dans des cellules de tabac BY2 élicitées pendant 0.5, 1, 2, 4 ou 8 heures par 100 µg / ml d'OGs. Ces résultats ont été obtenus par RT-PCR quantitative, le niveau de transcrits a été normalisé avec l'expression du gène de ménage *18S* et par rapport à un traitement contrôle H<sub>2</sub>O. Une expérience biologique représentative de 2 est montrée.

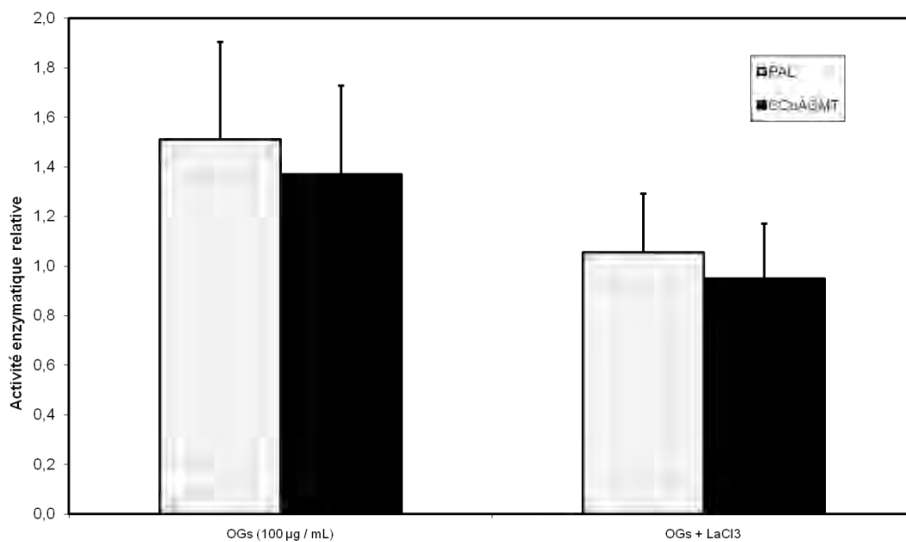


Figure II-16. **Activités enzymatiques de la *PAL* et de la *CCoAOMT*.**

Les activités ont été mesurées à partir d'extraits protéiques totaux issus de cellules de tabac BY-2 élicitée pendant 4 heures par 100 µg / ml d'OGs. Les activités relatives sont exprimées par rapport à celles mesurées dans des extraits de cellules contrôle traitées à l'H<sub>2</sub>O. Activité enzymatique moyenne ± SE (n=3).

Dans la mesure où le niveau de transcrits du gène *CAD* est légèrement diminué en réponse à la cryptogéine alors que pour la plupart des autres gènes de la voie des phénylpropanoïdes, il est augmenté, il est concevable d'imaginer que le substrat de la *CAD* (i.e. coniféraldéhyde) ne soit pas converti en alcool coniférylique mais plutôt transformé en acide férulique par oxydation. Une telle activité enzymatique (i.e. hydroxycinnamaldéhyde déhydrogénase) a été caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* (REF1, AtALDH2C4 ; Nair *et al.* 2004). L'identification de cette enzyme a modifié l'approche conventionnelle des flux métaboliques intervenant dans la voie des phénylpropanoïdes ; le férulate et le sinapate étant considérés alors comme des produits de l'oxydation du coniféraldéhyde et du sinapaldéhyde plutôt que des précurseurs de leur synthèse. Cette hypothèse (selon laquelle le férulate lié à la paroi proviendrait de la transformation du coniféraldéhyde) est par ailleurs renforcée par le fait que nous avons récemment identifié une séquence de tabac fortement homologue à AtALDH2C4 qui est largement surexprimée dans des cellules BY-2 traitées par la cryptogéine. Une accumulation accrue de 4-hydroxybenzaldéhyde a également été observée dans des cellules traitées à la cryptogéine. Bien que l'origine de ce composé soit inconnue, il a été proposé l'existence d'une activité 4-hydroxybenzaldéhyde synthase chez le tabac. Une telle activité enzymatique, capable de convertir l'acide 4-coumarique en hydroxybenzaldéhyde, a été caractérisée dans des cultures de *Vanilla planifolia* (Podstolski *et al.* 2002) et dans des cultures de poils racinaires de carotte (Sircar et Mitra 2008). Ensembles, ces résultats montrent clairement une réorientation du métabolisme des phénylpropanoïdes en réponse à la cryptogéine, résultant en l'incorporation de composés phénoliques néo-synthétisés liés à la paroi. Cette modulation du métabolisme conduit vraisemblablement au renforcement de la paroi cellulaire. De plus, ces résultats ont permis de faire l'hypothèse d'une nouvelle voie possible pour la synthèse d'acide férulique dans des cellules de tabac BY-2.

En revanche, aucune différence significative n'a été constatée au niveau des composés phénoliques solubles accumulés 4 heures après traitement quelle que soit la méthode de mesure utilisée (radiotraçage, dosage colorimétrique ou HPLC). En particulier, deux phénolamines, la CP et la FP, considérées comme des composés marqueurs des réponses de défense au MJ (Galis *et al.* 2006) et aux Aa glucans (Shinya *et al.* 2007) chez des cellules de tabac BY-2, ne sont pas différenciellement accumulés en réponse à un traitement cryptogéine. Pourtant, le gène *ODC*, codant pour la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de la putrescine, est fortement activé en réponse à la cryptogéine, suggérant un renforcement de la capacité de la cellule à synthétiser de la putrescine. La surexpression du gène *ODC*, que l'on peut supposer corrélée à une biosynthèse augmentée de putrescine, pourrait n'avoir pour but que de fournir un des substrats essentiels pour la production de phénolamines dont la fonction amine est portée par une amine aromatique de type tyramine. Ces phénolamines sont insolubles et ne peuvent pas être détectés dans la fraction soluble d'extraits phénoliques ; ils sont en fait généralement estérifiés à la paroi et participent à son renforcement. Ainsi, des

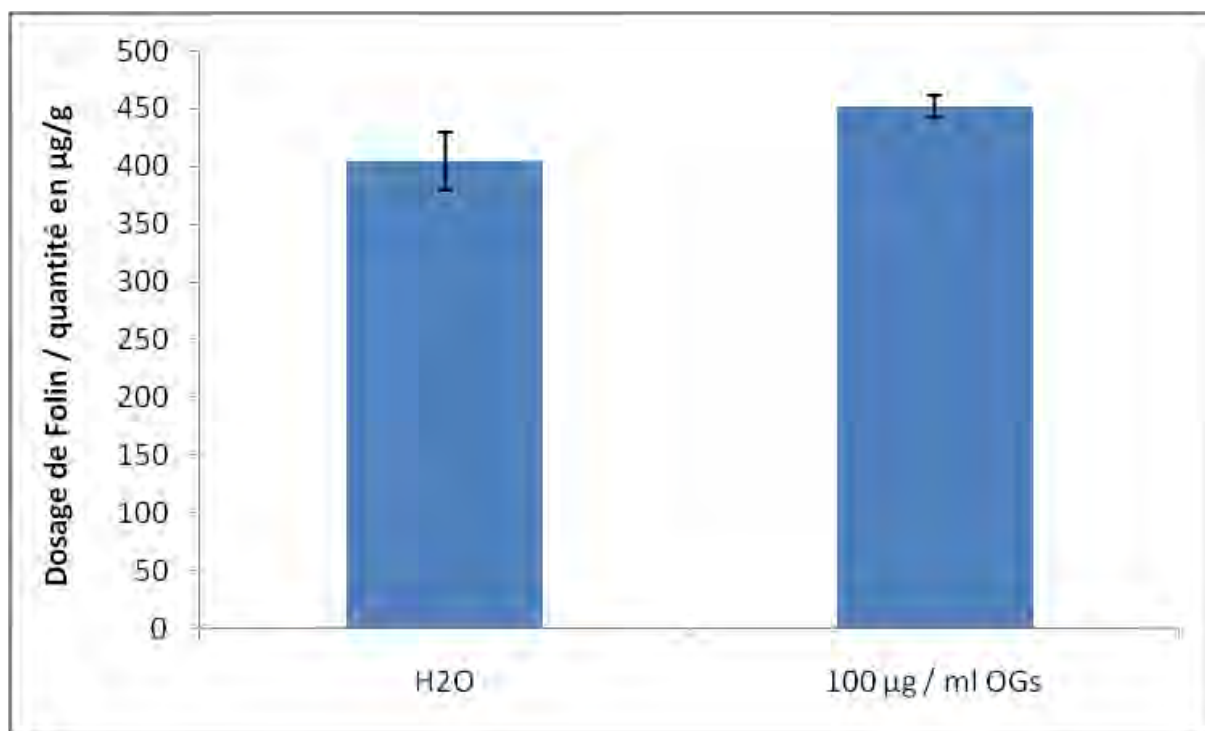


Figure II-17. **Dosage des composés phénoliques solubles totaux dans des cellules de tabac BY-2.**

Analyse par la méthode de Folin-Ciocalteu de fractions phénoliques extraites de cellules de tabac BY2 traitées par de l'H<sub>2</sub>O ou 100 µg / ml d'OGs. Les données sont exprimées comme la moyenne de 4 répétitions biologiques indépendantes ± SD.

cultures cellulaires de pomme de terre élicitées par des  $\beta$ -1,3 oligosaccharides accumulent préférentiellement des amides de tyramine comme la féruloyltyramine et voient en revanche leurs taux de phénols solubles tels que CP et FP diminuer au cours du temps (Matsuda *et al.* 2005). Toutefois, nous n'avons pas identifié d'amides de tyramine dans la paroi de cellules de tabac BY-2 élicitées par la cryptogéine bien que le gène THT codant pour la Tyramine N-Hydroxycinnamoyl Transferase soit fortement activé (x 11 ; *cf.* publication 2).

Outre les composés phénoliques solubles et les composés phénoliques liés à la paroi, nous avons tenté de mesurer les composés phénoliques volatils. En effet, il a été montré chez la tomate que des composés volatils tels que le phényléthanol et le phénylacétaldéhyde pouvaient se former par décarboxylation de la phénylalanine (Tieman *et al.* 2006). De tels composés sont synthétisés *via* l'action de décarboxylases utilisant la phénylalanine ou la tyrosine comme donneur de cycle aromatique. Cette voie de biosynthèse est très méconnue mais une tyrosine décarboxylase a déjà été caractérisée en réponse à un oomycète (Kawalleck *et al.* 1993), suggérant l'implication potentielle de composés volatils dans la défense des plantes. Dans les cellules de tabac BY-2 élicitées par la cryptogéine, nous avons montré que les gènes *NtAADC1A* et *NtAADC2*, orthologues putatifs des décarboxylases identifiées chez la tomate (Tieman *et al.* 2006), étaient fortement activés. La réaction enzymatique faisant intervenir ces décarboxylases libère du CO<sub>2</sub>, nous avons donc mesuré le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> synthétisé au cours de la réaction afin d'évaluer le rôle potentiel de phénylpropanoïdes volatils dans les défenses des plantes. Quelque soit la source radioactive fournie ([<sup>14</sup>C(U)]-L-phénylalanine ou acide [<sup>14</sup>C(U)]-cinnamique), la quantité de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> émise n'est pas modifiée significativement par la perception de la cryptogéine. En revanche, il semble bien qu'un dégagement de CO<sub>2</sub> se produise dans les cellules de tabac BY-2, y compris dans les fioles témoin. Il semblerait donc que malgré l'activation des gènes par la cryptogéine, cette réaction ne soit pas déterminante dans la réponse de défense. Une autre explication pourrait provenir du fait que, dans les conditions de notre expérience de piégeage de CO<sub>2</sub> radioactif, les cultures cellulaires soient déjà en situation de stress telle qu'une sur-activation du processus de biosynthèse de composés volatils soit impossible.

#### Modifications cellulaires induites par la cryptogéine

Il s'agissait dans ces analyses d'une étude préliminaire visant à mieux caractériser les cellules de tabac BY-2 se préparant à subir une « HR-like » en réponse à la cryptogéine. Des plants de blé dont la CCoAOMT a été éteinte montrent une nette diminution du contenu en matériel autofluorescent, laquelle diminution a été corrélée à une baisse de la résistance du blé face à une attaque de *Blumeria graminis* (Bhuyan *et al.* 2009). Le contenu en matériel fluorescent de cellules de tabac est augmenté en réponse à la cryptogéine. Ceci suggère que l'éliciteur fongique a un effet important sur la composition en composés aromatiques accumulés dans la cellule. En revanche, il est remarquable de constater que ce contenu





fluorescent s'accumule non pas dans les parois mais dans des sortes de vésicules proches de la zone nucléaire. Ce matériel aromatique, contenant potentiellement un noyau phénylpropane, est encore présent 12 heures après le début du traitement dans des vésicules de la zone nucléaire, alors que des phénylpropanoïdes sont retrouvés liés à la paroi en quantité importante dès 4 heures de traitement. Il semblerait donc que les composés phénoliques retrouvés liés à la paroi en réponse à la cryptogéine ne dérivent pas forcément de ceux visualisés en autofluorescence dans des vésicules péri-nucléaires. On ne retrouve donc pas de suraccumulation de composés autofluorescents dans la paroi en réponse à la cryptogéine bien qu'il ait été montré une accumulation de composés phénoliques liés dès 4 heures de traitement. Une autre des explications possibles tient au fait que la sensibilité des deux méthodes est très différente ; la LC-MS utilisée pour caractériser les composés liés à la paroi permettant une analyse bien plus fine des variations observables.

Une coloration au bleu de toluidine capable de révéler les structures de la cellule montre la présence de structures vésiculaires colorées en rose pâle, indiquant que leur contenu serait de nature acide. La présence de ces structures non observées dans les cellules témoins est conditionnée à la continuité de l'influx calcique généré par la cryptogéine. A ce stade des observations, on ne peut que spéculer sur la nature des vésicules et de leur contenu. Il pourrait s'agir de grains d'amidon subissant un emballement du métabolisme suite à la perception de la cryptogéine ; une coloration au Lugol, un composé capable de révéler la présence d'amidon dans ces vésicules permettrait de tester cette hypothèse.

#### *Le calcium contrôle les réponses induites par la cryptogéine*

Nos résultats montrent que les gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes appartiennent à deux classes distinctes qui répondent différemment à la cryptogéine. L'expression de ces deux classes de gènes diffère selon leur sensibilité à l'intensité du stimulus (*i.e.* la concentration en cryptogéine) et leur corrélation à une phase particulière de la signature calcique (premier pic et/ou plateau). En effet, l'influx prolongé de  $Ca^{2+}$  responsable de la prolongation dans le temps du signal calcique cytosolique (plateau) est indispensable pour l'activation de l'expression des gènes induits par une faible concentration de cryptogéine (*i.e.* *PAL*, *HCT* and *CCoAOMT*). Il existe donc une corrélation positive, pour une faible concentration de cryptogéine, entre le plateau calcique et l'accumulation de transcrits de ces gènes alors que pour une plus forte concentration, l'amplitude du premier pic calcique est inversement proportionnelle à l'intensité de l'expression génique. En revanche, l'activation des gènes *C4H*, *4CL*, *C3H*, *COMT* and *CCR* semble être corrélée avec une induction par de fortes concentrations de cryptogéine. De plus, il semble que le premier pic calcique précoce soit en majeure partie responsable de cette réponse transcriptionnelle. Une telle diversité dans la sensibilité de réponse, à la fois à la concentration de cryptogéine et aux différentes composantes de la signature calcique, pourrait être un outil permettant à la plante d'activer sélectivement différents gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes.



Pour expliquer cette observation, diverses hypothèses peuvent être envisagées. L'une d'elles serait de considérer que les différents pools calciques impliqués dans la génération de la signature calcique cryptogéine-dépendante (Lecourieux *et al.* 2002 ; Kadota *et al.* 2004 ; Garcia-Brugger *et al.* 2006) contribuent de manière différentielle aux réponses biologiques en aval. Cependant, cette hypothèse qui s'appuie uniquement sur les variations d'intensité du premier pic calcique, ne permet pas d'expliquer à elle seule le rôle essentiel du « plateau » calcique. Par ailleurs, nos simulations d'un modèle à deux composantes suggèrent plutôt l'existence de deux modules de décodage du signal calcique, ayant des affinités basse et haute pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , et jouant un rôle inhibiteur ou activateur sur les réponses induites (transcription notamment).

Ce modèle est renforcé par l'effet spécifique de l'inhibiteur de calmoduline W13 qui augmente sur le niveau du plateau calcique et de la transcription, en réponse à de faibles concentrations en cryptogéine uniquement, et qui suggère l'implication de CAMs ou de CMLs dans le processus de transduction du signal cryptogéine. Pour expliquer cet effet, une hypothèse serait que le W13 inhibe l'activité de CaMBPs (CAMs, CMLs ou autres protéines à domaine EF-hand) impliquées dans le contrôle de l'homéostasie calcique (canaux ou pompes) et/ou dans la transduction du signal. En effet, il est connu que certains canaux calciques sont régulés par la CaM (Tadross *et al.* 2008) ; par ailleurs, les complexes  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM sont connus pour réguler certaines pompes calciques (Boursiac et Harper 2007). Donc, selon notre modèle, augmenter l'activité d'un canal ou inhiber une pompe résulterait en une augmentation de l'amplitude du niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (phase de plateau), qui pourrait ensuite activer des complexes de transcription  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants. Cet effet a pu être simulé dans notre modèle simplement en augmentant la valeur apparente de la constante d'affinité de la composante d'activation (figure 10). Quand la concentration en cryptogéine est plus importante ( $> 0,1 \mu\text{M}$ ), la composante activatrice est d'ores et déjà à son maximum et ne peut donc être augmentée ; en revanche, la composante inhibitrice peut encore accroître son amplitude, résultant ainsi en une réponse transcriptionnelle d'intensité inférieure à celle obtenue en réponse à de faibles concentrations de cryptogéine. Globalement, les composés anti-CaMs semblent provoquer une diminution de la valeur de la concentration en cryptogéine pour laquelle la réponse transcriptionnelle est maximale.

Les relations non linéaires entre la signalisation calcique et les réponses en aval soulignent la complexité des propriétés régulatrices de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  en tant que second messager et renforcent le concept de signature calcique, considérée ici comme un élément observable susceptible de donner un aperçu des processus impliqués dans la régulation calcique et supposés jouer un rôle dans le décodage de la spécificité des réponses finales. A ce propos, l'identification de facteurs de transcription  $\text{Ca}^{2+}$ - ou CaM-dépendants impliqués dans la régulation des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes devrait aider à améliorer la compréhension de l'ensemble des événements de signalisation liés à la perception de la cryptogéine.



*Les oligogalacturonates n'induisent pas le métabolisme des phénylpropanoïdes de cellules de tabac BY-2*

Les oligogalacturonates (OGs) induisent chez les cellules de tabac BY-2 une signature calcique caractérisée par deux pics très précoces et une absence de plateau prolongé dans le temps. A l'inverse de la cryptogéine, cette signature calcique, non seulement ne se prolonge pas dans le temps, mais répond de manière différente à l'intensité du stimulus. En effet, l'amplitude maximale des deux pics est atteinte pour une concentration en OGs intermédiaire.

Les OGs n'induisent que très partiellement et très faiblement l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes, confirmant des résultats obtenus chez *Arabidopsis* (Moscatiello *et al.* 2006). Les activités enzymatiques PAL et CCoAOMT ne sont pas significativement affectées non plus par la perception de l'éliciteur, suggérant ainsi que les voies de défense de la plante activées par les OGs ne nécessitent pas la mise en œuvre de la modulation du métabolisme des phénylpropanoïdes.



**Chapitre III. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF  
TOBACCO BY-2 CELLS ELICITED BY  
CRYPTOGEIN**





**Article 2. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TOBACCO BY-2 CELLS ELICITED BY CRYPTOGEIN REVEALS NEW POTENTIAL ACTORS OF CALCIUM-DEPENDENT AND CALCIUM-INDEPENDENT PLANT DEFENCE PATHWAYS.**

Nicolas Amelot<sup>1</sup>, François Dorlhac de Borne<sup>3</sup>, Hélène San Clemente<sup>2</sup>, Christian Mazars<sup>2</sup>, Jacqueline Grima-Pettenati<sup>2</sup>, Christian Brière<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Université de Toulouse ; UPS ; UMR 5546, Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux ; BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France.

<sup>2</sup> CNRS ; UMR 5546 ; BP 42617, F-31326, Castanet-Tolosan, France.

<sup>3</sup> Imperial Tobacco Group ; Institut du Tabac, Domaine de la Tour, LBCM, 24100, Bergerac, France.

### **III.1 Avant-propos**

Dans ce chapitre, je présente sous forme d'article r edig e en anglais, les données obtenues sur la modulation des profils transcriptomiques globaux des cellules de tabac BY-2 en réponse à la cryptogéine, et ceci en présence ou en absence de traitement au LaCl<sub>3</sub>.

Les objectifs de ce travail étaient d'identifier

- (i) les catégories fonctionnelles et les gènes qui participent à la réponse cryptogéine (induction ou répression de l'expression),
- (ii) les catégories fonctionnelles et les gènes dont la modulation d'expression dépend de l'environnement calcique intracellulaire,
- (iii) les acteurs potentiels de la voie de transduction du signal ainsi que des gènes marqueurs des voies de défense induite par l'élicitation.



### III.2 Résumé

**Contexte biologique :** La cryptogéine est un éliciteur peptidique de 10 kDa, capable d'induire chez le tabac une réponse hypersensible et une résistance systémique acquise. Plusieurs études ont permis d'identifier les nombreux événements précoces de signalisation induits, lesquels incluent des étapes de phosphorylation, un influx prolongé de calcium, des flux ioniques, une synthèse de ROS et de NO et des changements dans la perméabilité membranaire. Cependant, les acteurs moléculaires impliqués dans la cascade de signalisation conduisant aux réponses de défense restent très méconnus.

**Résultats :** Grâce à une puce microarray couvrant la quasi-totalité du transcriptome de tabac, nous avons étudié l'expression globale des gènes dans des cellules de tabac BY-2 élicitées. La comparaison entre des cellules élicitées par la cryptogéine seule ou co-incubée avec un bloqueur des canaux calciques ( $La^{3+}$ ) a permis d'identifier les réponses transcriptionnelles calcium-dépendantes et calcium-indépendantes. Environ 10% du transcriptome est modulé en réponse à un traitement cryptogéine d'une durée de quatre heures. En particulier, nous avons mis en évidence des changements de niveaux de transcrits pour des gènes codant des protéines de défense ou de stress, des protéines de signalisation, des facteurs de transcription, ou encore des enzymes impliquées dans les modifications pariétales. Parmi les 3 819 gènes différentiellement exprimés, 91% étaient sensibles et 9% étaient insensibles à la suppression du signal calcique. Les transcrits induits par la cryptogéine de manière calcium-dépendante incluaient deux classes remarquables : la première comprend des gènes de défense alors que la seconde comporte une proportion très élevée de gènes du métabolisme des oxylipines.

**Conclusion :** Nos résultats décrivent le pattern d'expression global observé dans des cellules de tabac BY-2 après perception de la cryptogéine. Les nouveaux facteurs de régulation et gènes de défense identifiés constituent de bons candidats pour une future caractérisation fonctionnelle ainsi que de potentiels outils pour l'amélioration génétique de la résistance des plants de tabac face aux maladies.



### III.3 Abstract

**Background:** Cryptogein is a 10kDa proteinaceous elicitor that is able to induce a hypersensitive response and a systemic acquired resistance in tobacco plants. Previous studies have identified many early signalling components including phosphorylation processes, rapid  $\text{Ca}^{2+}$  influx, ion fluxes, ROS and NO synthesis and changes in plasma membrane permeability. However, very little is known about the pathways and the molecular actors involved in the signalling cascade leading to meaningful cellular responses.

**Results:** Using a genomic microarray representing the majority of the tobacco transcriptome, we profiled gene expression in elicited tobacco BY-2 cells. Comparison between cells elicited with cryptogein alone or co-incubated with the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker  $\text{La}^{3+}$ , allowed to identify  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent transcriptional responses. Approximately 10% of the transcriptome exhibited significant changes in abundance in response to a four-hour treatment with cryptogein. Steady-state changes in the abundance of transcripts encoding stress- and disease-related proteins, signalling components, transcription factors and cell wall reinforcement were particularly noteworthy. Among the 3,819 differentially expressed genes that could be annotated, 91% were sensitive and 9% were insensitive to inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  influx. These cryptogein-up-regulated,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transcripts included two noteworthy classes: the first one comprises genes involved in defence responses following pathogen attack whereas the second one consists of genes involved in the biosynthesis of oxylipins.

**Conclusion:** Our results describe the global patterns of gene expression that occur in tobacco BY-2 cells after the perception of cryptogein. We were able to identify several major patterns of gene expression modulation. The new regulatory factors and defence-related genes that we identified provide good candidate genes for further functional characterization, as well as new tools for molecular breeding and biotechnology aiming at improvement of tobacco disease resistance.

**Keywords:** calcium signalling, transcriptomics, *Nicotiana tabacum* (tobacco BY-2), cryptogein



### III.4 Introduction

Plants are constantly challenged with potential pathogenic microorganisms and have evolved a diversity of constitutive and inducible responses in order to resist to their aggressors. The inducible responses involve the production of reactive oxygen species (ROS), the strengthening of the cell wall and the transcriptional activation of defence-related genes that encode antimicrobial secondary metabolite-biosynthetic enzymes as well as pathogenesis-related proteins showing antimicrobial properties (Scheel 1998). Defence genes may also encode proteins involved in the synthesis of salicylic acid (SA), jasmonic acid and ethylene which play a crucial role in the development of systemic resistance to the distal uninfected parts of the plant (Grant et Lamb 2006). In many cases, plant resistance is associated with a rapid cell death, localized at the site of infection and called the hypersensitive response (HR) (Lam *et al.* 2001). The HR is thought to directly kill the pathogens and/or to limit their spreading by depriving them of access to further nutrient sources. Cell death during the HR has been shown to be genetically programmed and displays apoptosis-like features such as cell shrinkage, chromatin condensation and DNA cleavage (Lam 2004). Cell death signals include ROS, nitric oxide (NO), SA and proteins related to  $Ca^{2+}$  and lipid signalling (Lecourieux *et al.* 2002; Greenberg et Yao 2004 ; Hatsugai *et al.* 2004 ; Wendehenne *et al.* 2004).

Plant defence responses are initiated by the recognition of pathogen-derived molecules called race-specific or general elicitors (also named Pathogen-Associated Molecular Patterns or PAMPs), depending on the pathosystem (Nürnberg *et al.* 2004). Cryptogein, a 10 kDa proteinaceous elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, belongs to a class of proteinaceous elicitors called elicitors (Ponchet *et al.* 1999), able to induce a HR and a systemic acquired resistance in tobacco plants (Ricci *et al.* 1989). Cryptogein has been extensively used to investigate the molecular mechanisms underlying disease resistance in tobacco. Indeed, upon application to tobacco leaves, cryptogein triggers the expression of defence-related genes, an HR-like response and a systemic resistance against various pathogens including *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, the causal agent of the black shank disease (Keller *et al.* 1996). Cryptogein binds to plasma membrane high affinity binding sites showing biochemical properties expected from a receptor (Bourque *et al.* 1999). Using tobacco cell suspensions and a combination of biochemical, pharmacological and molecular methods, components involved in the transduction pathway coupling cryptogein recognition to the activation of defence responses have been identified, namely phosphorylation processes, rapid  $Ca^{2+}$  influx, ion fluxes, changes in plasma membrane permeability, activation of an NADPH oxidase responsible (NtrbohD) for ROS production and cytosol acidification, activation of protein kinases including MAPKs, disruption of the microtubular cytoskeleton and NO synthesis (Blein *et al.* 1991 ; Tavernier *et al.* 1995 ; Simon-Plas *et al.* 1997 et 2002 ; Wendehenne *et al.* 2002 ; Garcia-Brugger *et al.* 2006). The interaction between these early signalling components appears to be complex and there is





evidence that their activation directly correlates with a transient increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ; Lecourieux *et al.* 2002).

Although our knowledge of the initial stages of cryptogein-induced signalling is quite well-understood, very little is known about the pathways and the molecular actors involved in the signalling cascade leading to meaningful cellular responses. Several studies performed at the whole transcriptome level have provided new insights on the regulation of transcripts in response to pathogens and wounding (Cheong *et al.* 2002; Navarro *et al.* 2004 ; Moscatiello *et al.* 2006). However, none of these has specifically focused on the effect of cryptogein in such processes, nor were such studies carried out genome-wide.

In the present work, we used such a transcriptomic approach, using custom tobacco BY-2 microarrays offering high coverage of the tobacco transcriptome to identify transcripts that were modulated after a four-hour exposure of BY-2 suspension cultures to cryptogein. Moreover, selective inhibition of the cryptogein-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient by  $\text{LaCl}_3$  made it possible to distinguish between  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent pathways that exert control over gene transcription downstream of the cryptogein stimulus.



### III.5 Material and methods

#### Cell culture and luminescence measurements

Transgenic tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow BY-2 lines) expressing cytosolic apo-aequorin (Takahashi *et al.* 1997) were grown and processed according to Pauly *et al.* (2001). Cells harvested at late exponential growth phase were washed twice and resuspended at a density of 20% (Packed Cell Volume, PCV) in the suspension buffer (175 mM mannitol, 0.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MES KOH, pH 5.8), supplemented with 2 µM coelenterazine to reconstitute active aequorin for luminescence measurements. Subsequently, cells were incubated at room temperature overnight in the dark on a rotary shaker (130 rpm). Measurements of luminescence and calcium calibration were carried out as previously described (Pauly *et al.* 2001). Cryptogein was purified according to Bonnet *et al.* (1996) and dissolved in water as a 100 µM stock solution. Lanthanum chloride was from Sigma-Aldrich, used as a 1M stock solution.

#### Microarray procedure and data analysis

Custom monocolour tobacco oligo microarrays (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) were produced by spotting 60-mer oligonucleotides designed to match unigenes (103 540) obtained after assembly of all published tobacco ESTs (using a Cap3-based procedure).

14-d-old tobacco BY-2 cells were treated with 0.1 µM cryptogein in presence or absence of 1 mM lanthanum chloride. Lanthanum chloride alone and water were used as control.

After four hours of incubation, cell aliquots were collected and filtered under vacuum on a 37 µm mesh nylon membrane and immediately frozen in liquid nitrogen prior to RNA extraction. Four biological replicates were made and used for microarray analysis. Total RNA samples were extracted from frozen cells using the Nucleospin II RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cy3-labelled cRNA was prepared from 500 ng of total RNA from rice leaves, using a Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) and Cy3-CTP (Perkin Elmer). Labelled cRNA was purified with RNeasy mini spin columns (Qiagen). One microgram of Cy3-labelled cRNA was used for subsequent hybridization. Hybridization on the monocolour Agilent 2x105K microarrays was carried out for 17 h with rotation at 65 °C. The hybridized slides were washed using a commercial kit package (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and then scanned using a Genepix 4000B scanner (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) and Feature Extraction (Agilent) software.

Multiplicatively detrended background subtracted signal (= ProcessedSignal from Feature Extraction) was used in the subsequent analysis. Before statistical analysis, probes were filtered according to quality flags produced by Feature Extraction software: a probe was retained for analysis when the signal was well above background on, at least, 3 of the 4 arrays in both control and cryptogein assays. After filtering, 41,536 unigenes were retained for subsequent analysis. Global normalization was performed using the Invariant Set

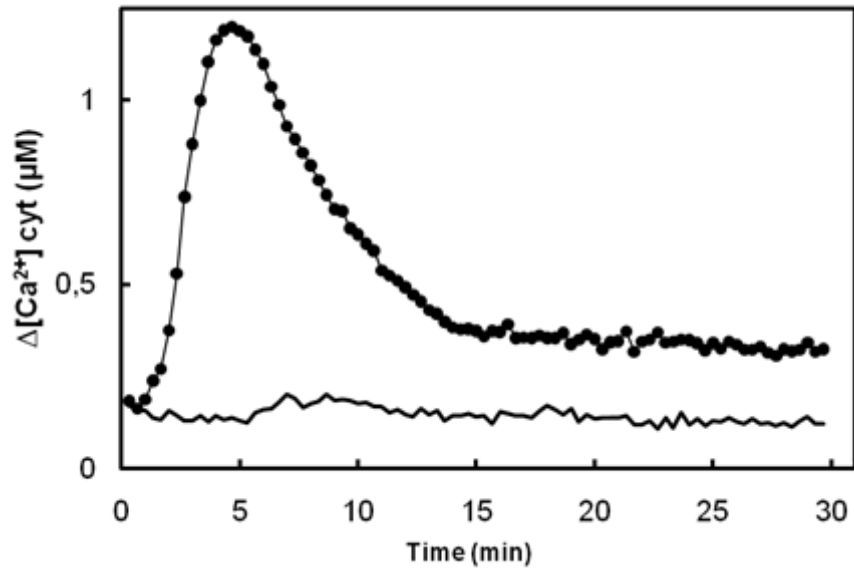


Figure III-S1. **Cryptogein-induced calcium signatures in tobacco BY-2 cells.** Time-course of calcium variation in BY-2 cells induced either by H<sub>2</sub>O (trace) or cryptogein (1  $\mu M$ , bullets) (data from one representative experiment).

Normalization procedure (Li and Wong 2001; Gautier *et al.* 2004) to remove effects that were due to undesirable variations between microarray experiments rather than biological differences. Normalized data were then used to compute fold changes and Q-values using Benjamini-Hochberg (1995) multiple comparison strategy. In the following, we considered that a unigene was significantly differentially expressed when the fold change between two treatments was above 4 and the Q-value was lower than 0.01.

All statistical analyses were performed using Limma (Smyth 2005) and Affy (Gautier *et al.* 2004) packages from R-bioconductor (Gentleman *et al.* 2004).

### **Quantitative real-time RT-PCR**

A proportion of the RNA obtained for microarray studies was used for qRT-PCR. First-strand cDNA was synthesized from 5µg total RNA in a 20µl reaction volume containing 50ng random primers, 10 mM dNTPs, 1µl RNaseOUT (40 units) and 200 units of SuperScript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, USA). After 50 minutes at 50°C followed by 5 minutes at 85°C, cDNAs were purified using the PCR Clean-Up system (Promega, Madison, USA). Two µL cDNAs were used as templates in a quantitative real-time PCR assay (10 µL) performed on the sequence detection system ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, USA) using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). After an initial denaturation of 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C followed by 1 minute at 60°C were performed. Amplification specificity was checked by melting-curve analysis, and PCR efficiency was determined using standard curves constructed with serial dilutions of PCR products as templates. 18S rRNA was used as an internal control. Quantification of expression ratios was performed according to the mathematical model developed by Pfaffl (2001). Primers and amplicon sizes are given in Supporting Information (table II-S1).

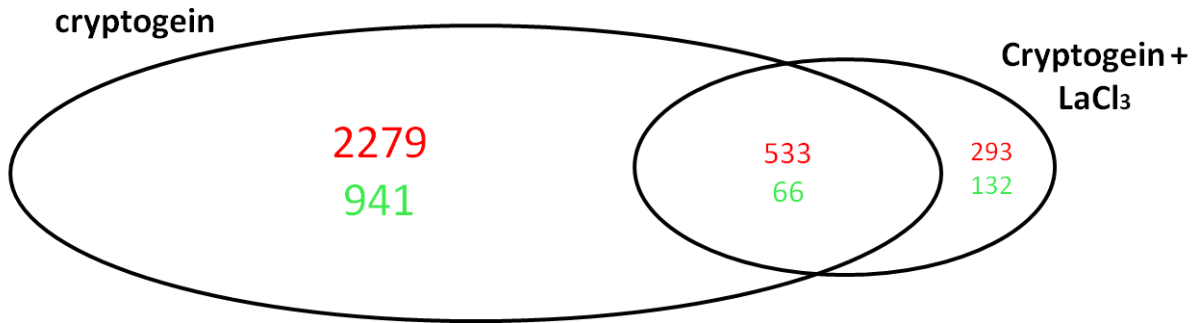


Figure III-1. Venn diagram of genes regulated by ‘cryptogein’ and ‘cryptogein + LaCl<sub>3</sub>’ treatments.

Numbers are based on oligonucleotide probes and represent up-regulated (in red) and down-regulated (in green) transcripts. To be defined as significantly modulated, the q-value has to be strictly  $< 0, 01$  and transcript accumulation must represent at least a 4-fold change compared to control treatment. The diagram is based on 4 biological experiments.

Gene name	RT-PCR	Microarray
PAL	20,05	9,56
C4H	5,89	4,39
4CL	11,12	4,38
HCT	27,31	9,95
C3H	11,7	8,02
CCoAOMT	142,39	124,68
COMT	9,37	7,23
F5H	278	171
CCR	5,75	-
CAD	0,38	0,86
NtAADC1A Ornithine décarboxylase	505	316,57
HSR203J	21,9	9,8
PR-1	55,24	11,65
PR-3	0,96	1,38
MYBGR1	0,61	0,94
	38,85	14,53

Tableau III-1. Comparison of results obtained with microarrays and qRT-PCR.

Cryptogein-induced transcript regulation was assessed for a number of key genes using both microarray and q-RT-PCR. Specific primers were designed for all genes and real-time RT-PCR experiments were performed using *18S* as reference gene. Cryptogein/control ratios calculated from 3 independent experiments are shown.

### III.6 Results & Discussion

#### Functional dissection of transcriptional responses to cryptogein

It has previously been shown that in response to cryptogein in tobacco BY-2 cells, a cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transient, which can be suppressed by a 1mM  $\text{LaCl}_3$  co-treatment, is rapidly generated (Amelot *et al.* 2010; figure III-S1). We took advantage of this model system not only to study global gene expression in response to cryptogein, but also to get a general overview of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of such transcriptome changes. To this end, we retrieved all the publicly tobacco ESTs available, assembled them into approximately 100,000 unigenes (*i.e.* see M&M) which were used to design an oligonucleotide-based microarray likely covering a high proportion of the tobacco transcriptome. The arrays were probed with cDNAs derived from four different treatments to enable comparison between (i) ‘control’ and ‘cryptogein-treated’ cells to evaluate how the perception of cryptogein impacts on the global transcriptome, (ii) ‘cryptogein-’ and ‘cryptogein plus  $\text{LaCl}_3$ -treated’ cells and (iii) ‘control’ and ‘ $\text{LaCl}_3$ -treated’ cells. In addition, comparisons between (i) and (ii) allow to reveal the importance of calcium signaling for transcriptional responses. Comparing (i) and (ii) should provide insights into cryptogein-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent processes. Finally, comparison (iii) was used to test the effects on  $\text{LaCl}_3$  alone.

figure III-1 shows a Venn diagram representing the distribution of the transcripts (4,244) whose abundances were changed significantly (fold change  $>4$ ,  $q$ -value  $< 0.01$ ) by the treatments. Of the 4,244 transcripts that exceeded the threshold with significance, 3,220 transcripts responded specifically to ‘cryptogein’ treatment, 599 were responsive to both ‘cryptogein’ and ‘cryptogein +  $\text{LaCl}_3$ ’ treatment whereas 425 transcripts responded solely to the ‘cryptogein +  $\text{LaCl}_3$ ’ treatment. The treatment with  $\text{LaCl}_3$  alone had no effect of transcript abundances of any genes.

Independent confirmation of array data using qRT-PCR (see table III-1) for a number a known key transcripts showed a good correlation between the two techniques although transcript changes were generally found to be less pronounced when assessed by microarray.

#### Functional categories of gene show differential activation in response to cryptogein

The cryptogein-responsive, either  $\text{LaCl}_3$ -sensitive or insensitive fractions represent 3,819 genes. Of these, a total of 2,760 could be classified into specific functional categories (further named DEGs, Differentially Expressed Genes). It is noteworthy that treatment with cryptogein increased the transcript level of many different classes of genes. The predominant categories highlighted by these treatments represent transcripts encoding proteins involved in signal transduction (e.g. protein kinases, phosphatases,  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins, ion pumps and channels), gene transcription modulation (WRKY, MYB, NAC, Zinc finger and other transcription factors), stress, disease and cell death, and cell wall rearrangements.

ID	Gene family	Ratio		Ratio
		'cryptogein'	Q-value	
	<b>Signal transduction</b>			
	<b>ion trafficking</b>			
CUST_102417	potassium channel	21,1	1,95E-07	3,7
CUST_98982	cyclic nucleotide-regulated ion channel	13,0	1,24E-06	4,2
CUST_97685	inward rectifying shaker k+ channel	11,9	5,99E-05	1,5
CUST_60834	potassium channel	10,4	2,26E-07	2,1
CUST_65249	high-affinity nitrate transporter	6,5	1,46E-04	1,2
CUST_4067	potassium channel	4,4	5,35E-07	1,7
	<b>protein (de)phosphorylation</b>			
CUST_54439	protein kinase	167,6	1,83E-08	4,6
CUST_26472	protein kinase	90,7	1,45E-09	1,5
CUST_52745	protein kinase	54,4	3,84E-09	3,6
CUST_9800	protein kinase	46,3	1,06E-07	8,0
CUST_52096	protein kinase	35,4	3,98E-10	6,3
CUST_13024	phosphatidic acid phosphatase	35,2	3,00E-07	3,1
CUST_10334	protein serine threonine kinase bnk1	33,9	2,21E-08	5,2
CUST_59952	protein phosphatase 2c	31,6	1,54E-08	5,6
CUST_60076	phosphatidic acid phosphatase	29,1	1,19E-07	4,4
CUST_39930	protein kinase	28,7	9,88E-08	7,7
CUST_102909	protein kinase-like protein	22,0	3,30E-07	2,3
CUST_40257	protein kinase	19,8	7,28E-09	1,7
CUST_23429	protein kinase type i egf	18,4	2,74E-05	2,6
CUST_26666	protein phosphatase	16,8	2,68E-09	1,7
CUST_17870	protein kinase family protein	16,7	4,32E-08	6,5
CUST_27608	phosphatidic acid phosphatase	15,3	2,10E-08	0,9
CUST_45860	protein kinase	15,0	5,07E-06	15,4
	<b>Calcium toolkit</b>			
CUST_56992	calmodulin-binding protein	50,9	3,63E-10	7,5
CUST_68658	calmodulin-binding protein	29,2	4,58E-08	0,8
CUST_2137	calmodulin-domain protein kinase cpk6	28,6	2,92E-08	5,8
CUST_70612	calmodulin	25,7	3,43E-08	5,4
CUST_76939	calcium-dependent protein kinase	22,3	1,50E-08	3,7
CUST_5349	cbl-interacting protein kinase 10	22,0	5,55E-08	0,7
CUST_24949	calmodulin-binding protein	21,1	7,84E-09	3,6
CUST_25163	mlo3 (mildew resistance locus o 3) calmodulin binding	18,6	2,44E-08	1,5
CUST_8342	calmodulin	16,3	7,05E-08	6,6
CUST_67591	calmodulin-binding protein	16,2	3,63E-08	1,1
CUST_10758	calcineurin b	13,7	2,17E-07	1,8
	<b>ion trafficking</b>			
CUST_100765	mechanosensitive ion channel	0,1	3,58E-09	1,0
CUST_82434	water channel protein	0,1	5,25E-08	0,8
CUST_81090	water channel protein	0,1	3,94E-08	0,9
CUST_53447	potassium channel	0,2	1,37E-07	0,7
CUST_44518	water channel protein	0,2	1,87E-05	0,6
	<b>protein (de)phosphorylation</b>			
CUST_47212	protein phosphatase 2c	0,1	2,98E-06	0,8
CUST_54906	protein kinase	0,1	1,53E-08	0,7
CUST_23948	protein phosphatase 2c	0,1	7,98E-05	0,9
CUST_52224	protein phosphatase 2c	0,1	3,47E-06	1,3
CUST_25856	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	0,2	1,06E-06	1,2
CUST_14378	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	0,2	5,82E-07	0,8
CUST_90586	receptor-like protein kinase	0,2	8,49E-07	0,4
CUST_49375	transmembrane protein kinase	0,2	1,32E-04	0,8
CUST_45255	ip5pi inositol-polyphosphate 5-phosphatase	0,2	2,67E-07	0,9
CUST_11314	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	0,2	3,31E-06	0,2
CUST_24331	protein kinase	0,2	3,64E-06	0,5
CUST_13492	cdc2 protein kinases-like	0,2	2,00E-04	0,2
CUST_38600	protein kinase	0,2	9,09E-05	0,3
CUST_74691	serine threonine kinase-like protein	0,2	2,25E-07	1,1
	<b>Calcium toolkit</b>			
CUST_70649	calcium binding protein	0,2	1,04E-07	0,8
CUST_13157	cdpk-related protein kinase	0,2	1,56E-06	0,5
CUST_87987	cdpk-related protein kinase	0,2	2,35E-06	0,5

**Tableau III-2. Signal transduction-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.



*Transcriptomic analysis identifies potential actors of the cryptogein signal transduction*

Cryptogein signal transduction has been shown to be initiated by very early phosphorylation events (Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000) and to require the induction of several signaling pathways including ionic fluxes, (de)phosphorylation events and calcium signaling (Garcia-Brugger *et al.* 2006).

Here, we showed that cryptogein perception leads to a massive modulation of gene expression within the kinase/phosphatase families. 29,7 % of genes encoding proteins kinases or phosphatases in the tobacco transcriptome (212/685 and 46/181 respectively) were differentially expressed when tobacco cells were challenged by cryptogein. Thirteen kinases and five phosphatases were up-regulated by, at least, 15 times, whereas ten kinases and five phosphatases were down-regulated by, at least, 5 times (table III-2). Among them, one protein kinase, CUST\_54439, was induced 167 times in response to cryptogein. It is a very close homolog to *NtACIK1* and *LeACIK1* (67% nucleotidic identity), which were identified as Ser/Thr kinases essential for HR in response to *Cladosporium fulvum* (Navarro *et al.* 2004; Rowland *et al.* 2005). Furthermore, its expression is activated by cryptogein as early as 30 minutes after treatment and peaked at 2 hours (by 21-fold and 263-fold respectively, data not shown). It can thus be hypothesized that this kinase may function in the signalling cascade induced by cryptogein and leading to HR lesions in tobacco.

Six DEGs were potassium or nitrate channels/transporters, five of them being up-regulated (up to 22-fold). Surprisingly, three other DEGs corresponding to water channel proteins (i.e. aquaporins) were identified as down-regulated in response to cryptogein (up to 10-fold) whereas none was up-regulated (table III-2). Aquaporins are well-known key proteins functioning in plant development and in abiotic stresses responses (for review: Maurel *et al.* 2008). However, their possible role in plant microbe interactions is far less understood. Only a few studies have identified aquaporins as plausible actors of an integrated response to biotic threatening (Werner *et al.* 2001; Tyerman *et al.* 2002). Furthermore, only one example of down-regulation of aquaporins in the plant defence context has been reported: aquaporins have been shown to be down-regulated in cotton root in response to *Fusarium oxysporum* (Dowd *et al.* 2004). Finally, a mechanosensitive ion channel was found to be down-regulated by 10-fold.

Calcium channels and/or pumps and calcium decoders are supposed to play a major role in cryptogein signal transduction (Lecourieux *et al.* 2002; Garcia-Brugger *et al.* 2006). We were able to identify 13 up-regulated and 3 down-regulated genes encoding calcium/calmodulin binding proteins, representing 16,9% of this transcriptome. In particular, a gene (CUST\_98982) encoding a cyclic nucleotide-regulated ion channel was shown to be over-expressed 13 times in response to cryptogein. Its sequence matches well-known CNGCs, including *AtCNGC4* (63% identity) and a tobacco *CNGC* (79% identity). It is noteworthy that *AtCNGC4* (also known as HLM1) was characterized as an essential component of the signal leading to cell death in response to *Pseudomonas syringae* (Balagué *et al.* 2003), suggesting that this CNGC may be required for appropriate defence responses. We also identified 4

ID	Gene family	Ratio 'cryptogein'	Q-value	Ratio 'cryptogein + LaCl3'
<b>Oxilipin pathway</b>				
CUST_10619	divinyl ether synthase	2409,7	1,64E-09	3,3
CUST_52317	lipoxygenase	244,5	8,25E-08	9,1
CUST_13486	lipoxygenase	137,6	3,34E-09	2,8
CUST_7900	lipoxygenase	105,5	5,43E-09	6,0
CUST_50277	lipoxygenase	104,6	8,91E-11	3,5
CUST_82890	lipoxygenase	98,4	9,59E-10	5,6
CUST_100154	lipoxygenase	92,6	3,98E-10	3,1
CUST_60108	lipoxygenase	92,2	3,22E-09	10,1
CUST_101766	lipoxygenase	90,1	6,75E-08	11,1
CUST_31514	allene oxide synthase	86,0	3,79E-09	4,2
CUST_100609	allene oxide synthase	69,7	1,21E-08	4,0
CUST_48587	lipoxygenase	53,8	1,03E-07	3,5
CUST_39097	lipoxygenase	42,1	1,74E-08	5,9
CUST_46598	allene oxide synthase	41,6	3,01E-09	1,5
CUST_67146	allene oxide synthase	31,0	1,27E-09	1,5
CUST_26277	lipoxygenase	21,5	9,45E-08	1,0
CUST_11189	allene oxide cyclase	20,5	4,91E-07	1,1
CUST_75089	allene oxide synthase	20,2	3,07E-07	2,9
CUST_78084	lipoxygenase	17,7	1,13E-04	0,8
CUST_93910	lipoxygenase	16,1	3,83E-06	6,0
CUST_41540	phospholipase d-gamma	13,0	2,09E-06	1,8
CUST_102677	phospholipase d-gamma	12,7	1,11E-08	1,8
CUST_92964	allene oxide synthase	11,0	4,12E-05	3,1
CUST_79282	lipoxygenase	10,3	2,01E-05	2,0
CUST_22982	lipoxygenase	9,1	1,85E-07	2,7
CUST_90793	lipoxygenase	8,5	3,22E-06	1,5
CUST_62159	af158254_1patatin-like protein 2	8,4	2,74E-03	0,3
CUST_23569	lipoxygenase	7,3	4,59E-07	1,2
CUST_16619	allene oxide synthase	7,2	7,44E-05	1,6
CUST_50731	af158253_1patatin-like protein 3	7,0	9,72E-06	1,5
CUST_26458	phospholipase d beta 1	6,5	7,95E-06	1,3
CUST_80512	lipoxygenase	5,2	1,17E-03	1,0
CUST_47634	phospholipase d	4,5	1,77E-06	1,4
CUST_52847	allene oxide synthase 2	4,3	9,94E-05	1,9
<b>Oxilipin pathway</b>				
CUST_61968	phospholipase c	0,1	1,64E-06	0,5
CUST_87035	lipoxygenase	0,2	2,65E-07	0,8
CUST_82280	lipoxygenase	0,2	4,81E-07	1,0

**Tableau III-3. Oxilipin pathway-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.

CDPKs, two of them being up-regulated. CUST\_2137 had sequence similarity with AtCPK6, a kinase characterized as a positive regulator of salt stress and ABA signalling (Mori *et al.* 2006; Xu *et al.* 2010).

14-3-3 proteins are ubiquitous regulatory components that are able to play a central role in the regulation of many cellular processes such as control of cell cycle, differentiation, targeting of proteins to different cellular locations and coordination of multiple signal transduction pathways (Roberts 2003; Oecking et Jaspert 2009). CUST\_52089 encodes a 14-3-3 protein that has a 100% homology with a tobacco 14-3-3 identified as an interactor of the resistance gene product N implicating in the TMV response (Konagaya *et al.* 2004). Its over-expression peaked at 11-fold, suggesting that this sequence may represent another 14-3-3 protein implicated in the cryptogein response since Elmayan *et al.* have demonstrated that a tobacco 14-3-3 protein was necessary for the production of AOS in response to the fungal elicitor (Elmayan *et al.* 2007).

#### *Transcriptomic analysis reveals that cryptogein activates oxylipin pathway*

Lipoxygenases (LOXs) are ubiquitous enzymes involved in the production of important signalling molecules and defence metabolites in plants, fungi, algae and mammals. LOXs catalyse the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids containing a (1Z,4Z)-pentadiene moiety (Gardner 1991) to form fatty acid hydroperoxides (HPs). In plants, linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid are the main substrates for this reaction. The resulting HPs are further metabolized *via* several metabolic routes, and metabolites originating from these enzymatic reactions are commonly named oxylipins. Strikingly, 73% of the genes encoding LOXs in tobacco were modulated in response to cryptogein. Indeed, 63% of the LOX genes (19/30) were up-regulated whereas 10% (3/30) were inhibited (table III-3). Furthermore, several acyl hydrolases, also known as patatins, typically responsible for the production of free fatty acids (Andrews *et al.* 1988) as precursors of LOX enzymes were also up-regulated (26% of patatin sequences ; table III-3). Such findings suggest that plant defence partially occurs through the production of a very diverse range of oxylipins.

Jasmonic acid is one of the most characterized oxylipin which participates in many aspects of the plant life, including defence responses against herbivores and pathogens (Browse 2009). The synthesis of JA starts with the enzyme allene oxide synthase (AOS), which converts 13-hydroperoxy linolenic acid to an unstable allene oxide intermediate and in turn is modified by a cascade of enzymes finally leading to the formation of JA (Gfeller *et al.* 2010). Here we showed that 90% of the allene oxide synthase tobacco genes (9/10) were up-regulated in response to cryptogein (table 3), two of them, CUST\_31514 and CUST\_100609 being strongly activated (by 86 and 69 times respectively). Furthermore, one sequence corresponding to allene oxide cyclase was also found to be up-regulated 20-fold (CUST\_11189). Finally, we have found 4 sequences encoding phospholipases D (PLD) enzymes that are up-regulated by cryptogein perception (table III-3). This finding is in concordance with previous results indicating that the wound-induced accumulation of JA

ID	Gene family	Ratio 'cryptogein'	Q-value	Ratio 'cryptogein + LaCl3'
<b>Transcription factors</b>				
CUST_6229	zinc finger (an1-like) family protein	227,6	3,48E-08	4,8
CUST_40275	myb-related transcription factor	143,3	2,00E-09	5,5
CUST_17925	wrky transcription factor 30	111,2	7,38E-09	9,1
CUST_100666	transcription factor wrky35	109,6	4,40E-08	14,0
CUST_13243	wrky41 (wrky dna-binding protein 41) transcription factor	76,8	1,02E-07	7,8
CUST_61539	nac transcription factor	66,8	3,18E-08	1,5
CUST_9072	wrky transcription factor	62,0	6,69E-07	1,6
CUST_31260	wrky-type transcription factor	45,0	4,95E-07	5,0
CUST_31953	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	40,5	1,57E-07	3,9
CUST_24094	basic helix-loop-helix protein	37,9	5,08E-08	1,0
CUST_30429	tpa_inf: wrky transcription factor 43	35,5	1,51E-07	10,1
CUST_22831	zinc finger protein	31,6	1,48E-06	4,0
CUST_8828	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	28,8	4,04E-07	3,2
CUST_96313	zinc finger protein	27,3	2,01E-06	10,0
CUST_68898	ana034 anac035 (arabidopsis nac domain containing protein 35) transcription factor	24,2	1,57E-06	2,2
CUST_49183	nac domain protein	22,7	1,31E-06	4,6
CUST_38346	zinc finger protein	21,8	3,78E-07	7,5
CUST_33935	ring-h2 zinc finger protein	20,7	2,36E-08	6,0
CUST_29598	wrky transcription factor 11	19,8	2,35E-06	1,2
CUST_25476	c2h2-type zinc finger protein	19,8	2,75E-07	13,9
CUST_76300	zinc transporter protein zip1	19,6	2,07E-08	3,0
CUST_90564	wrky transcription factor	18,7	1,05E-06	4,5
CUST_99374	zinc finger protein	18,6	1,71E-06	7,3
CUST_40091	myb transcription factor	17,4	1,99E-07	5,1
CUST_41011	myb-like dna-binding domain containing expressed	16,8	1,15E-06	6,5
CUST_57519	myb transcription factor myb102	15,7	8,67E-07	6,1
CUST_70571	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	15,7	8,95E-08	1,8
CUST_59278	salt-tolerance zinc finger protein	14,2	2,42E-04	1,4
CUST_31021	nac domain protein	13,8	4,07E-06	3,8
CUST_13962	ring zinc finger protein	13,5	1,20E-07	2,8
CUST_72321	myb51 protein (NtMybGR1)	13,1	2,84E-07	3,7
CUST_85231	zinc finger (c3hc4-type ring finger) protein family-like	12,8	1,12E-08	2,5
CUST_30530	bzip transcription factor tga2	12,8	7,06E-07	4,7
CUST_10679	ring zinc finger protein	12,4	9,51E-08	2,7
CUST_13215	bzip transcription factor bzip132	11,5	2,14E-08	2,3
<b>Transcription factors</b>				
CUST_84361	zinc finger (gata type) family protein	0,03	1,66E-07	0,2
CUST_80092	ring zinc finger	0,04	2,25E-07	0,3
CUST_48781	zinc finger (gata type) family protein	0,1	4,87E-06	0,8
CUST_26203	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	0,1	9,35E-07	0,4
CUST_49543	ccch-type zinc finger protein	0,1	1,17E-07	1,2
CUST_13420	myb transcription factor	0,1	9,14E-09	0,6
CUST_11342	zinc finger protein	0,1	1,53E-07	0,4
CUST_69625	myb family transcription factor	0,1	5,72E-08	0,7
CUST_49622	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	0,1	4,14E-08	0,6
CUST_39993	myb transcription factor	0,1	1,39E-09	0,6
CUST_15019	zinc finger	0,1	7,46E-05	0,5
CUST_47781	ccch-type zinc finger protein	0,1	1,13E-07	0,9
CUST_26450	zinc finger (c2h2 type) family protein	0,1	1,15E-05	0,5
CUST_80055	zinc finger protein family-like	0,2	2,09E-06	0,9
CUST_82726	zinc finger protein	0,2	8,97E-06	1,0
CUST_58724	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein	0,2	1,40E-06	0,6
CUST_62032	zinc finger protein	0,2	1,62E-06	0,7

**Tableau III-4. Transcription factors genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.

would require the expression of a PLD gene in *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2000). PLD however, does not release fatty acids as substrates for the octadecanoid pathway but may rather be indirectly involved by generating phosphatidic acid (PA) which might be the pivotal lipid messenger for the stimulation of lipid hydrolysis by other lipases (Wang 2004). Altogether, these results showed for the first time to our knowledge that the whole pathway leading to JA synthesis may be activated in response to cryptogein.

Another route starts with the enzyme divinyl ether synthase, responsible for the synthesis of divinyl ether-derived phytoalexins (Weber *et al.* 1999). It is remarkable to see that the most activated gene encode a divinyl ether synthase, its up-regulation culminating at 2,409 times (table III-3). It is also noteworthy that a remorin, CUST\_87939, was the earliest activated gene within the whole microarray analysis. Its expression peaked at 10 minutes after cryptogein treatment (50 times; data not shown). Yet, it has been shown that the surexpression of a remorin gene in tobacco leads to the enhancement of cell death and led to an increased accumulation of divinyl ether-related phytoalexins (Retelska *et al.* 2000). Thus it would be of great interest to evaluate the possible accumulation of divinyl ether-derived phytoalexins in tobacco cells challenged by cryptogein.

#### *Tobacco transcription factors and cryptogein signalling*

Transcription factors (TFs) of very diverse multigenic families such as WRKY, MYB, NAC and others have been identified as key regulators of plant defence responses (Eulgem et Somssich 2007; Libault *et al.* 2007; Jensen *et al.* 2008). However, the nature of the transcription factors involved in cryptogein response remains largely unknown. Here, we showed that 149 DEGs encoded TFs of several major classes. Respectively, 112 and 37 TFs genes were found significantly up- and down-regulated by cryptogein treatment (table III-4). Three gene families were over-represented among the cryptogein-responsive TFs (*i.e.* zinc finger, WRKY and MYB families).

Twenty five members of the WRKY family (out of 71), representing 35% of the whole family, were up-regulated 4.04- (CUST\_84869) to 111.24-fold (CUST\_17925) in response to cryptogein. It is noteworthy that no member of this family was under-expressed in response to elicitation, a situation which has already been illustrated in *Arabidopsis* in response to chitin treatment (Libault *et al.* 2007).

Furthermore, 17 MYB TFs (out of 116; *i.e.* 14% of the whole family) were affected by cryptogein treatment. Among them, CUST\_72321 encodes NtMYBGR1, a R2R3 MYB TF previously characterized in tobacco BY-2 cells in response to Aaglucans (Shinya *et al.* 2007), suggesting that this MYB may play a pivotal role in general defence responses in tobacco. Moreover, the most cryptogein-activated MYB-related sequence (CUST\_40275; x143.35) is a putative ortholog of *DcMYB1*, a R2R3 MYB TF which acts as a transcriptional activator of the carrot *gDcPAL1* gene in response to elicitor treatment (Maeda *et al.* 2005). As *PAL* gene expression is also enhanced in response to cryptogein in tobacco cells (Lecourieux *et al.* 2002; Amelot *et al.* 2010, see also table III-7), it could be hypothesized that this MYB TF may be

ID	Gene family	Ratio 'cryptogein'	Q-value	Ratio 'cryptogein + LaCl3'
	<b>Stress and disease related</b>			
CUST_10471	af291179_1stellacyanin-like protein caslp1 precursor	852,0	3,79E-09	15,7
CUST_10690	cell wall peroxidase	750,9	1,11E-08	26,1
CUST_90471	disease resistance-responsive family protein	262,1	5,92E-08	8,2
CUST_17542	avr9 cf-9 rapidly elicited protein 34	229,3	1,3E-09	5,8
CUST_103121	subtilisin-like protease	223,3	2,88E-09	7,7
CUST_10383	class iv chitinase	187,0	3,01E-09	9,4
CUST_40752	subtilisin-like protease	186,3	1,34E-09	8,4
CUST_79109	trypsin proteinase inhibitor precursor	173,0	5,87E-08	8,3
CUST_100041	pathogenesis-related protein 10	138,8	1,85E-07	3,5
CUST_4764	af211538_1avr9 cf-9 rapidly elicited protein 180	138,1	6,2E-10	13,0
CUST_51499	receptor kinase-like protein	128,4	6,35E-08	5,6
CUST_23751	disease resistance protein cc-nbs-lrr	116,0	5,81E-08	2,5
CUST_14873	af211539_1avr9 cf-9 rapidly elicited protein 65	114,5	3,4E-08	55,9
CUST_90471	disease resistance-responsive family protein	107,3	5,92E-08	2,7
CUST_10967	hsr201 like protein	93,4	6,35E-08	1,8
CUST_67729	mrna inducible by salicylic acid or by tmv	91,7	9,58E-10	0,9
CUST_77752	cc-nbs-lrr protein	83,2	3,91E-08	2,6
CUST_25721	defensin protein	69,7	3,54E-08	15,6
CUST_64654	aspartyl protease family protein	64,1	1,86E-08	1,5
CUST_53664	avr9 cf-9 rapidly elicited protein 256	61,3	7,9E-09	4,5
CUST_84208	avr9 cf-9 rapidly elicited protein 57	56,6	4,1E-08	2,6
CUST_60224	lectin protein	51,8	1,10E-07	7,3
CUST_64979	mrna inducible by salicylic acid or by tmv	44,9	4,54E-09	1,5
CUST_79662	receptor protein kinase-related	39,7	1,33E-05	2,0
CUST_31507	af211540_1avr9 cf-9 rapidly elicited protein 75	39,1	3E-07	2,9
CUST_50554	mrna inducible by salicylic acid or by tmv	39,1	1,33E-08	0,8
CUST_70327	af211537_1avr9 cf-9 rapidly elicited protein 137	37,0	6,1E-07	3,5
CUST_8866	class iv chitinase	34,5	7,93E-09	4,6
CUST_14293	pathogenesis-related protein 10	31,8	1,53E-06	13,9
CUST_48717	ribonuclease h	28,7	1,39E-09	1,6
CUST_64765	receptor-like protein kinase	28,6	1,50E-07	3,6
CUST_57981	nbs-lrr type disease resistance protein	25,4	4,86E-08	1,4
CUST_90088	avr9 cf-9 rapidly elicited protein 141	23,6	6E-09	5,0
CUST_81807	receptor serine threonine kinase pr5k	23,0	1,28E-07	6,5
CUST_54532	thaumatin-like protein	22,8	2,31E-09	1,3
CUST_11377	avr9 cf-9 rapidly elicited protein 34	21,9	5,8E-09	2,5
CUST_26237	receptor lectin protein kinase-like	20,7	4,60E-06	3,2
CUST_71406	af211539_1avr9 cf-9 rapidly elicited protein 65	20,0	4E-07	19,6
CUST_10476	protease inhibitor	18,1	2,28E-06	4,8
CUST_56716	defensin amp1 protein	16,7	8,44E-05	8,3
CUST_70311	wall-associated kinase 2	16,6	2,66E-07	6,5
CUST_11659	harpin-induced hin1-related harpin-responsive	13,4	1,06E-07	1,8
	<b>Stress and disease related</b>			
CUST_1282	subtilisin proteinase-like	0,04	8,38E-07	0,4
CUST_93617	receptor protein kinase-like protein	0,05	1,32E-08	0,6
CUST_57722	thaumatin-like protein	0,1	2,16E-05	0,1
CUST_82199	aspartyl protease family protein	0,1	2,94E-06	0,4
CUST_14846	aspartyl protease family protein	0,1	8,28E-07	0,5
CUST_15287	receptor protein kinase-like protein	0,1	7,45E-09	0,6
CUST_32129	aspartyl protease family protein	0,1	5,57E-06	0,5
CUST_60978	cysteine protease	0,1	8,91E-08	0,7
CUST_38990	sulfolipid synthase	0,2	4,59E-07	0,6
CUST_83421	serine protease-like protein	0,2	7,19E-05	0,5
CUST_87504	universal stress proteinfamily protein	0,2	2,50E-05	0,6
CUST_29819	receptor like protein kinase	0,2	1,13E-05	0,7
CUST_53458	sphingolipid delta-8 desaturase	0,2	9,32E-06	0,4
CUST_45848	cysteine protease	0,2	1,75E-07	1,1
CUST_40733	potyviral helper component protease-interacting protein 2	0,2	1,74E-06	0,5
CUST_49480	cysteine proteinase	0,2	1,43E-07	0,9
CUST_55461	sulfolipid synthase	0,2	1,80E-05	0,3
CUST_19001	ulp1 proteasec-terminal catalytic domain containing protein	0,2	1,97E-06	1,1
CUST_45418	receptor-like protein kinase	0,2	4,01E-05	0,5

**Tableau III-5. Defense-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.

an important component of the signalling network leading to the activation of the phenylpropanoid pathway through *PAL* gene activation. Six MYB were also down-regulated after elicitor treatment, a finding that is in accordance with what was found in *Arabidopsis* (Liebault *et al.* 2007) and tobacco (Hui *et al.* 2003).

Gene expression of 79 (of 544) sequences related to all classes of zinc finger TF was modulated by cryptogein perception. Gene activation and gene repression went from 4- to 227-fold and from 4.2- to 35- fold respectively.

Cryptogein-responsive TF genes likely represent key elements in the ability of the cell to modify gene expression as part of the plant defence reaction. Indeed, our microarray results showed that a large number of genes were modulated more than 4-fold by cryptogein treatment, with 2,812 genes up-regulated and 1,007 genes down-regulated. Thus, it seemed that cryptogein perception led to the activation of a very diverse set of TF, allowing the cell to precisely modulate target gene expression.

#### *Transcriptomic analysis identifies putative key actors of several plant defence pathways*

Receptor protein kinases play a fundamental role in plant response to biotic stress (Afzal *et al.* 2008). In the present study, 10 DEGs with similarities to various receptor protein kinases were identified. Among them, we found a 23-fold up-regulated protein serine kinase, CUST\_81807, which is highly homologous to AtPR5K, a receptor protein kinase involved in plant defence responses (Wang *et al.* 1996). Such protein has also been found in *Vitis vinifera* (Di Gaspero et Cipriani 2003). Furthermore, the most activated receptor kinase in our study, CUST\_51499 (128 times), encodes CRK1, a receptor protein kinase previously reported as essential for cytokinin signalling (Schäfer et Schmülling 2002). Additionally, expression of two DEGs (CUST\_60224 and CUST\_26237) similar to lectin protein kinases was also up-regulated 51- and 21-fold respectively. One of these genes may be essential for the perception of cryptogein and phosphorylation events downstream. Moreover, it is well known that LRR proteins are not only essential for the activation of defence genes after recognition between the plant and the product of an avirulence gene from the pathogen but also play important roles in various actions after ligand recognition (Afzal *et al.* 2008). Nevertheless, further study is required to better understand the role of these receptor kinase proteins in cryptogein signalling.

Several DEGs are also related to the NBS-LRR multigenic family, proteins capable of sensing cytosolic pathogenic effectors (Dangl et Jones 2001). The up-regulation of CUST\_23571 was the most significant followed by CUST\_77752 and CUST\_57981, which were increased by 116-, 83- and 25-fold respectively (table III-5). CUST\_23571 and CUST\_77752 encode coiled-coil-NB-LRR proteins (CC-NB-LRR) and may represent important defence signalling components in response to cryptogein. Furthermore, 3 sequences with homology to Toll-interleukin-1-Receptor-NBS-LRR (TIR-NBS-LRR) proteins were found to be up-regulated by 12-, 8- and 4- fold respectively (data not shown).

ID	Gene family	Ratio 'cryptogein'	Q-value	Ratio 'cryptogein + LaCl3'
<b>Cell wall modification</b>				
CUST_9368	expansin-like protein	421,6	6,02E-09	10,3
CUST_37912	pectinesterase family protein	107,7	3,35E-10	0,5
CUST_69538	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	75,9	4,89E-08	7,8
CUST_66158	xyloglucan endo-transglycosylase	29,6	1,23E-07	3,9
CUST_28475	alpha-expansin 5	29,5	1,65E-06	0,4
CUST_9294	glycosyl transferase family 1 protein	27,9	3,82E-06	3,9
CUST_59804	xyloglucan endo-transglycosylase	19,2	3,89E-06	2,4
CUST_27854	pectinesterase family protein	17,9	9,14E-07	1,1
CUST_58263	glycosyl hydrolase family 18 protein	17,1	1,71E-07	5,6
CUST_1987	xyloglucan endo-transglycosylase	16,1	2,64E-06	1,3
CUST_63633	expansin-like protein	15,9	2,02E-05	6,0
CUST_67966	xyloglucan endo-transglycosylase	14,9	2,09E-06	1,8
CUST_35388	xyloglucan endotransglycosylase	13,9	3,84E-06	1,8
CUST_34725	expansin-like protein	13,5	4,77E-05	4,5
CUST_11112	expansin-like protein a	11,9	3,24E-07	3,2
CUST_83815	arabinogalactan protein	7,0	1,19E-06	0,8
CUST_12326	pectin methylesterase inhibitor protein	6,6	8,39E-05	0,3
CUST_21163	atcslc04 (cellulose-synthase like c 4)	4,9	7,57E-06	0,9
<b>Cell wall modification</b>				
CUST_51985	expansin	0,01	1,90E-08	0,1
CUST_65105	xyloglucan endo-transglycosylase	0,1	6,65E-07	0,1
CUST_84418	xyloglucan endo-transglycosylase	0,1	2,39E-06	0,1
CUST_100307	beta-galactosidase like protein	0,1	1,05E-07	0,3
CUST_21005	beta-galactosidase like protein	0,1	4,18E-06	0,4
CUST_90893	beta-galactosidase like protein	0,1	3,59E-07	0,4
CUST_39306	beta-galactosidase like protein	0,1	7,95E-07	0,4
CUST_56284	pectate lyase	0,1	1,13E-05	0,1
CUST_18998	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0,1	1,66E-05	0,2
CUST_102304	pectate lyase	0,1	6,78E-06	0,1
CUST_92649	polygalacturonase	0,1	9,74E-05	0,3
CUST_71590	pectate lyase	0,1	4,43E-07	0,5
CUST_30570	pectate lyase	0,2	2,79E-04	0,1
CUST_56321	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0,2	3,44E-05	0,9
CUST_83704	beta-galactosidase	0,2	1,36E-05	0,3

**Tableau III-6. Cell wall-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.



Among 12 DEGs encoding very diverse pathogenesis-related proteins, the up-regulation of CUST\_10383, which encodes a class IV chitinase, was the most significant (187-fold; table III-5). It is noteworthy that not less than 8 (of 17) families of PR proteins were represented as DEGs. Two class IV chitinases (128- and 34-fold respectively), one thaumatin-like (23-fold), two proteinase-inhibitors (172-, and 18-fold respectively), eleven peroxidases (up to 750-fold, CUST\_10690), 3 ribonuclease-like proteins (138-, 31- and 28-fold respectively), one defensin (16-fold), and two lipid-transfer protein (data not shown) were up-regulated in response to cryptogein, highlighting the complexity of the disease signalling network in tobacco as it has been shown in other species including *Arabidopsis* (Thomma *et al.* 2001). Very interestingly, we identified a cell wall peroxidase (CUST\_10690) which was highly up-regulated (752-fold, table 5) and which has very high homology (94%) with a pepper peroxidase CaPO2. This peroxidase has been characterized as essential for local and systemic cell death and defence response to bacterial pathogens (Choi *et al.* 2007). Thus, this tobacco putative ortholog of CaPO2 may be responsible for the apoplastic production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ashtamker *et al.* 2007) and may play a role in cryptogein-induced programmed cell death (PCD) in tobacco BY-2 cells.

Two DEGs were related to programmed cell death (PCD) including *hsr201*, which was up-regulated by 93-fold (CUST\_10967; table III-5) and *HIN1*, which encodes a harpin. Thus, our study highlighted several DEGs with similarity to HR-related proteins (HSR201, harpin and TIR-NBS-LRR), which is in agreement with the cryptogein-induced PCD observed in elicited tobacco BY-2 cells (Amelot *et al.* 2010).

Eleven DEGs with similarity to previously identified defence-related sequences were also found to be up-regulated (range of up-regulation from 15- to 229-fold; table III-5). Indeed, Durrant *et al.* (2000) have characterized 263 genes whose expression was rapidly enhanced during avr9-cf9 interaction in tobacco cell cultures. In our study, we have shown that at least 11 of them were strongly elicited by a cryptogein treatment, suggesting an overlapping transcriptomic response between *Avr* gene-dependent resistance and cryptogein-mediated defence as it has already been shown in *Arabidopsis* cell cultures between *Avr* gene dependent defence responses and bacterial pathogenesis (Navarro *et al.* 2004).

#### *Transcriptomic analysis identifies genes involved in cell wall rearrangements*

Plants cell-wall related enzymes are involved in diverse functions. These include assimilation of photosynthetic products, synthesis of various cell wall polymers, synthesis and conversion of glycosylated compounds and modifications of cell wall properties and/or composition in response to biotic stresses (Hückelhoven 2007). Here we show that genes encoding many of the diverse cell-wall-related proteins were affected by the cryptogein treatment. Indeed, genes encoding glycosyl transferases and hydrolases (GT and GH respectively), xyloglucan endo-transglycosylases (XET), cellulose synthases, expansins and pectinesterases were differentially modulated by cryptogein (table III-6).



Pectins are major components of cell walls as they form a network including chemically diverse polymers such as homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. They are particularly important for cell wall strengthening in response to cryptogein in tobacco (Kieffer *et al.* 2000; Lherminier *et al.* 2003). It is noteworthy that two main gene families are modulated by cryptogein in an opposite way. Indeed, 3 up-regulated DEGs encode pectin esterases whereas 4 down-regulated DEGs encode pectate lyases (table III-6). Both enzymes encode pectin-degrading enzymes, suggesting that cryptogein perception led to selective gene modulation and appropriate pectin remodeling. Very interestingly, among the 4 down-regulated pectate lyase genes, CUST\_30570 encode a pectate lyase that is 74% homolog to AtPRM6, a pectate lyase identified as a powdery mildew susceptibility factor in *Arabidopsis* (Vogel *et al.* 2002). Mutation of this gene led to plant resistance, suggesting that this gene is required for compatible interaction. Thus, tobacco BY-2 cells defence response may require the down-regulation of this pectate lyase.

On the other hand, 3 DEGs encoding pectin esterase proteins were found up-regulated. One of them, CUST\_12326, is a pectin methylesterase inhibitor protein which has 54% homology with AtPMEI-1, a protein which interacts with plant pectin methylesterase to modulate the degree of pectin methylesterification (Lionetti *et al.* 2007). Such modulation is important for cell wall integrity as pectins are targets of fungal polygalacturonases. Thus, our results confirm that the control of the degree of methylesterification is important for plant defence as it has been shown in *Arabidopsis* (Lionetti *et al.* 2007) and in pepper (An *et al.* 2009).

Sixteen DEGs (of 50) encoding xyloglucan endotransglycosylases (XETs) were found to be modulated by cryptogein perception. Seventy-five percent of these DEGs were up-regulated, the others being down-regulated. These proteins function as cell-wall loosening enzymes (for review Rose *et al.* 2002) and it may be hypothesized that tobacco cells respond to cryptogein perception by modulating its cell wall capacity to allow elongation/growth.

We also found several sequences corresponding to cell wall-related enzymes that were highly up-regulated in response to cryptogein. CUST\_58263 (by 17-fold, table III-6) encodes a glycosyl hydrolase with chitinase III activity and may be essential for counter-attacking the fungal cell wall. We also identified a cellulose synthase (up-regulated by 4.90-fold, CUST\_21163) highly homologous to AtCslc4, a member of Ces-like (Cesl) family whose function is still unknown.

One of the most up-regulated gene in response to cryptogein encodes an expansin (421-fold, table III-6), a protein that is capable of loosening cell walls for proper cell growth (Li *et al.* 2003). It is noteworthy that another expansin gene represents the most down-regulated gene (0,01-fold, table III-6). Although expansins have been characterized mainly with focus to plant development, it is plausible that these enzymes could have a role in plant defence. Furthermore, it seems that two members of the family may have opposite roles in cell expansion and loosening in response to cryptogein.

ID	Gene family	Ratio 'cryptogein'	Q-value	Ratio 'cryptogein + LaCl3'
<b>Secondary metabolism</b>				
CUST_8294	5-epi-aristolochene synthase	332,3	3,80E-10	5,6
CUST_7564	short-chain alcohol dehydrogenase	288,6	7,38E-10	2,7
CUST_11033	CCoAOMT 4	273,0	6,08E-08	21,5
CUST_9725	5-epi-aristolochene synthase	261,6	7,84E-09	5,0
CUST_24543	serine decarboxylase	245,5	1,51E-07	14,0
CUST_102981	CCoAOMT 3	133,2	1,40E-08	13,2
CUST_103399	tropinone reductase i	76,9	7,23E-07	7,0
CUST_33141	short-chain alcohol dehydrogenase	72,7	2,67E-08	2,8
CUST_51610	phenylalanine ammonia-lyase	63,2	2,65E-07	2,4
CUST_103220	phenylalanine ammonia-lyase	49,2	5,48E-07	3,0
CUST_56210	cinnamyl-alcohol dehydrogenase eli3-1	40,4	4,15E-08	1,2
CUST_81888	carotenoid cleavage dioxygenase 1	32,2	6,59E-09	1,0
CUST_24256	phenylalanine ammonia-lyase	28,7	1,78E-07	2,5
CUST_86045	flavin monooxygenase	28,6	1,97E-06	8,9
CUST_8376	tyramine hydroxycinnamoyltransferase	25,7	3,80E-07	6,3
CUST_98946	hydroxycinnamoyl-shikimate quinate hydroxycinnamoyltransferase	24,1	8,54E-08	3,2
CUST_9820	4-coumarate:coenzyme a ligase	18,9	2,50E-07	1,7
CUST_50675	4-coumarate:coenzyme a ligase	17,3	1,30E-05	1,6
CUST_102420	pinoresinol-lariciresinol reductase	14,5	2,28E-04	1,2
CUST_95525	cinnamate 4-hydroxylase	11,3	1,86E-03	5,2
CUST_98873	anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase	10,9	1,59E-07	0,5
CUST_24660	-dopa dioxygenase extradiol	10,5	1,12E-05	2,6
CUST_40986	caffeic acid o-methyltransferase	9,8	1,47E-06	1,4
CUST_12741	ornithine decarboxylase	9,8	7,21E-08	1,5
CUST_58651	prephenate dehydratase	8,4	6,98E-08	0,9
CUST_51886	chalcone-flavanone isomerase familyexpressed	7,9	1,24E-05	2,5
CUST_101437	-dopa dioxygenase extradiol	7,0	1,09E-06	0,9
CUST_10793	prephenate dehydratase	6,3	8,19E-07	1,0
CUST_85537	flavonoid 3-glucosyl transferase	5,1	1,45E-03	2,9
<b>Secondary metabolism</b>				
CUST_63443	flavanone 3-beta-hydroxylase	0,1	4,76E-08	0,3
CUST_86410	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0,1	1,41E-06	0,8
CUST_72547	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	0,1	2,74E-07	0,4
CUST_97232	hydroxyphenylpyruvate reductase	0,2	5,07E-06	0,8

**Tableau III-7. Secondary metabolism-related genes with significantly altered transcript levels after a 4hour-exposure to cryptogein.**

Genes were listed on the basis of significance criteria (minimal fold change : 4 and maximal q-value : 0,01). Positive and negative ratios are based on 4 biological replicates.

Finally, we have shown that several DEGs encoded hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). One, CUST\_69538, was activated by 75-fold in response to cryptogein (table III-6) whereas CUST\_83815, which encodes an arabinogalactan protein, was activated by 7-fold. It is well-known that these proteins may function in strengthening the cell wall to impede fungal growth (Kawalleck *et al.* 1995) and it has been reported several times that fungal elicitation led to the activation of HRGPs (Lawton *et al.* 1987; Garcia-Muniz *et al.* 1998). Thus, tobacco BY-2 cells challenged by cryptogein would reinforce their cell walls with HRGPs.

#### *Cryptogein activates genes of the secondary metabolism*

Previous studies from our group have demonstrated that cryptogein perception in tobacco BY-2 cells remodels the phenylpropanoid pathway (Amelot *et al.* 2010). Indeed, most of the genes within the phenylpropanoid pathway were substantially activated after elicitation. Our microarray data confirm our previous results since CCoAOMT (isoforms 4 and 3), PAL, HCT, 4CL, C4H and COMT genes were up-regulated in response to cryptogein. (Table III-7). Furthermore, although we have demonstrated that *bona fide* CAD was not activated by cryptogein treatment (Amelot *et al.* 2010), we show here that several CAD-like genes (also called ELI or short chain alcohol dehydrogenase) were widely up-regulated (up to 288-fold, table III-7). Moreover, these sequences are highly homologous to known ELI proteins from parsley (Schmelzer *et al.* 1989) and *Arabidopsis* (Tronchet *et al.* 2010) that were identified in plant-pathogen interactions.

We also found several DEGs encoding enzymes dealing with the transformation of products of the phenylpropanoid pathway, including a serine decarboxylase (CUST\_24543) and a tyramine hydroxycinnamoyltransferase (THT, CUST\_8376). Both corresponding genes are strongly activated (by 245- and 25-fold respectively) and suggest that cryptogein perception could lead to the formation of volatiles phenolics (Tieman *et al.* 2006) and phenolamines respectively.

We further identified a tropinone reductase (CUST\_103399, table III-7), up-regulated by 76.95-fold, which is also a short-chain dehydrogenase. This enzyme catalyzes the reduction of tropinone, a key component of the tropane alkaloid metabolism leading to calystegines synthesis (Nakajima *et al.* 1993; Brock *et al.* 2008). To our knowledge, this enzyme is biochemically well characterized, especially in Solanaceae species (Dräger 2006), but its role in plant development and/or stress responses is unclear. Our results suggest that this protein could have a role in cryptogein-induced responses, a hypothesis strengthened by recent work showing that *Convolvulus sepium* plants expressing cryptogein, showed a high accumulation of calystegines (Chaudhury *et al.* 2009).

The initial step in the conversion of the isoprenoid intermediate farnesyl diphosphate to the sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in elicitor-treated tobacco tissues is catalyzed by an inducible sesquiterpene cyclase, named 5-epi-aristolochene synthase (EAS; Vögeli and Chapple 1988). Two DEGs (CUST\_8294 and CUST\_9725) encoding such enzymes are strongly up-regulated, by 332- and 261-fold respectively, in cryptogein-treated tobacco cells.

	DEGs	Ca Independent	Ca Dependent	Ca Independent(%)	Ca Dependent(%)	p-value (Fisher test)
total	3819	343	3476	0,090	0,910	
signal transduction	185	36	149	0,195	0,805	2,53E-05
stress & disease	182	7	175	0,038	0,962	1,48E-02
Hormones	77	9	68	0,117	0,883	4,19E-01
Oxidative burst	31	2	29	0,065	0,935	1,00E+00
Cell wall modification	97	10	87	0,103	0,897	5,92E-01
Transcription factors	149	16	133	0,107	0,893	4,65E-01
Oxylipin pathway	37	0	37	0,000	1,000	7,27E-02

**Tableau III-8. Functional categories that show a significant deviation from the background binomial distribution for inhibitor sensitivity.**

As background distribution, the total complement of inhibitor-sensitive transcripts (343 out of a total of 3819) was used. Categories that are more calcium-dependent or calcium-independent compare to the overall background are shown in red and blue respectively.

Furthermore, cryptogein-mediated gene induction is mostly  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive (table III-7). These results are in total accordance with previous studies showing that tobacco EAS are implicated in the synthesis of capsidiol (a sesquiterpene phytoalexin) and that its expression was modulated by AOS and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling events (Vogeli *et al.* 1992; Rusterucci *et al.* 1996).

Two DEGs were identified as encoding apocarotenoid biosynthesis enzymes. CUST\_81888 (up-regulated by 32-fold) encodes a tobacco carotenoid cleavage dioxygenase 1, an enzyme that cleave 9, 10 double bonds carotenoids such as phytoene or lycopene (Auldridge *et al.* 2006). On the other hand, CUST\_72547, which was down-regulated by 10-fold, encodes a 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase, which is involved in cleaving 11, 12 double bonds carotenoids and is essential for the synthesis of ABA precursors (Auldridge *et al.* 2006). Thus, cryptogein may lead to the selective modulation of apocarotenoid enzymes.

### ***Functional gene categories show differential sensitivity to calcium***

For a majority of unigenes whose transcript abundance was significantly modulated by a cryptogein treatment, this modulation was prevented or reduced by a co-treatment with a  $\text{Ca}^{2+}$  signal inhibitor  $\text{LaCl}_3$ . Tables 2-7 show that in most cases there was a large difference between the ratio values observed in the ‘cryptogein condition’ and in the ‘cryptogein +  $\text{LaCl}_3$ ’ condition. In the whole set of 3,819 cryptogein-responsive unigenes, 3,476 (91%) were sensitive to the inhibitor. However, the relative proportions of inhibitor-sensitive and -insensitive transcripts varied greatly across functional categories of cryptogein-responsive genes (Table III-8). To identify functional categories which are likely to require a  $\text{Ca}^{2+}$  signalling event for transcriptional regulation and those which are not, data were therefore analyzed for all 3,819 cryptogein-responsive genes with respect to inhibitor sensitivity. In the complete dataset of 2,812 up-regulated genes, 2,548 were found to be inhibitor-sensitive and 234 were inhibitor-insensitive. Among down-regulated genes, 879 out of a total of 1,007 were sensitive, whereas 109 genes were insensitive to inhibitor. Data from each functional category were analyzed to test whether the distribution of inhibitor-sensitive and -insensitive genes in that particular category deviated significantly from the distribution in the reference dataset consisting of the whole set of 3,819 transcripts. Table III-8 reports those categories that showed a significant change from the null hypothesis  $P1=P2$  (i.e. distribution in the category is not significantly different from the distribution in the reference set). Among categories of genes that were modulated by cryptogein, those involved in stress & disease and involved in oxylin pathway were significantly inhibitor-sensitive (Table III-8; 175 out of 182 and 37 of 37 genes respectively). It is noteworthy that all DEGs related to oxylin pathway were affected by the  $\text{LaCl}_3$  treatment. Thus, it seems that this particular metabolic pathway involved in defence response is totally under calcium-governance. This result is consistent with the findings of Moscatiello *et al.* 2006 who have shown that in *Arabidopsis* cell cultures elicited by OGs, the up-regulation of the genes implicated in jasmonate pathway (one branch of the oxylin pathway) was severely affected by a  $\text{LaCl}_3$  treatment.





On the other hand, we found that the cryptogein-modulated genes involved in signal transduction were significantly inhibitor-insensitive as compared to the overall distribution. This may be explained by the fact that, in response to cryptogein, several events occur prior to calcium signalling. Thus, such events would require calcium-insensitive transcriptional activation of genes implicated in very early events.

In all other categories, no evidence for significant deviation from the background distribution of inhibitor sensitivity was obtained. Our analysis suggests that two of the processes that contribute to rapid cryptogein responses may require an upstream  $\text{Ca}^{2+}$  signal. By contrast, many aspects of plant defence rely on both  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent upstream events.



### III-7 Conclusion

We have documented the transcriptome changes that occur in tobacco BY-2 cells challenged by the elicitor, cryptogein. More than 4,000 genes, or ~10% of the tobacco transcriptome studied here, were identified as differentially expressed, which is likely to be a conservative estimate due to the use of four biological replicates. Apart from a large number of unknown and hypothetical proteins, our results provide an extensive catalog of signalling components, regulatory factors, and defence-related transcripts involved in cryptogein perception, signalling and response. The transcriptome data also enabled to propose functions for some of the vast number of genes which are still poorly characterized both at the biochemical and physiological levels.

Moreover, using a microarray-based approach with  $\text{LaCl}_3$  as a pharmacological tool, it was possible to dissect the cryptogein-induced signalling into  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent components and to establish the role of cryptogein in the transcriptional regulation of target genes involved in the pathogen response. Analyzed on the basis of sensitivity to inhibitors that abolish the  $\text{Ca}^{2+}$  transient, specific functional categories were found to be more  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent or  $\text{Ca}^{2+}$ -independent. Although these data do not provide direct evidence for altered protein activity, they may form an indication that specific biochemical functions do require an initial  $\text{Ca}^{2+}$  signal. First, many of the genes involved in plant defence responses failed to be induced after inhibitor treatment and therefore seem to require an upstream  $\text{Ca}^{2+}$  signal. Furthermore, the group of genes involved in the biosynthesis of oxylipins showed extreme (100%) sensitivity. By contrast, genes potentially implicated in signal transduction seem less dependent on the calcium signal itself.



## III-8 References

- Afzal A.J., Wood A.J. and Lightfoot D.A.** 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21(5):507-517.
- Amelot N., Carrouché A., Danoun S., Bourque S. Haïech J., Pugin A, Ranjeva R., Grima-Pettenati J., Mazars C. and Brière C.** 2010. Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. *Plant & Cell Environ.* Submitted.
- An S.H., Choi H.W., Hong J.K. and Hwang B.K.** 2009. Regulation and function of the pepper pectin methylesterase inhibitor (CaPMEI1) gene promoter in defence and ethylene and methyl jasmonate signaling in plants. *Planta* 230(6):1223-1237.
- Andrews D.L., Beames B., Summers M.D. and Park W.D.** 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J.* 252(1):199-206.
- Ashtamker C., Kiss V., Sagi M., Davydov O. and Fluhr R.** 2007. Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 143(4):1817-1826.
- Auldridge M.E., McCarty D.R. and Klee H.J.** 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(3):315-321.
- Balague C., Lin B., Alcon C., Flottes G., Malmstrom S., Kohler C., Neuhaus G., Pelletier G., Gaymard F., and Roby D.** 2003. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15: 365-379.
- Benjamini Y. and Hochberg Y.** 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57:289-300.
- Blein J.P., Milat M.L. and Ricci P.** 1991. Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *Plant Physiol.* 95(2):486-491.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P. and Ricci P.** 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* 102:181-192.
- Bourque S., Binet M.N., Ponchet M., Pugin A. and Lebrun-Garcia A.** 1999. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem.* 274(49):34699-34705.
- Brock A., Brandt W. and Dräger B.** 2008. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant J.* 54(3):388-401
- Browse J.** 2009. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry* 70(13-14):1539-1546.
- Chaudhuri K., Das S., Bandyopadhyay M., Zalar A., Kollmann A., Jha S. and Tepfer D.** 2009. Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res.* 18(1):121-134.
- Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T. and Luan S.** 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129(2):661-677.
- Choi H.W., Kim Y.J., Lee S.C., Hong J.K. and Hwang B.K.** 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defence response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* 145(3):890-904.
- Dangl J.L. and Jones J.D.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.



- Di Gaspero G. and Cipriani G.** 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol. Genet. Genomics*. 269(5):612-623.
- Dowd C., Wilson I.W. and McFadden H.** 2004. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(6):654-667.
- Dräger B.** 2006. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67(4):327-337.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.** 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12(6):963-977.
- Elmayan T., Fromentin J., Riondet C., Alcaraz G., Blein J.P. and Simon-Plas F.** 2007. Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ.* 30(6):722-732.
- Eulgem T. and Somssich I.E.** 2007. Networks of WRKY transcription factors in defence signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(4):366-371.
- Garcia-Brügger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D. and Pugin A.** 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defences. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19:711-724.
- García-Muniz N., Martínez-Izquierdo J.A. and Puigdomènech P.** 1998. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol. Biol.* 38(4):623-632.
- Gardner H.W.** 1991. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1084(3):221-239.
- Gautier L., Cope L., Bolstad B.M. and Irizarry R.A.** 2004. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20(3):307-315.
- Gentleman R., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., et al.** 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5(R80).
- Gfeller A., Liechti R. and Farmer E.E.** 2010. *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal* 16;3(109):cm4.
- Grant M. and Lamb C.** 2006. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(4):414-420.
- Greenberg J.T. and Yao N.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6(3):201-211.
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I.** 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305(5685):855-858.
- Hückelhoven R.** 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-127.
- Hui D., Iqbal J., Lehmann K., Gase K., Saluz H.P. and Baldwin I.T.** 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol.* 131(4):1877-1893.
- Jensen M.K., Hagedorn P.H., de Torres-Zabala M., Grant M.R., Rung J.H., Collinge D.B. and Lyngkjær M.F.** 2008. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(6):867-880.
- Kawalleck P., Schmelzer E., Hahlbrock K. and Somssich I.E.** 1995. Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* 247(4):444-452.





- Keller H., Blein J.P., Bonnet P. and Ricci P.** 1996. Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiol.* 110(2):365-376.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T. and Blein J.P.** 2000. The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *J. Exp. Bot.* 51(352):1799-1811.
- Lam E., Kato N. and Lawton M.** 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411(6839):848-853.
- Lam E.** 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5(4):305-315.
- Lawton M.A. and Lamb C.J.** 1987. Transcriptional activation of plant defence genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol. Cell. Biol.* 7(1):335-341.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R. and Pugin A.** 2002 Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14(10):2627-2641.
- Lecourieux-Ouaked F., Pugin A. and Lebrun-Garcia A.** 2000. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defence reactions in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(8):821-829.
- Lherminier J., Benhamou N., Larrue J., Milat M.L., Boudon-Padieu E., Nicole M. and Blein J.P.** 2003. Cytological Characterization of Elicitin-Induced Protection in Tobacco Plants Infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Phytopathology* 93(10):1308-1319.
- Li C. and Wong W.H.** 2001. Model-based analysis of oligonucleotides arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology* 2(8):research0032.1-0032.11.
- Li Y., Jones L. and McQueen-Mason S.** 2003. Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(6):603-610.
- Libault M., Wan J.R., Czechowski T., Udvardi M. and Stacey G.** 2007. Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defence elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:900-911.
- Lionetti V., Raiola A., Camardella L., Giovane A., Obel N., Pauly M., Favaron F., Cervone F. and Bellincampi D.** 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 143(4):1871-1880.
- Maeda K., Kimura S., Demura T., Takeda J. and Ozeki Y.** 2005. DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (*DcPAL1*) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Mol. Biol.* 59(5):739-752.
- Maurel C., Verdoucq L, Luu D.T. and Santoni V.** 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595-624.
- Mori I.C., Murata Y., Yang Y., Munemasa S., Wang Y.F., Andreoli S., Tiriach H., Alonso J.M., Harper J.F., Ecker J.R., Kwak J.M. and Schroeder J.I.** 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>(2+)</sup>-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* 4(10):e327.
- Moscatiello R., Mariani P., Sanders D. and Maathuis F.J.** 2006. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* 57(11):2847-2865.
- Nakajima K., Hashimoto T. and Yamada Y.** 1993. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(20):9591-9595.



- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T. and Jones J.D.** 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defence responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135(2):1113-1128.
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198:249-266.
- Oecking C. and Jaspert N.** 2009. Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(6):760-765.
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Graziana A., Muto S., Ranjeva R. and Mazars C.** 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 30:413-421.
- Pfaffl M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y. and Blein J.P.** 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol Life Sci.* 56(11-12):1020-1047.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G. and Pernollet J.C.** 1989 Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183:555-563.
- Roberts M.R.** 2003. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci.* 8(5):218-223.
- Rose J.K., Braam J., Fry S.C. and Nishitani K.** 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43(12):1421-1435.
- Rowland O., Ludwig A.A., Merrick C.J., Baillieux F., Tracy F.E., Durrant W.E., Fritz-Laylin L., Nekrasov V., Sjölander K., Yoshioka H. and Jones J.D.** 2005. Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell* 17(1):295-310.
- Rusterucci C., Stallaert V., Milat M.L., Pugin A., Ricci P. and Blein J.P.** 1996. Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111(3):885-891.
- Schäfer S. and Schmölling T.** 2002. The CRK1 receptor-like kinase gene of tobacco is negatively regulated by cytokinin. *Plant Mol. Biol.* 50(2):155-166.
- Scheel D.** 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(4):305-310.
- Schmelzer E., Kruger-Lebus S. and Hahlbrock K.** 1989. Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression around Sites of Attempted Fungal Infection in Parsley Leaves. *Plant Cell* 1(10):993-1001.
- Shinya T., Galis I., Narisawa T., Sasaki M., Fukuda H., Matsuoka H., Saito M. and Matsuoka K.** 2007. Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell Physiol.* 48:1404-1413.
- Simon-Plas F., Rusterucci C., Milat M.L., Humbert C., Montillet J.L. and Blein J.P.** 1997. Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Envir.* 20:1573-1579.
- Simon-Plas F., Elmayan T. and Blein J.P.** 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31(2):137-147.
- Smyth G.K.** 2005. Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, pages 397-420.



- Takahashi K., Isobe M., Knight M.R., Trewavas A.J. and Muto S.** 1997. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in tobacco suspension-culture cells. *Plant Physiol.* 113:587-594.
- Tavernier E., Wendehenne D., Blein J.P. and Pugin A.** 1995. Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 109(3):1025-1031.
- Thomma B.P., Penninckx I.A., Broekaert W.F. and Cammue B.P.** 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13(1):63-68.
- Tieman D., Taylor M., Schauer N., Fernie A.R., Hanson A.D. and Klee HJ.** 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(21):8287-8292.
- Tronchet M., Balagué C., Kroj T., Jouanin L. and Roby D.** 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 11(1):83-92.
- Tyerman S.D., Niemietz C.M. and Bramley H.** 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25(2):173-194.
- Vogel J.P., Raab T.K., Schiff C. and Somerville S.C.** 2002. PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14(9):2095-2106.
- Vögeli U. and Chappell J.** 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 88(4):1291-1296.
- Vögeli U., Vögeli-Lange R. and Chappell J.** 1992. Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell-suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists. *Plant Physiol.* 100(3):1369-1376.
- Wang C., Zien C.A., Afithile M., Welti R., Hildebrand D.F. and Wang X.** 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *arabidopsis*. *Plant Cell* 12(11):2237-2246.
- Wang X., Zafian P., Choudhary M. and Lawton M.** 1996. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defence proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(6):2598-2602.
- Wang X.** 2004. Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(3):329-336.
- Weber H., Chételat A., Caldelari D. and Farmer E.E.** 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11(3):485-494.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M., Barbier-Brygoo H. and Pugin A.** 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defence responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14:1937-1951.
- Wendehenne D., Durner J. and Klessig D.F.** 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4):449-455.
- Werner M., Uehlein N., Proksch P. and Kaldenhoff R.** 2001. Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta* 213(4):550-555.
- Xu J., Tian Y.S., Peng R.H., Xiong A.S., Zhu B., Jin X.F., Gao F., Fu X.Y., Hou X.L. and Yao Q.H.** 2010. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 231(6):1251-1260.



**CONCLUSIONS GENERALES ET  
PERSPECTIVES**





Mes travaux de thèse ont permis d'améliorer la compréhension générale des mécanismes de défense mis en place en réponse à la cryptogéine, et notamment de caractériser l'implication et l'importance du métabolisme des phénylpropanoïdes, de mettre en évidence un couplage fin entre la signature calcique induite et la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans ce métabolisme et enfin d'identifier de potentiels effecteurs des voies de signalisation activées par la cryptogéine ainsi que des acteurs contribuant à la mise en place des réponses adaptatives.

Ces résultats nous ont aussi conduit à nous poser de nouvelles questions et à générer des hypothèses qui ouvrent de nombreuses perspectives de travail dont certaines sont développées ci-après :

### **LE REMODELAGE DU MÉTABOLISME DES PHÉNYLPROPANOÏDES EST UN ÉVÉNEMENT IMPORTANT DE RÉPONSE À LA CRYPTOGEÏNE**

Des cellules de tabac BY-2 élicitées par la cryptogéine répondent notamment par un remodelage du métabolisme des phénylpropanoïdes. L'ensemble des gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse, excepté le gène *CAD*, sont rapidement activés après la perception de l'éliciteur. Le fait que le gène *CAD* ne soit absolument pas induit (voire réprimé) par la cryptogéine suggère que les cellules sont capables d'accumuler d'importantes quantités d'aldéhydes tels que le coniféraldéhyde ou le 5-hydroxyconiféraldéhyde. Hors, les résultats que nous avons obtenus montrent, au contraire, que les cellules synthétisent de manière accrue des acides hydroxycinnamiques, et notamment de l'acide férulique et de l'acide hydroxyférulique. Il semble donc que le coniféraldéhyde puisse être converti par oxydation en acide férulique par une aldéhyde déshydrogénase telle que celle codée par *REF1* caractérisée chez *Arabidopsis thaliana*. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait envisageable de supprimer par RNAi l'expression de l'orthologue putatif chez le tabac, lequel est fortement activé en réponse à la cryptogéine. La caractérisation de lignées cellulaires sous-exprimant ce gène permettrait de confirmer l'existence chez le tabac d'une voie de transformation des aldéhydes en leurs acides carboxyliques correspondants. Afin de préciser le rôle de ces derniers dans les réponses de défense (renforcement de la paroi, toxicité accrue pour le pathogène...), il serait judicieux de passer à un modèle en plante entière. Pendant ma thèse, j'ai commencé à tester la faisabilité de cette approche en réalisant des infiltrations de cryptogéine (résultats non présentés) chez 3 variétés de tabac différentes. J'ai ainsi vérifié que l'augmentation des niveaux de transcrits des gènes de la voie des phénylpropanoïdes était très comparable à celle constatée dans les cellules. Outre la validation *in planta* de données obtenues sur cellules, ces résultats permettent d'envisager de rechercher des plants de tabac mutés pour le gène *Aldh* dans la collection de mutants EMS Tilling d'Imperial Tobacco. Une fois obtenus, ces mutants permettraient, par comparaison avec des plantes sauvages préalablement élicitées par la cryptogéine, et *via* des tests de digestibilité et des essais



d'inoculation avec *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*, de préciser le rôle des composés dans la défense de la plante.

### **LE DECODAGE DE LA SIGNATURE CALCIQUE INDUITE PAR LA CRYPTOGEINE PERMET L'ACTIVATION SELECTIVE DE GENES DE LA VOIE DES PHENYLPROPANOÏDES.**

L'utilisation d'agents pharmacologiques, le  $\text{LaCl}_3$  et l'EGTA, capables d'inhiber l'influx calcique généré par la perception de la cryptogéine nous a permis de démontrer que l'ensemble des évènements liés au métabolisme des phénylpropanoïdes étaient strictement dépendants du calcium. De façon plus fine, nous avons montré que l'expression des principaux gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes était directement corrélée à différentes caractéristiques de la signature calcique spécifique de la cryptogéine. Nous avons identifié deux groupes de gènes régulés de manière distincte selon le contexte calcique. Ainsi, les gènes *PAL*, *HCT* et *CCoAOMT*, sont activés par de faibles concentrations de cryptogéine alors que des concentrations plus importantes conduisent à une diminution des niveaux de transcrits, et leur expression est très fortement corrélée au plateau calcique prolongé. Ces résultats nous ont conduit à construire un modèle descriptif visant à expliquer le comportement des gènes en fonction de l'intensité du stimulus, et donc, de l'intensité du signal calcique. Pour ces 3 gènes, la composante activatrice du signal calcique est contenue dans la phase de plateau prolongée qui apparaît pour de très faibles concentrations de cryptogéine. Par contre, pour une intensité de stimulus plus importante, une composante inhibitrice codée par le premier pic calcique se met en place et entraîne une diminution de l'accumulation des transcrits.

En revanche, les gènes *C4H*, *4CL*, *COMT* et *CCR* appartiennent à un deuxième groupe de gènes, préférentiellement activés par de fortes concentrations de cryptogéine, et dont l'expression est fortement corrélée à l'intensité du premier pic calcique.

Ces résultats démontrent qu'à la fois l'intensité et la forme du signal calcique jouent un rôle dans l'activation cryptogéine-dépendante des gènes de la voie des phénylpropanoïdes, suggérant la mise en place par la cellule de mécanismes très finement régulés de contrôle de la transcription. La composition de ces deux groupes ne renseigne pas *a priori* sur leur signification physiologique mais constitue une piste pour rechercher les facteurs de transcription impliquée dans cette régulation différentielle.

### **LA PERCEPTION DE LA CRYPTOGEINE INDUIT LE REMODELAGE DE 10% DU TRANSCRIPTOME.**

Une approche transcriptomique globale basée sur l'utilisation de microarrays couvrant une large part du transcriptome de tabac nous a permis d'identifier 3 819 gènes différentiellement exprimés en réponse à la cryptogéine.



Parmi ces gènes se trouvent des acteurs essentiels à la fois dans la voie de signalisation de la cryptogéine et dans les voies effectrices des défenses. Plusieurs kinases (dont 1 proche homologue d'une kinase identifiée comme essentielle dans l'établissement de la HR chez le tabac), plusieurs canaux ioniques (y compris un CNGC orthologue putatif de HLM1, acteur essentiel des voies de défense conduisant à l'établissement de la HR chez *Arabidopsis*) et un grand nombre de facteurs de transcription constituent des cibles d'intérêt pour des caractérisations fonctionnelles futures.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un grand nombre de gènes codant des protéines PR non encore caractérisées dans la réponse cryptogéine, ainsi qu'une peroxydase potentiellement impliquée dans la synthèse d' $H_2O_2$  apoplastique ; tous sont d'excellents candidats pour des rôles clés dans l'établissement des défenses.

La voie de biosynthèse des oxylipines semble être un élément essentiel des voies effectrices de défense induites par la cryptogéine. En effet, non seulement la branche conduisant à la synthèse de dérivés du jasmonate, mais également la branche conduisant à la formation de phytoalexines de type divinyl éther sont fortement induites. Il serait par ailleurs nécessaire de vérifier l'accumulation de ces phytoalexines dans des cellules élicitées par la cryptogéine.

Finalement, nous avons noté l'activation d'un certain nombre de gènes codant des protéines impliqués dans les réarrangements pariétaux et la synthèse de métabolites secondaires (y compris les gènes de la voie des phénylpropanoïdes).

Afin d'aller plus loin et de limiter le nombre de candidats, nous avons effectué une analyse transcriptomique de la cinétique d'activation des gènes en réponse à la cryptogéine. Cette expérience en cours d'exploitation va nous permettre de regrouper les gènes en « clusters » selon leur cinétique d'expression et de sélectionner des gènes candidats pour une analyse fonctionnelle en fonction de leur appartenance à un cluster d'expression. A titre d'exemple, nous avons d'ores et déjà identifié un couple de partenaires potentiels dont la cinétique d'activation est rigoureusement identique. Il s'agit d'une CBL et d'une CIPK, deux protéines connues pour interagir en réponse à des stimuli calciques et pour phosphoryler des protéines cibles.

En conclusion, ce travail a permis d'approfondir notre connaissance des voies de signalisation induites par la cryptogéine et du rôle du signal calcique dans celles-ci. Par ailleurs, il ouvre de nombreuses perspectives de recherche tant au niveau de l'analyse fonctionnelle de nouveaux acteurs clés identifiés, qu'au niveau de la compréhension des mécanismes calcium-dépendants de régulation de la transcription chez le tabac.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





## -- A --

- Abramovitch R.B., Anderson J.C. and Martin G.B.** 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:601-611.
- Achnine L., Blancaflor E.B., Rasmussen S. and Dixon R.A.** 2004. Co-localization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16:3098-3109.
- Afzal A.J., Wood A.J. and Lightfoot D.A.** 2008. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21(5):507-517.
- Albrecht V., Ritz O., Linder S., Harter K. and Kudla J.** 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *EMBO J.* 20:1051-1063.
- Alfenas-Zerbini P., Maia I.G., Fávoro R.D., Cascardo J.C., Brommonschenkel S.H. and Zerbini F.M.** 2009. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *Mol Plant Microbe Interact.* 22(3):352-361.
- Ali R., Zielinski R.E. and Berkowitz G.A.** 2006. Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast. *J. Exp. Bot.* 57: 125-138.
- Ali R., Ma W., Lemtiri-Chlieh F., Tsaltas D., Leng Q., von Bodman S., and Berkowitz G.A.** 2007. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19: 1081-1095.
- Allen D.G., Blinks J.R. and Prendergast R.G.** 1977. Aequorin Luminescence: Relation of Light Emission to Calcium Concentration-A Calcium-Independent Component. *Science* 195(4282):996-998.
- Allen G.J. and Sanders D.** 1994. Two voltage-gated, calcium release channels coreside in the vacuolar membrane of broad bean guard cells. *Plant Cell* 6:685-694.
- Allen G.J., Muir S.R. and Sanders D.** 1995 Release of Ca<sup>2+</sup> from Individual Plant Vacuoles by Both InsP<sub>3</sub> and Cyclic ADP-Ribose. *Science* 268:735-737.
- Allen G.J., Kwak J.M., Chu S.P., Llopis J., Tsien R.Y., Harper J.F. and Schroeder J.I.** 1999. Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 19(6):735-747.
- Allen G.J., Chu S.P., Schumacher K., Shimazaki C.T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S.D., Tallman G., Tsien R.Y., Harper J.F., Chory J. and Schroeder J.I.** 2000. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis* det3 mutant. *Science* 289(5488):2338-2342.
- Allen G.J., Chu S.P., Harrington C.L., Schumacher K., Hoffmann T., Tang Y.Y., Grill E. and Schroeder J.I.** 2001a. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411(6841):1053-1057.
- Allen G.J. and Schroeder J.I.** 2001b. Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling. *Science STKE* RE13.
- Allen G.J., Murata Y., Chu S.P., Nafisi M. and Schroeder J.I.** 2002. Hypersensitivity of abscisic acid induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant era1-2. *Plant Cell* 14:1649-1662.
- Allina S.M., Pri-Hadash A., Theilmann D.A., Ellis B.E. and Douglas C.J.** 1998. 4-Coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiol.* 116(2):743-754.
- Amelot N., Carrouché A., Danoun S., Bourque S. Haïech J., Pugin A, Ranjeva R., Grima-Pettenati J., Mazars C. and Brière C.** 2010. Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. *Plant & Cell Environ.* Submitted.



- An S.H., Choi H.W., Hong J.K. and Hwang B.K.** 2009. Regulation and function of the pepper pectin methylesterase inhibitor (CaPMEI1) gene promoter in defence and ethylene and methyl jasmonate signaling in plants. *Planta* 230(6):1223-1237.
- Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr Jr. L.M., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L. and Vance V.B.** 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290:142-144.
- Andrews D.L., Beames B., Summers M.D. and Park W.D.** 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J.* 252(1):199-206.
- Ané J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., Ayax C., Lévy J., Debelle F., Baek J.M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B.A., Long S.R., Dénarié J. and Cook D.R.** 2004. Medicago truncatula DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303(5662):1364-1367.
- Annis S.L. and Goodwin P.H.** 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:1-14.
- Anterola A.M. and Lewis N.G.** 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61(3):221-294.
- Apel K. and Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Appert C., Logemann E., Hahlbrock K., Schmid J. and Amrhein N.** 1994. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225(1):491-499.
- Asai S., Ohta K. and Yoshioka H.** 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20:1390-1406.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M. and Sheen J.** 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415(6875):977-983.
- Asano T., Tanaka N., Yang G., Hayashi N. and Komatsu S.** 2005. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant Cell Physiol.* 46(2):356-366.
- Ashtamker C., Kiss V., Sagi M., Davydov O. and Fluhr R.** 2007. Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 143(4):1817-1826.
- Auldrige M.E., McCarty D.R. and Klee H.J.** 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(3):315-321.
- Azimzadeh J., Nacry P., Christodoulidou A., Drevensek S., Camilleri C., Amieur N., Parcy F., Pastuglia M. and Bouchez D.** 2008. *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 20(8):2146-2159.

-- B --

- Balague C., Lin B., Alcon C., Flottes G., Malmstrom S., Kohler C., Neuhaus G., Pelletier G., Gaymard F., and Roby D.** 2003. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15: 365-379.



- Baltas M., Lapeyre C., Bedos-Belval F., Maturano M., Saint-Aguet P., Roussel L., Duran H. and Grima-Pettenati J.** 2005. Kinetic and inhibition studies of cinnamoyl-CoA reductase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 43(8):746-753.
- Bar M. and Avni A.** 2009. EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant J.* 59(4):600-611.
- Bates G.W. and Goldsmith M.H.M.** 1983. Rapid response of the plasma-membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids. *Planta* 159:231-237.
- Batistic O. and Kudla J.** 2004. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219(6):915-924.
- Batistic O., Sorek N., Schultke S., Yalovsky S. and Kudla J.** 2008. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1346-1362.
- Batistic O. and Kudla J.** 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:985-992.
- Batistic O., Waadt R., Steinhorst L., Held K. and Kudla J.** 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* 61:211-222.
- Baubet V., Le Mouellic H., Campbell A.K., Lucas-Meunier E., Fossier P. and Brúlet P.** 2000. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca<sup>2+</sup> reporters at the single-cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(13):7260-7265.
- Baucher M., Monties B., Montagu M.V. and Boerjan W.** 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17(2):125-197.
- Baum G., Long J.C., Jenkins G.I. and Trewavas A.J.** 1999. Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96(23):13554-13559.
- Baxter I., Tchieu J., Sussman M.R., Boutry M., Palmgren M.G., Gribskov M., Harper J.F. and Axelsen K.B.** 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 132:618-628.
- Bednarek P. and Osbourn A.** 2009. Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science* 324(5928):746-748.
- Bechinger C., Giebel K.F., Schnell M., Leiderer P., Deising H.B. and Bastmeyer M.** 1999. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285:1896-1899.
- Belngchi B., Romero-Puertas M.C., Vercammen D., Brackener A., Inzé D., Delledonne M. and Van Breusegem F.** 2007. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol. Chem.* 282(2):1352-1358.
- Benjamini Y. and Hochberg Y.** 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57:289-300.
- Benjamins R., Ampudia C.S., Hooykaas P.J. and Offringa R.** 2003. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiol.* 132(3):1623-1630.
- Benschop J.J., Mohammed S., O'Flaherty M., Heck A.J.R., Slijper M. and Menke F.L.H.** 2007. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell. Proteomics* 6:1198-1214.
- Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D., Brown K.L., Schmidt R., Giraudat J., Leung J. and Staskawicz B.J.** 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265(5180):1856-1860.
- Berridge M.J., Lipp P. and Bootman M.D.** 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(1):11-21.
- Berridge M.J., Bootman M.D. and Roderick H.L.** 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(7):517-529.



- Berridge M.J.** 2006. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40:405-412.
- Besseau S.** 2007. Caractérisation fonctionnelle d'HCT, une acyltransférase impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. *Thèse de doctorat* Université Louis Pasteur de Strasbourg.
- Besson-Bard A., Pugin A. and Wendehenne D.** 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:21-39.
- Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y. and King J.** 2009. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J. Exp. Bot.* 60(2):509-521.
- Binet M.N., Humbert C., Lecourieux D., Vantard M. and Pugin A.** 2001. Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol.* 125(2):564-572.
- Blackford S., Rea P.A. and Sanders D.** 1990. Voltage sensitivity of H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* 265(17):9617-9620.
- Blee K., Choi J.W., O'Connell A.P., Jupe S.C., Schuch W., Lewis N.G. and Bolwell G.P.** 2001. Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry* 57:1159-1166.
- Blein J.P., Milat M.L. and Ricci P.** 1991. Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *Plant Physiol.* 95(2):486-491.
- Blount J.W., Korth K.L., Masoud S.A., Rasmussen S., Lamb C. and Dixon R.A.** 2000. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.* 122(1):107-116.
- Blume B., Nürnberger T., Nass N. and Scheel D.** 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12(8):1425-1440.
- Boccardo M., Mills C.E., Zeier J., Anzi C., Lamb C., Poole R.K. and Delledonne M.** 2005. Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemii* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant J.* 43:226-237.
- Boerjan W., Ralph J. and Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:519-546.
- Boissy G., de La Fortelle E., Kahn R., Huet J.C., Bricogne G., Pernollet J.C. and Brunie S.** 1996. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* 4(12):1429-1439.
- Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J.C. and Brunie S.** 1999. A structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Sci.* 8(6):1191-1199.
- Boller T.** 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:189-214.
- Boller T. and Felix G.** 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
- Boller T. and He S.Y.** 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324(5928):742-744.





- Bolwell G.P., Robbins M.P. and Dixon R.A.** 1985. Elicitor-induced prolyl hydroxylase from French bean (*Phaseolus vulgaris*). Localization, purification and properties. *Biochem. J.* 229(3):693-699.
- Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C. and Minibayeva F.** 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a threecomponent system. *J. Exp. Bot.* 53:1367-1376.
- Bonnet P., Poupet A., Abad P., Venard P. and Cardin L.** 1986. Induction de nécroses foliaires, de protéines b et de résistance dans les interactions tabac-*Phytophthora*. *Agronomie* 6:829-837.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P. and Ricci P.** 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* 102:181-192.
- Bonza M.C., Morandini P., Luoni L., Geisler M., Palmgren M.G. and De Michelis M.I.** 2000. At-ACA8 encodes a plasma membrane-localized calcium- ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus. *Plant Physiol.* 123:1495-1505.
- Bothwell J.H.F. and Ng C.K.Y.** 2005. The evolution of Ca<sup>2+</sup> signaling in photosynthetic eukaryotes. *New Phytologist* 166:21-38.
- Bouché N., Scharlat A., Snedden W., Bouchez D. and Fromm H.** 2002. A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol. Chem.* 277(24):21851-21861.
- Bouché N., Yellin A., Snedden W.A. and Fromm H.** 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:435-466.
- Bourque S., Ponchet M., Binet M.N., Ricci P., Pugin A. and Lebrun-Garcia A.** 1998. Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol.* 118(4):1317-1326.
- Bourque S., Binet M.N., Ponchet M., Pugin A. and Lebrun-Garcia A.** 1999. Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem.* 274(49):34699-34705.
- Bourque S., Lemoine R., Sequeira-Legrand A., Fayolle L., Delrot S. and Pugin A.** 2002. The elicitor cryptogin blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiol.* 130(4):2177-2187.
- Boursiac Y. and Harper J.F.** 2007. The origin and function of calmodulin regulated Ca<sup>2+</sup> pumps in plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39:409-414.
- Brenner E.D., Martinez-Barboza N., Clark A.P., Liang Q.S., Stevenson D.W., and Coruzzi G.M.** 2000. *Arabidopsis* mutants resistant to S<sup>+</sup>-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol.* 124:1615-1624.
- Brock A., Brandt W. and Dräger B.** 2008. The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant J.* 54(3):388-401
- Brown S.A.** 1962. Biosynthesis of coumarin and herniarin in lavender. *Science* 137:977-978.
- Brownlee C. and Wood J.W.** 1986. A gradient of cytosolic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature* 320:624-626.
- Browse J.** 2009. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry* 70(13-14):1539-1546.
- Brunner F., Rosahl S., Lee J., Rudd J.J., Geiler C., Kauppinen S., Rasmussen G., Scheel D. and Nürnberger T.** 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* 21(24):6681-6688.
- Brutus A., Sicilia F., Macone A., Cervone F. and De Lorenzo G.** 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(20):9452-9457.



- Buer C.S., Imin N. and Djordjevic M.A.** 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* 52(1):98-111.
- Bugos R.C., Chiang V.L. and Campbell W.H.** 1991. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.* 17(6):1203-1215.
- Bunney T.D., Shaw P.J., Watkins P.A.C., Taylor J.P., Beven A.F., Wells B., Calder G.M. and Drobak B.L.** 2000. ATP-dependent regulation of nuclear  $Ca^{2+}$  levels in plant cells. *FEBS Letters* 476:145-149.
- Bush D.S. and Jones R.L.** 1988. Cytoplasmic calcium and  $\alpha$ -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.* 46:466-469.
- Bush D.S.** 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 46:95-122.

## -- C --

- Calcraft P.J., Ruas M., Pan Z., Cheng X., Arredouani A., Hao X., Tang J., Rietdorf K., Teboul L., Chuang K-T, Lin P., Xia R., Wang C., Zhu Y., Lin Y., Wyatt C.N., Parrington J., Ma J., Evans A.M., Galione A. and Zhu M.X.** 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature.* 459:496-601.
- Camoni L., Harper J.F. and Palmgren M.G.** 1998. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Lett.* 430:381-384.
- Capellades M., Torres M.A., Bastisch I., Stiefel V., Vignols F., Bruce W.B., Peterson D., Puigdomènech P. and Rigau J.** 1996. The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 31(2):307-322.
- Carpinella M.C., Ferrayoli C.G. and Palacios S.M.** 2005. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 53:2922-2927.
- Carver T.L.W., Zeyen R.J., Robbins M.P. and Dearne G.A.** 1992. Effects of the PAL inhibitor, AOPP, on oat, barley and wheat cell responses to appropriate and inappropriate formae specialis of *Erysiphe graminis* DC. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:392-409.
- Cessna S.G. and Low P.S.** 2001. Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of  $Ca^{2+}$  from internal stores. *Planta* 214:126-134.
- Chapple C.C., Vogt T., Ellis B.E. and Somerville C.R.** 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4(11):1413-1424.
- Chaudhuri K., Das S., Bandyopadhyay M., Zalar A., Kollmann A., Jha S. and Tepfer D.** 2009. Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res.* 18(1):121-134.
- Chen C., Meyermans H., Burggraefe B., De Rycke R.M., Inoue K., De Vleeschauwer V., Steenackers M., Van Montagu M.C., Engler G.J. and Boerjan W.A.** 2000. Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar. *Plant Physiol.* 123(3):853-867.
- Chen C., Gao M., Liu J. and Zhu H.** 2007. Fungal Symbiosis in Rice Requires an Ortholog of a Legume Common Symbiosis Gene Encoding a  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiol.* 145(4):1619-1628.
- Chen F., Yasuda S. and Fukushima K.** 1999. Evidence for a novel biosynthesis pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. *Planta* 207:597-603.



- Chen F., Kota P., Blount J.W. and Dixon R.A.** 2001. Chemical syntheses of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. *Phytochemistry* 58(7):1035-1042.
- Chen T., Wu X., Chen Y., Li X., Huang M., Zheng M., Baluska F., Samaj J. and Lin J.** 2009. Combined proteomic and cytological analysis of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth. *Plant Physiol.* 149(2):1111-1126.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T. and Hirschi K.D.** 2002. Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/cation antiporter. *Plant Physiol.* 128:1245-1254.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Barkla B.J., Shigaki T. and Hirschi K.D.** 2003. The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell* 15:347-364.
- Cheng N.H. and Hirschi K.D.** 2003. Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *J. Biol. Chem.* 278:6503-6509.
- Cheng N.H., Liu J.Z., Nelson R.S. and Hirschi K.D.** 2004. Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter, CAX1. *FEBS Lett.* 559:99-106.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T., Lachmansingh J., LeClere S., Lahner B., Salt D.E. and Hirschi K.D.** 2005. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol.* 138:2048-2060.
- Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C. and Sheen J.** 2002. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent kinase gene family. *Plant Physiol.* 129:469-485.
- Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T. and Luan S.** 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129(2):661-677.
- Cheong Y.H., Kim K.N., Pandey G.K., Gupta R., Grant J.J. and Luan S.** 2003. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1833-1845.
- Cheong Y.H., Pandey G.K., Grant J.J., Batistic O., Li L., Kim B.G., Lee S.C., Kudla J. and Luan S.** 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52:223-239.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T. and Felix G.** 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell.* 18(2):465-476.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D., Felix G. and Boller T.** 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448(7152):497-500.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B.J.** 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4):803-814.
- Choi H.W., Kim Y.J., Lee S.C., Hong J.K. and Hwang B.K.** 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defence response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* 145(3):890-904.
- Choi M.S., Kim M.C., Yoo J.H., Moon B.C., Koo S.C., Park B.O., Lee J.H., Koo Y.D., Han H.J., Lee S.Y., Chung W.S., Lim C.O. and Cho M.J.** 2005. Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.). *J Biol. Chem.* 280(49):40820-40831.
- Chong J., Baltz R., Schmitt C., Beffa R., Fritig B. and Saindrenan P.** 2002. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid



- glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* 14(5):1093-1107.
- Clayton H., Knight M.R., Knight H., McAinsh M.R. and Hetherington A.M.** 1999. Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant J* 17(5):575-579.
- Coelho S.M., Taylor A.R., Ryan K.P., Sousa-Pinto I., Brown M.T. and Brownlee C.** 2002. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca<sup>2+</sup> wave propagation in fucus rhizoid cells. *Plant Cell* 14: 2369-2381.
- Collendavelloo J., Legrand M. and Fritig B.** 1983. Plant Disease and the Regulation of Enzymes Involved in Lignification: Increased Rate of De Novo Synthesis of the Three Tobacco O-Methyltransferases during the Hypersensitive Response to Infection by Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiol.* 73(3):550-554.
- Corbett E. F. and Michalak M.** 2000 Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* 25:307-311.
- Cosgrove D.J. and Hedrich R.** 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186:143-153.
- Costa M.A., Collins R.E., Anterola A.M., Cochrane F.C., Davin L.B. and Lewis N.G.** 2003. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry* 64(6):1097-1112.
- Cote F. and Hahn M.G.** 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26:1379-1411.
- Czernic P. Huang H.C. and Marco Y.** 1996. Characterization of *hsr201* and *hsr515*, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria. *Plant Mol. Biol.* 31(2):255-265.

-- D --

- D'Angelo C., Weigl S., Batistic O., Pandey G.K., Cheong Y.H., Schültke S., Albrecht V., Ehlert B., Schulz B., Harter K., Luan S., Bock R. and Kudla J.** 2006. Alternative complex formation of the Ca<sup>2+</sup>-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 48(6):857-872.
- D'Ovidio R., Mattei B., Roberti S. and Bellincampi D.** 2004. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1696:237-344.
- Dagher R., Briere C., Fève M., Zeniou M., Pigault C., Mazars C., Chneiweiss H., Ranjeva R., Kilhoffer M.C. and Haiech J.** 2008. Calcium fingerprints induced by Calmodulin interactors in eukaryotic cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1793:1068-1077.
- Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A. and Bourque S.** 2009. Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* 418(1):191-200.
- Dalkin K., Edwards R., Edington B. and Dixon R.A.** 1990. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): I. Induction of Phenylpropanoid Biosynthesis and Hydrolytic Enzymes in Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 92(2):440-446.
- Damiani I., Morreel K., Danoun S., Goeminne G., Yahiaoui N., Marque C., Kopka J., Messens E., Goffner D., Boerjan W., Boudet A.M. and Rochange S.** 2005. Metabolite profiling reveals a role for atypical cinnamyl alcohol dehydrogenase CAD1 in the synthesis of coniferyl alcohol in tobacco xylem. *Plant Mol. Biol.* 59(5):753-769.
- Dammann C., Ichida A., Hong B., Romanowsky S.M., Hrabak E.M., Harmon A.C., Pickard B.G. and Harper J.F.** 2003. Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132:1840-1848.





- Dangl J.L., Dietrich R.A. and Richberg M.H.** 1996. Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*. 8(10):1793-1807.
- Dangl J.L. and Jones J.D.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Darvill A.G. and Albersheim P.** 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35:243-275.
- Darvill A., Augur C., Bergmann C., Carlson R.W., Cheong J.J., Eberhard S., Hahn M.G., Ló V.M., Marfà V., Meyer B. et al.** 1992. Oligosaccharins--oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology* 2(3):181-198.
- Day A., Neutelings G., Nolin F., Grec S., Habrant A., Crônier D., Maher B., Rolando C., David H., Chabbert B. and Hawkins S.** 2009. Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem. *Plant Physiol. Biochem.* 47(1):9-19.
- De Wit P.J., Mehrabi R., Van den Burg H.A. and Stergiopoulos I.** 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol. Plant Pathol.* 10(6):735-747.
- DeFalco T.A., Bender K.W. and Snedden W.A.** 2009. Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling. *Biochem. J.* 425(1):27-40.
- Delk N.A., Johnson K.A., Chowdhury N.I. and Braam J.** 2005. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca<sup>2+</sup> sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol.* 139(1):240-253.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. and Lamb C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394(6693):585-588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A. and Lamb C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(23):13454-13459.
- Demidchik V., Bowen H.C., Maathuis F.J.M., Shabala S.N., Tester M.A., White P.J., Davies J.M.** 2002. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *Plant Journal* 32:799-808.
- Demidchik V., and Maathuis F.J.** 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signaling and development. *New Phytol.* 175:387-404.
- Denoux C., Galletti R., Mammarella N., Gopalan S., Werck D., De Lorenzo G., Ferrari S., Ausubel F.M. and Dewdney J.** Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol Plant.* 1(3):423-445.
- Di Gaspero G. and Cipriani G.** 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Mol. Genet. Genomics.* 269(5):612-623.
- Dicke M. Van Loon J.J.A. and Soler R.** 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chem. Biol.* 5(5):317-324.
- Dixon R.A., Harrison M.J. and Lamb C.J.** 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:479-501.
- Dixon R.A. and Paiva N.L.** 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7(7):1085-1097.
- Dixon R.A.** 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-847.
- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S.S. and Wang L.** 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3(5):371-390.
- Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J. and Thomashow M.F.** 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in coldregulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell* 21:972-984.



- Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C. and Healy J.I.** 1997. Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature* 386(6627):855-858.
- Dowd C., Wilson I.W. and McFadden H.** 2004. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(6):654-667.
- Downie L., Priddle J., Hawes C. and Evans D.E.** 1998. A calcium pump at the higher plant nuclear envelope? *FEBS Letters* 429:44-48.
- Dräger B.** 2006. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67(4):327-337.
- Du L. and Poovaiah B.W.** 2005.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* 437(7059):741-745.
- Du L., Ali G.S., Simons K.A., Hou J., Yang T., Reddy A.S. and Poovaiah B.W.** 2009.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457:1154-1158.
- Dudareva N., Pichersky E. and Gershenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135(4):1893-1902.
- Dunkley T.P., Hester S., Shadforth I.P., Runions J., Weimar T., Hanton S.L., Griffin J.L., Bessant C., Brandizzi F., Hawes C., Watson R.B., Dupree P; and Lilley K.S.** 2006. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(17):6518-6523.
- Durner J., Wendehenne D. and Klessig D.F.** 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(17):10328-10333.
- Durner J. and Klessig D.F.** 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2(5):369-374.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.** 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12(6):963-977.
- Dutta R. and Robinson K.R.** 2004. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts. *Plant Physiol.* 135: 1398-1406.

-- E --

- Eckardt N.A.** 2009. CAMTA proteins: a direct link between calcium signals and cold acclimation? *Plant Cell.* 21(3):697.
- Edreva A.M., Velikova V.B. and Tsonev T.D.** 2007. Phenylamides in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 54:287-301.
- Edwards K., Cramer C. L., Bolwell G. P., Dixon R. A., Schuch W., and Lamb C. J.** 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6731-6735.
- Ehltling J., Büttner D., Wang Q., Douglas C.J., Somssich I.E. and Kombrink E.** 1999. Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* 19(1):9-20.
- Ehltling J., Provart N.J. and Werck-Reichhart D.** 2006. Functional annotation of the *Arabidopsis* P450 superfamily based on large-scale co-expression analysis. *Biochem. Soc. Trans.* 34(6):1192-1198.
- Ehrhardt D.W., Wais R. and Long S.R.** 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* 85(5):673-681.



- Ellard-Ivey M. and Douglas C.J.** 1996. Role of Jasmonates in the Elicitor- and Wound-Inducible Expression of Defense Genes in Parsley and Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* 112(1):183-192.
- Elmayan T., Fromentin J., Riondet C., Alcaraz G., Blein J.P. and Simon-Plas F.** 2007. Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ.* 30(6):722-732.
- Epple P., Apel K. and Bohlmann H.** 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109(3):813-820.
- Escamilla-Treviño L.L., Shen H., Uppalapati S.R., Ray T., Tang Y., Hernandez T., Yin Y., Xu Y. and Dixon R.A.** 2010. Switchgrass (*Panicum virgatum*) possesses a divergent family of cinnamoyl CoA reductases with distinct biochemical properties. *New Phytol.* 185(1):143-155.
- Ettinger W.F., Clear A.M., Fanning K.J. and Peck M.L.** 1999. Identification of a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Antiport in the Plant Chloroplast Thylakoid Membrane. *Plant Physiol.* 119:1379-1385.
- Eulgem T. and Somssich I.E.** 2007. Networks of WRKY transcription factors in defence signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(4):366-371.
- Evans N.H., McAinsh M.R. and Hetherington A.M.** 2001. Calcium oscillations in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:415-420.

## -- F --

- Facchini P.J., Hagel J. and Zulak K.G.** 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* 80:577-589.
- Fahrendorf T. and Dixon R.A.** 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XVIII: Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 305(2):509-515.
- Farmer M.J., Czernic P., Michael A. and Negrel J.** 1999. Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. *Eur. J. Biochem.* 263(3):686-694.
- Fauth M., Schweizer P., Buchala A., Markstadter C., Riederer M., Kato T. and Kauss H.** 1998. Cutin monomers and surface wax constituents elicit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other  $\text{H}_2\text{O}_2$  elicitors. *Plant Physiol.* 117:1373-1380.
- Felix G., Duran J.D., Volko S. and Boller T.** 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18(3):265-276.
- Fellbrich G., Blume B., Brunner F., Hirt H., Kroj T., Ligterink W., Romanski A. and Nurnberger T.** 2000. *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol.* 41:692-701.
- Feller H.H. and Hepler P.K.** 1997. The Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration Gradient of Sinapis alba Root Hairs as Revealed by  $\text{Ca}^{2+}$ -Selective Microelectrode Tests and Fura-Dextran Ratio Imaging. *Plant Physiol.* 114(1):39-45.
- Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M. and Dewdney J.** 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.* 144:367-379.
- Ferrer J.L., Zubieta C., Dixon R.A. and Noel J.P.** 2005. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Plant Physiol.* 137(3):1009-1017.



- Feucht W. and Treutter D.** 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. *In: Inderjit S, Dakshini KMM, Foy CL (eds) Principles and practices in plant ecology. CRC Press, Boca Raton* 307-338.
- Feuillet C., Boudet A.M. and Grima-Pettenati J.** 1993. Nucleotide sequence of a cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus*. *Plant Physiol.* 103(4):1447.
- Feuillet C., Lauvergeat V., Deswarte C., Pilate G., Boudet A. and Grima-Pettenati J.** 1995. Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol Biol.* 27(4):651-667.
- Finkler A., Kaplan B. and Fromm H.** 2007a. Ca-Responsive cis-Elements in Plants. *Plant Signal. Behav.* 2(1):17-19.
- Finkler A., Ashery-Padan R. and Fromm H.** 2007b. CAMTAs: calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS Lett.* 581(21):3893-3898.
- Fleurence J. and Negrel J.** 1987. Partial purification of tyramine feruloyl transferase from TMV inoculated tobacco leaves. *Phytochemistry* 28(3):733-736.
- Flor H.H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C. and Durner J.** 2000. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* 23(6):817-824.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M. and Dolan L.** 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.
- Franke R., Fry S.C. and Kauss H.** 1998. Low-molecular-weight precursors for defense-related cell wall hydroxycinnamoyl esters in elicited parsley suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 17:379-383.
- Franke R., Humphreys J.M., Hemm M.R., Denault J.W., Ruegger M.O., Cusumano J.C. and Chapple C.** 2002a. The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* 30(1):33-45.
- Franke R., Hemm M.R., Denault J.W., Ruegger M.O., Humphreys J.M. and Chapple C.** 2002b. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 30(1):47-59.
- Franklin-Tong V.E., Drobak B.K., Allan A.C., Watkins P. and Trewavas A.J.** 1996. Growth of Pollen Tubes of *Papaver rhoeas* Is Regulated by a Slow-Moving Calcium Wave Propagated by Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Plant Cell.* 8(8):1305-1321.
- Fritz-Laylin L.K., Krishnamurthy N., Tör M., Sjölander K.V. and Jones J.D.** 2005. Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138(2):611-623.
- Frohnmeier H., Loyall L., Blatt M.R. and Grabov A.** 1999. Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J.* 20:109-117.
- Fu Z.Q., Guo M., Jeong B.R., Tian F., Elthon T.E., Cerny R.L., Staiger D. and Alfano J.R.** 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* 447(7142):284-288.
- Fukasawa-Akada T., Kung S. D. and Watson J. C.** 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol.* 30:711-722.

## -- G --

- Gachon C., Baltz R. and Saindrenan P.** 2004. Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during the





- hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol. Biol.* 54(1):137-146.
- Galis I., Simek P., Narisawa T., Sasaki M., Horiguchi Y., Fukuda H. and Matsuoka K.** 2006. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant J.* 46(4):573-592.
- Galon Y., Nave R., Boyce J.M., Nachmias D., Knight M.R. and Fromm H.** 2008. Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 582:943-948.
- Garcia-Brügger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D. and Pugin A.** 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19:711-724.
- García-Muniz N., Martínez-Izquierdo J.A. and Puigdomènech P.** 1998. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol. Biol.* 38(4):623-632.
- Gardner H.W.** 1991. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1084(3):221-239.
- Gauthier A., Lamotte O., Reboutier D., Bouteau F., Pugin A. and Wendehenne D.** 2007. Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal. Behav.* 2(2):86-95.
- Gautier L., Cope L., Bolstad B.M. and Irizarry R.A.** 2004. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20(3):307-315.
- Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Marten I., Ache P., Matschi S., Liese A., Wellmann C., Al-Rasheid K.A., Grill E., Romeis T. and Hedrich R.** 2010. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107(17):8023-8028.
- Geisler M., Frangne N., Gomes E., Martinoia E. and Palmgren M.G.** 2000. The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol.* 124:1814-1827.
- Gentleman R., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., et al.** 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5(R80).
- George L., Romanowsky S.M., Harper J.F. and Sharrock R.A.** 2008. The ACA10 Ca<sup>2+</sup>-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146:716-728.
- Gfeller A., Liechti R. and Farmer E.E.** 2010. *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal* 16;3(109):cm4.
- Giacomello M., Drago I., Pizzo P. and Pozzan T.** 2007. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 14:1267-1274.
- Gifford J.L., Walsh M.P. and Vogel H.J.** 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J.* 405(2):199-221.
- Gilkey J.C., Jaffe L.F., Ridgway E.B. and Reynolds G.T.** 1978. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Cell Biol.* 76:448-466.
- Gilkey J.C.** 1983. Roles of calcium and pH in activation of eggs of the medaka fish, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol.* 97(3):669-678.
- Gilroy S. and Jones R.L.** 1992. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89(8):3591-3595.



- Gimenez-Ibanez S., Hann D.R., Ntoukakis V., Petutschnig E., Lipka V. and Rathjen J.P.** 2009. AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr. Biol.* 19(5):423-429.
- Glazebrook J., Rogers E.E. and Ausubel F.M.** 1997. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annu. Rev. Genet.* 31:547-569.
- Glazebrook J.** 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Gleason C., Chaudhuri S., Yang T., Munoz A., Poovaiah B.W. and Oldroyd G.E.D.** 2006. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441:1149-1152.
- Goffner D., Joffroy I., Grima-Pettenati J., Halpin C., Knight M.E., Schuch W. and Boudet A.M.** 1992. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta* 188:48-53.
- Goffner D., Campbell M.M., Campargue C., Clastre M., Borderies G., Boudet A. and Boudet A.M.** 1994. Purification and Characterization of Cinnamoyl-Coenzyme A:NADP Oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiol.* 106(2):625-632.
- Goffner D., Van Doorselaere J., Yahiaoui N., Samaj J., Grima-Pettenati J. and Boudet AM.** 1998. A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 36(5):755-765.
- Göhre V., Spallek T., Häweker H., Mersmann S., Mentzel T., Boller T., de Torres M., Mansfield J.W. and Robatzek S.** 2008. Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18(23):1824-1832.
- Golovkin M. and Reddy A.S.** 2003. A calmodulin-binding protein from *Arabidopsis* has an essential role in pollen germination. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100(18):10558-10563.
- Gómez-Gómez L., Felix G. and Boller T.** 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18(3):277-284.
- Gong D., Guo Y., Jagendorf A.T. and Zhu J.K.** 2002. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol.* 130:256-264.
- Gong M., van Der Luit A.H., Knight M.R. and Trewavas A.J.** 1998. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> level in tobacco seedlings in relation with thermotolerance. *Plant Physiol.* 16:429-437.
- Gong P., Han J., Reddig K. and Li H.S.** 2007. A potential dimerization region of dCAMTA is critical for termination of fly visual response. *J Biol. Chem.* 282(29):21253-21258.
- Gowri G., Bugos R.C., Campbell W.H., Maxwell C.A. and Dixon R.A.** 1991. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): X. Molecular Cloning and Expression of S-Adenosyl-l-Methionine:Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase, a Key Enzyme of Lignin Biosynthesis. *Plant Physiol.* 97(1):7-14.
- Grabov A. and Blatt M.R.** 1998. Membrane voltage initiates Ca<sup>2+</sup> waves and potentiates Ca<sup>2+</sup> increases with abscisic acid in stomatal guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95(8):4778-4783.
- Grand C.** 1984. Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett.* 169:7-11.
- Grant M., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Innes R.W. and Dangl J.L.** 1995. Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269(5225):843-846.
- Grant M., Brown I., Adams S., Knight M., Ainslie A. and Mansfield J.** 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23:441-450.
- Grant M. and Lamb C.** 2006. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(4):414-420.



- Grant S.R., Fisher E.J., Chang J.H., Mole B.M. and Dangl J.L.** 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-449.
- Greenberg J.T.** 1997. PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:525-545.
- Greenberg J.T. and Yao N.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6(3):201-211.
- Grima-Pettenati J., Feuillet C., Goffner D., Borderies G. and Boudet A.M.** 1993. Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* 21(6):1085-1095.
- Grimmig B. and Matern U.** 1997. Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element. *Plant Mol. Biol.* 33(2):323-341.
- Grygorczyk C. and Grygorczyk R.** 1998. A Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent cation channel in the nuclear envelope of red beet. *Biochim. Biophys. Acta* 1375:117-130.
- Guo Y., Halfter U., Ishitani M. and Zhu J.K.** 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13:1383-1400.
- Gust A.A., Biswas R., Lenz H.D., Rauhut T., Ranf S., Kemmerling B., Götz F., Glawischnig E., Lee J., Felix G. and Nürnberger T.** 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol. Chem.* 282(44):32338-32348.

-- H --

- Hahlbrock K. and Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.
- Hahlbrock K., Scheel D., Logemann E., Nürnberger T., Parniske M., Reinold S., Sacks W.R. and Schmelzer E.** 1995. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4150-4157.
- Hain R., Reif H.J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stöcker R.H. et al.** 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361(6408):153-156.
- Haley A., Russel A.J., Wood N., Allan A.C., Knight M., Campbell A.K. and Trewavas A.J.** 1995. Effect of mechanical signalling on plant cell cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4124-4128.
- Halpin C., Knight M.E., Grima-Pettenati J., Goffner D., Boudet A. and Schuch W.** 1992. Purification and Characterization of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Tobacco Stems. *Plant Physiol.* 98(1):12-16.
- Hamerski D. and Matern U.** 1988. Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)-marmesin and psoralen. *Eur. J. Biochem.* 171:369-375.
- Hamilton D.W., Hills A., Kohler B., and Blatt M.R.** 2000. Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4967-4972.
- Han S., Tang R., Anderson L.K., Woerner T.E. and Pei Z.M.** 2003. A cell surface receptor mediates extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in guard cells. *Nature* 425(6954):196-200.
- Hano C., Addi M., Bensaddek L., Crônier D., Baltora-Rosset S., Doussot J., Maury S., Mesnard F., Chabbert B., Hawkins S., Lainé E. and Lamblin F.** 2006. Differential



- accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* 223(5):975-989.
- Harada A., and Shimazaki K.** 2009. Measurement of changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in *Arabidopsis* guard cells and mesophyll cells in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* 50: 360-373.
- Harborne J.B.** 1994. Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms. In: *Brouillard R, Jay M, Scalbert A (eds) Polyphenols* 94:19-26.
- Hardingham G.E., Chawla S., Johnson C.M. and Bading H.** 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385(6613):260-265.
- Harmon A.C., Gribskov M., Gubrium E. and Harper J.F.** 2001. The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol.* 151:175-183.
- Harmon A.C.** 2003. Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravit Space Biol Bull.* 16(2):83-90.
- Harper J.F., Binder B.M. and Sussman M.R.** 1993. Calcium and lipid regulation of an *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32:3282-3290.
- Harper J.F., Breton G. and Harmon A.C.** 2004. Decoding  $\text{Ca}^{2+}$  signals through plant protein kinases. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55:263-288.
- Harper J.F. and Harmon A.C.** 2005. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signaling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:555-566.
- Hartmann T.** 2007. From waste products to ecochemicals: 50 years research on plant secondary metabolism. *Phytochemistry.* 68:2831-2846.
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I.** 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305(5685):855-858.
- Havelange A., Lejeune P., Bernier G., Kaur-Sawhney R. and Galston A.W.** 1996. Putrescine export in leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol. Plant* 96:59-65.
- He P., Shan L., Lin N.C., Martin G.B., Kemmerling B., Nürnberger T. and Sheen J.** 2006. Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125(3):563-575.
- Heath MC.** 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(4):315-319.
- Heller W. and Kühnl T.** 1985. Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl)shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 241(2):453-460.
- Hematy K., Cherk C and Sommerville S.** 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406-413.
- Hepler P.K., Vidali L. and Cheung A.Y.** 2001. Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:159-87.
- Herrmann K.** 1995. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107:7-12.
- Hetherington A.M. and Brownlee C.** 2004. The generation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:401-427.
- Hirschi K.D.** 1999. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: Altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *Plant Cell* 11:2113-2122.
- Hirschi K.D., Korenkov V.D., Wilganowski N.L. and Wagner G.J.** 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124:125-133.





- Hoerberichts F.A., ten Have A. and Woltering E.J.** 2003. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217(3):517-522.
- Hoffmann L., Maury S., Martz F., Geoffroy P. and Legrand M.** 2003. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* 278(1):95-103.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. and Legrand M.** 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16(6):1446-1465.
- Hotze M., Schroder G. and Schroder J.** 1995. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 374:345-350.
- Hrabak E.M., Chan C.W.M., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.K. and Harmon A.C.** 2003. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 132:666-680.
- Hu P., Meng Y. and Wise R.P.** 2009. Functional Contribution of Chorismate Synthase, Anthranilate Synthase, and Chorismate Mutase to Penetration Resistance in Barley–Powdery Mildew Interactions. *Mol. Plant Microbe Int.* 22(3):311-320.
- Hu W.J., Kawaoka A., Tsai C.J., Lung J., Osakabe K., Ebinuma H. and Chiang V.L.** 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(9):5407-5412.
- Hua B.G., Mercier R.W., Leng Q. and Berkowitz G.A.** 2003. Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel. *Plant Physiol.* 132:1353-1361.
- Huang L., Berkelman T., Franklin A.E. and Hoffman N.E.** 1993. Characterization of a gene encoding a Ca<sup>2+</sup>-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10066-10070.
- Hückelhoven R.** 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-127.
- Huffaker A., Pearce G. and Ryan C.A.** 2006. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:10098-10103.
- Huffaker A. and Ryan C.A.** 2007. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:10732-10736.
- Hui D., Iqbal J., Lehmann K., Gase K., Saluz H.P. and Baldwin I.T.** 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (lepidoptera, sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol.* 131(4):1877-1893.
- Humphreys J.M., Hemm M.R. and Chapple C.** 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(18):10045-10050.
- Hwang I., Sze H. and Harper J.F.** 2000. A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6224-6229.



## -- I --

- Iiyama K., Lam T. and Stone B.A.** 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29(3):733-737.
- Iiyama K., Lam T. and Stone B.A.** 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol.* 104(2):315-320.
- Ikegawa T., Mayama S., Nakayashiki H. and Kato H.** 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. avenae and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:245-255.
- Ikura M., Osawa M. and Ames J.B.** 2002. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: Structure to function. *Bioessays* 24:625-636.
- Ikura M. and Ames J.B.** 2006. Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(5):1159-1164.
- Inoue K., Sewalt V.J., Murray G.B., Ni W., Stürzer C. and Dixon R.A.** 1998. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol.* 117(3):761-770.
- Ishida H. and Vogel H.J.** 2006. Protein-peptide interaction studies demonstrate the versatility of calmodulin target protein binding. *Protein Pept. Lett.* 13(5):455-465.
- Ishida S., Yuasa T., Nakata M. and Takahashi Y.** 2008. A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins. *Plant Cell* 20:3273-3288.
- Ishii T.** 1997. O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol.* 113(4):1265-1272.
- Israelsson M., Siegel R.S., Young J., Hashimoto M., Iba K. and Schroeder J.I.** 2006. Guard cell ABA and CO<sub>2</sub> signaling network updates and Ca<sup>2+</sup> sensor priming hypothesis. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 9:654-663.
- Ito T., Nakata M., Fukazawa J., Ishida S. and Takahashi Y.** 2010. Alteration of Substrate Specificity: The Variable N-Terminal Domain of Tobacco Ca<sup>2+</sup>-Dependent Protein Kinase Is Important for Substrate Recognition. *Plant Cell.* in press.

## -- J --

- Jaffe L.F.** 1995. Calcium waves and development. *Ciba Found Symp.* 188:4-12.
- Jaffe L.F.** 2007. Stretch-activated calcium channels relay fast calcium waves propagated by calcium-induced calcium influx. *Biol. Cell.* 99(3):175-184.
- Jakobek J.L., Smith J.A. and Lindgren P.B.** 1993. Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 5:57-63.
- Janjusevic R., Abramovitch R.B., Martin G.B. and Stebbins C.E.** 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311(5758):222-226.
- Jelenska J., Yao N., Vinatzer B.A., Wright C.M., Brodsky J.L. and Greenberg J.T.** 2007. A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr. Biol.* 17(6):499-508.
- Jensen M.K., Hagedorn P.H., de Torres-Zabala M., Grant M.R., Rung J.H., Collinge D.B. and Lyngkjaer M.F.** 2008. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. hordei in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(6):867-880.



- John M., Röhring H., Schmidt J., Walden R. and Schell J.** 1997. Cell signalling by oligosaccharides. *Trends in Plant Science* 2:111-115.
- Johnson C.H., Knight M.R., Kondo T., Masson P., Sedbrook J., Haley A. and Trewavas A.** 1995. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269(5232):1863-1865.
- Johnson C.H., Shingles R. and Ettinger W.F.** 2006. Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast. In: *Wise RR, Hooper JK, eds. The structure and function of plastids. Heidelberg, Germany: Springer*, 403-416.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J. and Jones J.D.** 1994. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266(5186):789-793.
- Jones J.D. and Dangl J.L.** 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329.
- Jones L., Ennos A.R. and Turner S.R.** 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 26(2):205-216.

-- K --

- Kadota Y., Furuichi T., Ogasawara Y., Goh T., Higashi K., Muto S. and Kuchitsu K.** 2004. Identification of putative voltage dependent Ca<sup>2+</sup>-permeable channels involved in cryptogin-induced Ca<sup>2+</sup> transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317:823-830.
- Kai K., Shimizu B., Mizutani M., Watanabe K. and Sakata K.** 2006. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 67(4):379-386.
- Kai K., Mizutani M., Kawamura N., Yamamoto R., Tamai M., Yamaguchi H., Sakata K. and Shimizu B.** 2008. Scopoletin is biosynthesized *via* ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55(6):989-999.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiya C., Dohmae N., Takio K., Minami E. and Shibuya N.** 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(29):11086-11091.
- Kaminaga Y., Schnepf J., Peel G., Kish C.M., Ben-Nissan G., Weiss D., Orlova I., Lavie O., Rhodes D., Wood K., Porterfield D.M., Cooper A.J., Schloss J.V., Pichersky E., Vainstein A. and Dudareva N.** 2006. Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *J. Biol. Chem.* 281(33):23357-23366.
- Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Müller O., Perlin M.H., Wösten H.A., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña C.G., Sneltselaar K., McCann M., Pérez-Martín J., Feldbrügge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., González-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Münch K., Rössel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Häuser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schlüter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnirke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Güldener U., Münsterkötter M., Haase D., Oesterheld M., Mewes H.W., Mauceli E.W., DeCaprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J., Birren B.W.** 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444:97-101.



- Kanamori N., Madsen L.H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E.M., Miwa H., Downie J.A., James E.K., Felle H.H., Haaning L.L., Jensen T.H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N. and Stougaard J.** 2006. A nucleoporin is required for induction of  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(2):359-364.
- Kang J., Mehta S., and Turano F.J.** 2004. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol*. 45:1380-1389.
- Kang S., Kim H.B., Lee H., Choi J.Y., Heu S., Oh C.J., Kwon S.I. and An C.S.** 2006. Overexpression in *Arabidopsis* of a plasma membrane-targeting glutamate receptor from small radish increases glutamate-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx and delays fungal infection. *Mol Cells* 21(3):418-427.
- Kao Y.Y., Harding S.A. and Tsai C.J.** 2002. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol*. 130(2):796-807.
- Kaplan B., Davydov O., Knight H., Galon Y., Knight M.R., Fluhr R. and Fromm H.** 2006. Rapid transcriptome changes induced by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients reveal ABRE-related sequences as  $\text{Ca}^{2+}$ -responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2733-2748.
- Kaur H., Heinzl N., Schöttner M., Baldwin I.T. and Gális I.** 2010. R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol*. 152(3):1731-1747.
- Kauss H., Franke R., Krause K., Conrath U., Jeblick W., Grimmig B. and Matern U.** 1993. Conditioning of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) Suspension Cells Increases Elicitor-Induced Incorporation of Cell Wall Phenolics. *Plant Physiol*. 102(2):459-466.
- Kauss H., Fauth M., Merten A. and Jeblick W.** 1999. Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers *via* both an inducible and a constitutive  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generating system. *Plant Physiol*. 120:1175-1182.
- Kawalleck P., Keller H., Hahlbrock K., Scheel D. and Somssich I.E.** 1993. A pathogen-responsive gene of Parsley encodes tyrosine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 268(3):2189-2194.
- Kawalleck P., Schmelzer E., Hahlbrock K. and Somssich I.E.** 1995. Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* 247(4):444-452.
- Kawano T. and Muto S.** 2000. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J. Exp. Bot.* 51:685-693.
- Kawasaki T., Koita H., Nakatsubo T., Hasegawa K., Wakabayashi K., Takahashi H., Umemura K., Umezawa T. and Shimamoto K.** 2006. Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(1):230-235.
- Keating G.J. and O'Kennedy R.** 1997. The chemistry and occurrence of coumarins. In *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action* (O'Kennedy, R. and Thornes, R.D., eds). Chichester: John Wiley & Sons :23-66.
- Keller H., Blein J.P., Bonnet P. and Ricci P.** 1996a. Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiol*. 110(2):365-376.
- Keller H., Bonnet P., Galiana E., Pruvot L., Friedrich L., Ryals J. and Ricci P.** 1996b. Salicylic acid mediates elicitin-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Int.* 9(8):696-703.





- Keller H., Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D. and Strack D.** 1996c. Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42(2):389-396.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T. and Blein J.P.** 2000. The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *J. Exp. Bot.* 51(352):1799-1811.
- Kiegle E., Moore C.A., Haseloff J., Tester M.A. and Knight M.R.** 2000a. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J.* 23(2):267-278.
- Kiegle E., Gilliam M., Haseloff J. and Tester M.** 2000b. Hyperpolarisation-activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J.* 21(2):225-229.
- Kim J. and Kim H.Y.** 2006. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling. *FEBS Letters* 580:5251-5256.
- Kim M.C., Chung W.S., Yun D.J. and Cho M.J.** 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Mol Plant.* 2(1):13-21.
- Kim S.J., Kim M.R., Bedgar D.L., Moinuddin S.G., Cardenas C.L., Davin L.B., Kang C. and Lewis N.G.** 2004. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(6):1455-1460.
- Kim S.Y., Sivaguru M. and Stacey G.** 2006. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol.* 142(3):984-992.
- Kim T.H., Böhmer M., Hu H., Nishimura N. and Schroeder J.I.** 2010. Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61(13.1):13-31.
- Kim Y.H., Bae J.M. and Huh G.H.** 2010. Transcriptional regulation of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from sweetpotato in response to plant developmental stage and environmental stress. *Plant Cell Rep.* [Epub ahead of print].
- Kim Y.J., Kim D.G., Lee S.H. and Lee I.** 2006. Wound-induced expression of the ferulate 5-hydroxylase gene in *Camptotheca acuminata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(2):182-190.
- Kirichok Y., Krapivinsky G. and Clapham D.E.** 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427:360-364.
- Klimecka M. and Muszyńska G.** 2007. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim. Pol.* 54(2):219-233.
- Klüsener B., Young J.J., Murata Y., Allen G.J., Mori I.C., Hugouvieux V. and Schroeder J.I.** 2002. Convergence of calcium signalling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiol.* 130:2152-2163.
- Kneusel R.E., Matern U. and Nicolay K.** 1989. Formation of trans-caffeoyl-CoA from trans-4-coumaroyl-CoA by Zn<sup>2+</sup>-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch. Biochem. Biophys.* 269(2):455-462.
- Knight H., Trewavas A.J. and Knight M.R.** 1996. Cold Calcium Signaling in *Arabidopsis* Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *Plant Cell* 8:489-503.
- Knight H., Trewavas A.J. and Knight M.R.** 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12(5):1067-1078.
- Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J.** 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352(6335):524-526.



- Knight M.R., Read N.D., Campbell A.K. and Trewavas A.J.** 1993. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J. Cell. Biol.* 121 (1):83-90.
- Knight M.R., Smith S.M. and Trewavas A.J.** 1996. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89(11):4967-4971.
- Knobloch K.H. and Hahlbrock K.** 1975. Isoenzymes of p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max.* *Eur. J. Biochem.* 52(2):311-320.
- Kolattukudy P.E., Rogers L.M., Li D., Hwang C.S. and Flaishman M.A.** 1995. Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(10):4080-4087.
- Kolukisaoglu U., Weigl S., Blazevic D., Batistic O. and Kudla J.** 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol.* 134:43-58.
- Korth K.L., Blount J.W., Chen F., Rasmussen S., Lamb C. and Dixon R.A.** 2001. Changes in phenylpropanoid metabolites associated with homology-dependant silencing of phenylalanine ammonia-lyase and its somatic reversion in tobacco. *Physiol. Plantarum* 111:137-143.
- Koshiha T., Kobayashi M., Ishihara A. and Matoh T.** 2010 Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. *Plant Cell Physiol.* 51(2):323-327.
- Krol E., Mentzel T., Chinchilla D., Boller T., Felix G., Kemmerling B., Postel S., Arents M., Jeworutzki E., Al-Rasheid K.A., Becker D. and Hedrich R.** 2010. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J. Biol. Chem.* 285(18):13471-13479.
- Kruger W.M., Carver T.L.W. and Zeyen R.J.** 2002. Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance genes or alleles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61:41-51.
- Kudla J., Xu Q., Harter K., Gruissem W. and Luan S.** 1999. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4718-4723.
- Kudla J., Batistic O. and Hashimoto K.** 2010 Calcium signals : the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell* preview.
- Kühnl T., Koch U., Heller W. and Wellmann E.** 1987. Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinic acid 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 258(1):226-232.
- Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. and Felix G.** 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell.* 16(12):3496-3507.
- Kurusu T., Yagala T., Miyao A., Hirochika H. and Kuchitsu K.** 2005. Identification of a putative voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J.* 42:798-809.
- Kurusu T., Hamada J., Nokajima H., Kitagawa Y., Kiyoduka M., Takahashi A., Hanamata S., Ohno R., Hayashi T., Okada K., Koga J., Hirochika H., Yamane H. and Kuchitsu K.** 2010. Regulation of microbe-associated molecular pattern-induced hypersensitive cell death, phytoalexin production and defense gene expression by calcineurin B-like protein-interacting protein kinases, OsCIPK14/15, in rice cultured cells. *Plant Physiol.* in press.
- Kushwaha R., Singh A. and Chattopadhyay S.** 2008. Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* 20:1747-1759.



## -- L --

- La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Frittig B., Legrand M. and Heitz T.** 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* 198:267-284.
- Lachaud C., Da Silva D., Cotelle V., Thuleau P., Xiong T.C., Jauneau A., Brière C., Graziana A., Bellec Y., Faure J.D., Ranjeva R. and Mazars C.** 2010a. Nuclear calcium controls the apoptotic-like cell death induced by d-erythro-sphinganine in tobacco cells. *Cell Calcium* 47(1):92-100.
- Lachaud C. Da Silva D., Amelot N., Béziat C., Brière C. Cotelle V., Graziana A. Mazars C. and Thuleau P.** 2010b. Production of Reactive Oxygen Species Generated by D-erythro-Sphinganine is not implicated in the Sphingolipid-Induced Programmed Cell Death Response in Tobacco BY-2 Cells. *In preparation.*
- Lacombe E., Hawkins S., Van Doorselaere J., Piquemal J., Goffner D., Poeydomenge O., Boudet A.M. and Grima-Pettenati J.** 1997. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* 11(3):429-441.
- Lacombe E., Van Doorselaere J., Boerjan W., Boudet A.M. and Grima-Pettenati J.** 2000. Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J.* 23(5):663-676.
- Lahaye P.A. and Epstein E.** 1969 Salt Tolerant Plants: Enhancement with Calcium. *Science* 166(3903):395-396.
- Lam E., Kato N. and Lawton M.** 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411(6839):848-853.
- Lam E.** 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(4):305-315.
- Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., and Coruzzi G.** 1998. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396: 125-126.
- Lamb C. and Dixon R.A.** 1997. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., and Wendehenne D.** 2004. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 135:516-529.
- Laohavisit A., Mortimer J.C., Demidchik V., Coxon K.M., Stancombe M.A., Macpherson N., Brownlee C., Hofmann A., Webb A.A., Miedema H., Battey N.H., and Davies J.M.** 2009. Zea mays annexins modulate cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and generate a Ca<sup>2+</sup>-permeable conductance. *Plant Cell* 21:479-493.
- Laohavisit A., Brown A.T., Cicuta P. and Davies J.M.** 2010. Annexins: Components of the Calcium and Reactive Oxygen Signaling Network. *Plant Phys.* 152:1824-1829.
- Lauvergeat V., Lacomme C., Lacombe E., Lasserre E., Roby D. and Grima-Pettenati J.** 2001. Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* 57(7):1187-1195.
- Lawton M.A. and Lamb C.J.** 1987. Transcriptional activation of plant defence genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol. Cell Biol.* 7(1):335-341.
- Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V. and Simon-Plas F.** 2008. The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 146(3):1255-1266.



- Lebrun-Garcia A., Ouaked F., Chiltz A. and Pugin A.** 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15(6):773-781.
- Lebrun-Garcia A., Chiltz A., Gout E., Bligny R. and Pugin A.** 2002. Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogein in tobacco cells. *Planta* 214(5):792-797.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R. and Pugin A.** 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14(10):2627-2641.
- Lecourieux D., Lamotte O., Bourque S., Wendehenne D., Mazars C., Ranjeva R. and Pugin A.** 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38:527-538.
- Lecourieux D., Ranjeva R. and Pugin A.** 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171(2):249-269.
- Lecourieux-Ouaked F., Pugin A. and Lebrun-Garcia A.** 2000. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(8):821-829.
- Lee D. and Douglas C.J.** 1996. Two Divergent Members of a Tobacco 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase (4CL) Gene Family. *Plant Physiol.* 11(2):193-205.
- Lee S.M., Kim H.S., Han H.J., Moon B.C., Kim C.Y., Harper J.F. and Chung W.S.** 2007. Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581:3943-3949.
- Legrand M., Fritig B. and Hirth L.** 1971. Biosynthèse des acides caféoylquiniques dans les feuilles de tabac saines ou infectées par le virus de la mosaïque du tabac. *C.R. Acad. Sc. Paris* 273:525-528.
- Legrand M., Fritig B. and Hirth L.** 1976. Catechol O-methyltransferases of tobacco: evidence for several enzymes with para- and meta-O-methylating activities. *FEBS Lett.* 70(1):131-136.
- Legrand M., Fritig B. and Hirth L.** 1978. O-diphenol O-Methyltransferases of Healthy and Tobacco-Mosaic-Virus-Infected Hypersensitive Tobacco. *Planta* 144:101-108.
- Legue V., Blancaflor E., Wymer C., Perbal G., Fantin D. and Gilroy S.** 1997. Cyttoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  in *Arabidopsis* roots changes in response to touch but not gravity. *Plant Physiol.* 114:789-800.
- Leiss K.A., Maltese F., Choi Y.H., Verpoorte R. and Klinkhamer P.G.L.** 2009. Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in *Chrysanthemum*. *Plant Phys.* 150(3):1567-1575.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D. and Delledonne M.** 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(4):451-458.
- Leng Q., Mercier R.W., Yao W. and Berkowitz G.A.** 1999. Cloning and first characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Phys.* 121(3):753-761.
- Levine A., Tenhaken., Dixon R. and Lamb C.** 1994.  $\text{H}_2\text{O}_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R. and Lamb C.** 1996. Calcium-mediated apoptosis in plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6:427-437.
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ane J.M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C. and Debelle F.** 2004. A putative  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303:1361-1364.
- Lherminier J., Benhamou N., Larrue J., Milat M.L., Boudon-Padieu E., Nicole M. and Blein J.P.** 2003. Cytological Characterization of Elicitin-Induced Protection in Tobacco





- Plants Infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Phytopathology* 93(10):1308-1319.
- Lherminier J., Elmayan T., Fromentin J., Elaraqui K.T., Vesa S., Morel J., Verrier J.L., Cailleteau B., Blein J.P., Simon-Plas F.** 2009. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22(7):868-881.
- Li A., Wang X., Leseberg C.H., Jia J. and Mao L.** 2008. Biotic and abiotic stress responses through calcium-dependent protein kinase (CDPK) signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Signal Behav.* 3(9):654-656.
- Li A.L., Zhu Y.F., Tan X.M., Wang X., Wei B., Guo H.Z., Zhang Z.L., Chen X.B., Zhao G.Y., Kong X.Y., Jia J.Z. and Mao L.** 2008. Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol.* 66(4):429-443.
- Li C. and Wong W.H.** 2001. Model-based analysis of oligonucleotides arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology* 2(8):research0032.1-0032.11.
- Li J., Wang D.Y., Li Q., Xu Y.J., Cui K.M. and Zhu Y.X.** 2004. PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation. *Cell Calcium* 35:71-77.
- Li L., Osakabe Y., Joshi C.P. and Chiang V.L.** 1999. Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* 40(4):555-565.
- Li L., Cheng X., Lu S., Nakatsubo T., Umezawa T. and Chiang V.L.** 2005. Clarification of cinnamoyl co-enzyme A reductase catalysis in monolignol biosynthesis of Aspen. *Plant Cell Physiol.* 46(7):1073-1082.
- Li X., Chanroj S., Wu Z., Romanowsky S.M., Harper J.F. and Sze H.** 2008. A distinct endosomal  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiol.* 147:1675-1689.
- Li X., Bonawitz N.D., Weng J.K. and Chapple C.** 2010. The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell* preview.
- Li Y., Jones L. and McQueen-Mason S.** 2003. Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(6):603-610.
- Liang F., Cunningham K.W., Harper J.F. and Sze H.** 1997. ECA1 complements yeast mutants defective in  $Ca^{2+}$  pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type  $Ca^{2+}$ -ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94:8579-8584.
- Liang L., Flury S., Kalck V., Hohn B. and Molinier J.** 2006. CENTRIN2 interacts with the *Arabidopsis* homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol. Biol.* 61:345-356.
- Liang X.W., Dron M., Cramer C.L., Dixon R.A. and Lamb C.J.** 1989. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* 264(24):14486-14492.
- Libault M., Wan J.R., Czechowski T., Udvardi M. and Stacey G.** 2007. Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:900-911.
- Lin H., Yang Y., Quan R., Mendoza I., Wu Y., Du W., Zhao S., Schumaker K.S., Pardo J.M. and Guo Y.** 2009. Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1607-1619.



- Lindermayr C., Möllers B., Fliegmann J., Uhlmann A., Lottspeich F., Meimberg H. and Ebel J.** 2002. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur. J. Biochem.* 269(4):1304-1315.
- Lindermayr C., Fliegmann J. and Ebel J.** 2003. Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities. *J. Biol. Chem.* 278(5):2781-2786.
- Lionetti V., Raiola A., Camardella L., Giovane A., Obel N., Pauly M., Favaron F., Cervone F. and Bellincampi D.** 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 143(4):1871-1880.
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S. and Schulze-Lefert P.** 2005. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310(5751):1180-1183.
- Liswidowati M.F., Hohmann F., Schwer B. and Kindl H.** 1991. Induction of stilbènes synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* 183:307-314.
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C.D. and Harrison M.J.** 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50:529-544.
- Liu Z., Xia M. and Poovaiah B.W.** 1998. Chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in tobacco: differential regulation by calmodulin isoforms. *Plant Mol Biol.* 38(5):889-897.
- Locke E.G., Bonilla M., Liang L., Takita Y. and Cunningham K.W.** 2000. A Homolog of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels Stimulated by Depletion of Secretory Ca<sup>2+</sup> in Yeast. *Mol. And Cell. Biol.* 20(18):6686-6694.
- Logan D.C. and Knight M.R.** 2003 Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Phys.* 133:21-24.
- Logemann E., Parniske M. and Hahlbrock K.** 1995. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(13):5905-5909.
- Lorrain S., Vaillau F. Balagué C. and Roby D.** 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 8(6):263-271.
- Lotze M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., Sparvero L.J., Amoscato A.A., Washburn N.R., Devera M.E., Liang X., Tör M. and Billiar T.** 2007. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* 220:60-81.
- Love A.J., Milner J.J. and Sadanandom A.** 2008. Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci.* 13:589-595.
- Lu S.X. and Hrabak E.M.** 2002. An *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* 128:1008-1021.
- Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S. and Grissem W.** 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14(S389-400).
- Luan S.** 2009. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci.* 14:37-42.
- Luan S., Lan W. and Chul Lee S.** 2009. Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:339-346.
- Ludwig A.A., Romeis T. and Jones J.D.** 2004. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot.* 55(395):181-188.



- Ludwig A.A., Saitoh H., Felix G., Freymark G., Miersch O., Wasternack C., Boller T., Jones J.D. and Romeis T.** 2005. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:10736-10741.
- Luo G.Z., Wang H.W., Huang J., Tian A.G., Wang Y.J., Zhang J.S. and Chen S.Y.** 2005. A putative plasma membrane cation/ proton antiporter from soybean confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 59:809-820.
- Luo P., Wang G.D. and Chen X.Y.** 2001. Isolation and expression analysis of two cDNAs encoding C4H homologues from *Gossypium arboreum*. *Acta Bot. Sin.* 43:77-81.

## -- M --

- Ma Q.H. and Tian B.** 2005. Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat. *Biol. Chem.* 386(6):553-560.
- Ma L., Liang S., Jones R.L. and Lu Y.T.** 2004. Characterization of a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase from tobacco. *Plant Physiol.* 135(3):1280-1293.
- Ma W., Smigel A., Tsai Y.C., Braam J. and Berkowitz G.A.** 2008. Innate immunity signaling: cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.* 148(2):818-828.
- Maeda K., Kimura S., Demura T., Takeda J. and Ozeki Y.** 2005. DcMYB1 acts as a transcriptional activator of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene (*DcPAL1*) in response to elicitor treatment, UV-B irradiation and the dilution effect. *Plant Mol. Biol.* 59(5):739-752.
- Maher E.A., Bate N.J., Ni W., Elkind Y., Dixon R.A. and Lamb C.J.** 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16):7802-7806.
- Mahesh V., Million-Rousseau R., Ullmann P., Chabrilange N., Bustamante J., Mondlot L., Morant M., Noiroit M., Hamon S., de Kochko A., Werck-Reichhart D. and Campa C.** 2007. Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 64(1-2):145-159.
- Magnan F., Ranty B., Charpentreau M., Sotta B., Galaud J.P. and Aldon D.** 2008. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J.* 56:575-589.
- Mahajan S., Sopory S.K. and Tuteja N.** 2006. Cloning and characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS J.* 273:907-925.
- Malhó R., Moutinho A., van der Luit A. and Trewavas A.J.** 1998. Spatial characteristics calcium signalling: the calcium wave as a basic unit in plant cell calcium signalling. *Phil. Trans. of the Royal Soc. of Lond. Series B* 353:1463-1473.
- Malli R., Frieden M., Osibow K. and Graier W.F.** 2003. Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> elevation during agonist stimulation. *J. Biol. Chem.* 278:10807-10815.
- Mandal S.M., Chakraborty D. and Dey S.** 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal. Behav.* 5(4):359-368.
- Marita J.M., Ralph J., Hatfield R.D. and Chapple C.** 1999. NMR characterization of lignins in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(22):12328-12332.
- Marshall J., Corzo A., Leigh R.A. and Sanders D.** 1994. Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. roots. *Plant Journal* 5: 683-694.



- Martin-Tanguy J., Cabanne F., Perdrizet E. and Martin C.** 1978. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17:1927-1928.
- Martin-Tanguy J.** 1985. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul.* 3:381-399.
- Martz F., Maury S., Pinçon G. and Legrand M.** 1998. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.* 36(3):427-437.
- Massala R., Legrand M. and Fritig B.** 1987. Comparative effects of two competitive inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. *Plant Physiol. Biochem.* 25:217-225.
- Matsuda F., Morino K., Ano R., Kuzawa M., Wakasa K. and Miyagawa H.** 2005. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant Cell Physiol.* 46(3):454-466.
- Matsui N., Chen F., Yasuda S. and Fukushima K.** 2000. Conversion of guaiacyl to syringyl moieties on the cinnamyl alcohol pathway during the biosynthesis of lignin in angiosperms. *Planta* 210:831-835.
- Matzinger P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296(5566):301-305.
- Matzke M., Weiger T.M., Papp I. and Matzke A.J.** 2009. Nuclear membrane ion channels mediate root nodule development. *Trends Plant Sci.* 14(6):295-298.
- Mauch-Mani B. and Slusarenko A.J.** 1996. Production of Salicylic Acid Precursors Is a Major Function of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8(2):203-212.
- Maurel C., Verdoucq L, Luu D.T. and Santoni V.** 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595-624.
- Maury S., Geoffroy P. and Legrand M.** 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* 121(1):215-224.
- Mazars C., Bourque S., Mithöfer A., Pugin A. and Rangeva R.** 2009 Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytol.* 181:261-274.
- McAinsh M.R., Brownlee C. and Hetherington A.M.** 1990. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic  $Ca^{2+}$  precedes stomatal closure. *Nature* 343:186-188.
- McAinsh M.R., Webb A., Taylor J.E. and Hetherington A.M.** 1995. Stimulus-Induced Oscillations in Guard Cell Cytosolic Free Calcium. *Plant Cell* 7(8):1207-1219.
- McAinsh M.R. and Hetherington A.M.** 1998. Encoding specificity in  $Ca^{2+}$  signaling systems. *Trends on Plant Sciences* 3:32-36.
- McAinsh M.R. and Pittman J.K.** 2009. Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181:275-294.
- McAinsh M.R., Schroeder J.I.** in press. Crosstalk in  $Ca^{2+}$  signaling pathways. In: *Yoshioka K, Shinozaki K, eds. Signal cross talk in plant stress responses. Ames, Iowa, USA: Blackwell.*
- McCormack E. and Braam J.** 2003. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol.* 159:585-598.
- McCormack E., Tsai Y.C. and Braam J.** 2005. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10(8):383-389.
- Means A.R. and Dedman J.R.** 1980. Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature* 285(5760):73-77.
- Menden B., Kohlhoff M. and Moerschbacher B.M.** 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry* 68(4):513-520.





- Meng H. and Campbell W.H.** 1998. Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid O-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. *Plant Mol. Biol.* 38(4):513-520.
- Menke F.L., Kang H.G., Chen Z., Park J.M., Kumar D. and Klessig D.F.** 2005. Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18(10):1027-1034.
- Menteyne A., Burdakov A., Charpentier G., Petersen O.H. and Cancela J.M.** 2006. Generation of specific Ca<sup>2+</sup> signals from Ca<sup>2+</sup> stores and endocytosis by differential coupling to messengers. *Curr. Biol.* 16: 1931-1937.
- Meurer-Grimes B., Berlin J. and Strack D.** 1989. Hydroxycinnamoyl-CoA:Putrescine Hydroxycinnamoyltransferase in Tobacco Cell Cultures with High and Low Levels of Caffeoylputrescine. *Plant Physiol.* 89(2):488-492.
- Meyer K., Kohler A. and Kauss H.** 1991. Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett.* 290(1-2):209-212.
- Meyer K., Cusumano J.C., Somerville C. and Chapple C.C.** 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(14):6869-6874.
- Meyerhoff O., Muller K., Roelfsema M.R., Latz A., Lacombe B., Hedrich R., Dietrich P. and Becker D.** 2005. AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta* 222: 418-427.
- Michalak M., Groenendyk L., Szabo E., Gold L.I. and Opas M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417:651-666.
- Michard E., Alves F., Feijó J.A.** 2009. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int J Dev Biol.* 53(8-10):1609-1622.
- Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Ricci P. and Blein J.P.** 1997. The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* 416(2):190-192.
- Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Panabières F., Ricci P. and Blein J.P.** 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(1):133-139.
- Mills R.F., Doherty M.L., Lopez-Marques R.L., Weimar T., Dupree P., Palmgren M.G., Pittman J.K. and Williams L.E.** 2008. ECA3, a Golgi-localized P2-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 146:116-128.
- Minta A., Kao J.P.Y. and Tsien R.Y.** 1989. Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophore. *J. Biol. Chem.* 264(14):8171-8178.
- Mithöfer A., Ebel J., Bhagwat A.A., Boller T. and Neuhaus-Url G.** 1999. Transgenic aequorin monitors cytosolic transients in soybean cells challenged with  $\beta$ -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207:566-574.
- Mithöfer A., Ebel J. and Felle H.H.** 2005. Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in  $\beta$ -glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:983-990.
- Mitsuda N., Isono T. and Sato M.H.** 2003. *Arabidopsis* CAMTA family proteins enhance V-PPase expression in pollen. *Plant Cell Physiol.* 44(10):975-981.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10):490-498.
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G.E. and Downie J.A.** 2006. Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J.* 48:883-894.



- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H. and Shibuya N.** 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(49):19613-19618.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M. Adams J.A., Ikura M. and Tsien R.Y.** 1997. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and Calmodulin. *Nature* 388:882-887.
- Mizutani M., Ohta D. and Sato R.** 1997. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol.* 113:755-763.
- Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.P., Hartmann M.A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R. and Bessoule J.J.** 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279(35):36277-36286.
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Messerli M.A., Shi C. and Gilroy S.** 2007. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(52):20996-21001.
- Monshausen G.B., Messerli M.A. and Gilroy S.** 2008. Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147(4):1690-1698.
- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rustérucchi C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.P., Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F. and Triantaphylidès C.** 2005. Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 138(3):1516-1526.
- Morel J., Fromentin J., Blein J.P., Simon-Plas F. and Elmayan T.** 2004. Rac regulation of NtrbohD, the oxidase responsible for the oxidative burst in elicited tobacco cell. *Plant J.* 37(2):282-293.
- Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.J., Blein J.P., Simon-Plas F.** 2006. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics* 5(8):1396-1411.
- Moreno I., Norambuena L., Maturana D., Toro M., Vergara C., Orellana A., Zurita-Silva A. and Ordenes V.R.** 2008. AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup>/heavy metal pump. *J. Biol. Chem.* 283:9633-9641.
- Mori I.C., Murata Y., Yang Y., Munemasa S., Wang Y.F., Andreoli S., Tiriach H., Alonso J.M., Harper J.F., Ecker J.R., Kwak J.M. and Schroeder J.I.** 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca<sup>2+</sup>- permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* 4:1749-1762.
- Moscatiello R., Mariani P., Sanders D. and Maathuis F.J.** 2006. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* 57(11):2847-2865.
- Muir S.R. and Sanders D.** 1997. Inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive calcium release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Phys.* 114(4):1511-1521.
- Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H. and Prats E.** 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59(3):501-520.

-- N --

**Nair R.B., Joy R.W., Kurylo E., Shi X., Schnaider J., Datla R.S., Keller W.A. and Selvaraj G.** 2000. Identification of a CYP84 family of cytochrome P450-dependent mono-



- oxygenase genes in *Brassica napus* and perturbation of their expression for engineering sinapine reduction in the seeds. *Plant Physiol.* 123(4):1623-1634.
- Nair R.B., Xia Q., Kartha C.J., Kurylo E., Hirji R.N., Datla R. and Selvaraj G.** 2002. *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiol.* 130(1):210-220.
- Nair R.B., Bastress K.L., Ruegger M.O., Denault J.W. and Chapple C.** 2004. The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *The Plant Cell* 16:544-554.
- Nakagawa Y., Katagiri T., Shinozaki K., Qi Z., Tatsumi I., Furuichi T., Kishigami A., Sokabe M., Kojima I., Sato S., Kato T., Tabata S., Iida K., Terashima A., Nakano M., Ikeda M., Yamanaka T. and Lida H.** 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 104(9):3639-3644.
- Nakajima K., Hashimoto T. and Yamada Y.** 1993. Two tropinone reductases with different stereospecificities are short-chain dehydrogenases evolved from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(20):9591-9595.
- Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T. and Jones J.D.** 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135(2):1113-1128.
- Navazio L., Bewell M.A., Siddiqua A., Dickinson G.D., Galione A. and Sanders D.** 2000. Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(15):8693-8698.
- Navazio L., Mariani P. and Sanders D.** 2001. Mobilization of Ca<sup>2+</sup> by Cyclic ADP-Ribose from the Endoplasmic Reticulum of Cauliflower Florets. *Plant Phys.* 125:2129-2138.
- Navazio L., Moscattello R., Bellincampi D., Baldan B., Meggio F., Brini M., Bowler C. and Mariani P.** 2002. The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. *Planta* 215:596-605.
- Nedelkina S., Jupe S.C., Blee K.A., Schalk M., Werck-Reichhart D. and Bolwell G.P.** 1999. Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: engineering expression in yeast. *Plant Mol. Biol.* 39:1079-1090.
- Negrel J., Paynot M. and Javelle F.** 1992. Purification and Properties of Putrescine Hydroxycinnamoyl Transferase from Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Cell Suspensions. *Plant Physiol.* 98(4):1264-1269.
- Negrel J. and Javelle F.** 1997. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase from tobacco cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 247(3):1127-1135.
- Nemchinov L.G., Shabala L. and Shabala S.** 2008. Calcium Efflux as a Component of the Hypersensitive Response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiol.* 49(1):40-46.
- Ng C.K., Carr K., McAinsh M.R., Powell B., Hetherington A.M.** 2001. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410(6828):596-599.
- Nicholson R.L. and Hammerschmidt R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:369-389.
- Niggeweg R., Michael A.J. and Martin C.** 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22(6):746-754.
- Nomura H., Komori T., Kobori M., Nakahira Y. and Shiina T.** 2008. Evidence for chloroplast control of external Ca<sup>2+</sup>-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients and stomatal closure. *Plant J.* 53(6):988-998.



- Nomura K., Melotto M. and He S.Y.** 2005. Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:361-368.
- Nomura K., Debroy S., Lee Y.H., Pumpin N., Jones J. and He S.Y.** 2006. A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313(5784):220-223.
- Nühse T.S., Peck S.C., Hirt H. and Boller T.** 2000. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J. Biol. Chem.* 275:7521-7526.
- Nühse T.S., Bottrill A.R., Jones A.M.E. and Peck S.C.** 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J.* 51:931-940.
- Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L.** 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198:249-266.

## -- O --

- O'Connell A., Holt K., Piquemal J., Grima-Pettenati J., Boudet A., Pollet B., Lapierre C., Petit-Conil M., Schuch W. and Halpin C.** 2002. Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res.* 11(5):495-503.
- Oecking C. and Jaspert N.** 2009. Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(6):760-765.
- Ohta M., Guo Y., Halfter U. and Zhu J.K.** 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11771-11776.
- Oldroyd G.E.D. and Downie J.A.** 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:519-546.
- Oppenheimer D.G., Pollock M.A., Vacik J., Szymanski D.B., Ericson B., Feldmann K., Marks M.D.** 1997. Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(12):6261-6266.
- Osakabe K., Tsao C.C., Li L., Popko J.L., Umezawa T., Carraway D.T., Smeltzer R.H., Joshi C.P. and Chiang V.L.** 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(16):8955-8960.
- Osman H., Vauthrin S., Mikes V., Milat M.L., Panabières F., Marais A., Brunie S., Maume B., Ponchet M. and Blein J.P.** 2001. Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell.* 12(9):2825-2834.

## -- P --

- Pakusch A.E., Kneusel R.E. and Matern U.** 1989. S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* 271(2):488-494.
- Pallas J.A., Paiva N.L., Lamb C. and Dixon R.A.** 1996. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J.* 10:281-293.
- Palmer A.E. and Tsien R.Y.** 2006. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat. Protoc.* 1(3):1057-1065.
- Panabières F., Ponchet M., Allasia V., Cardin L. and Ricci P.** 1997. Characterization of border species among *Pythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycol. Res.* 101:1459-1468.





- Papadopoulou K., Melton R.E., Leggett M., Daniels M.J. and Osbourn A.E.** 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(22):12923-12928.
- Paredes R.M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W. and Lechleiter J.D.** 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151.
- Parvathi K., Chen F., Guo D., Blount J.W. and Dixon R.A.** 2001. Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant J.* 25(2):193-202.
- Patharkar O.R. and Cushman J.C.** 2000. A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudoresponse regulator. *Plant J.* 24:679-691.
- Patharkar O.R. and Cushman J.C.** 2006. A novel coiled-coil protein co-localizes and interacts with a calcium-dependent protein kinase in the common ice plant during low-humidity stress. *Planta* 225:57-73.
- Patil S., Takezawa D. and Poovaiah B.W.** 1995. Chimeric plant calcium/calmodulin-dependent protein kinase gene with a neural visinin-like calcium-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:4897-4901.
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., van der Luit A.H., Moreau M., Trewavas A.J., Ranjeva R. and Mazars C.** 2000. Cell signalling – Control of free calcium in plant cell nuclei. *Nature* 405:754-755.
- Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Graziana A., Muto S., Ranjeva R. and Mazars C.** 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium* 30:413-421.
- Pearce G., Moura D.S., Stratmann J. and Ryan C.A.** 2001. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:12843-12847.
- Peck S.C., Nühse T.S., Hess D., Iglesias A., Meins F. and Boller T.** 2001. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* 13:1467-1475.
- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., and Schroeder J.I.** 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731-734.
- Peiter E., Maathuis F.J.M., Mills L.N., Knight H., Pelloux M., Hetherington A.M. and Sanders D.** 2005. The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434:404-408.
- Peiter E., Sun J., Heckmann A.B., Venkateshwaran M., Riely B.K., Otegui M.S., Edwards A., Freshour G., Hahn M.G., Cook D.R., Sanders D., Oldroyd G.E., Downie J.A. and Ané J.M.** 2007. The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol.* 145(1):192-203.
- Pellegrini L., Rohfritsch O., Fritig B. and Legrand M.** 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol.* 106(3):877-886.
- Perez V., Wherrett T., Shabala S., Muniz J., Dobrovinskaya O. and Pottosin I.** 2008. Homeostatic control of slow vacuolar channels by luminal cations and evaluation of the channel-mediated tonoplast Ca<sup>2+</sup> fluxes in situ. *J. Exp. Bot.* 59: 3845-3855.
- Persson S., Wyatt S.E., Love J., Thompson W.F., Robertson D. and Boss W.F.** 2001. The Ca<sup>2+</sup> status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiol.* 126:1092-1104.
- Petersen M. Strack D. and Matern U.** 1999. Biosynthesis of phenylpropanoid and related compounds. *Sheffield Acad. Press Ltd.*



- Pfaffl M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Pierrel M.A., Batard Y., Kazmaier M., Mignotte-Vieux C., Durst F. and Werck-Reichhart D.** 1994. Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 224(3):835-844.
- Pierson E.S., Miller D.D., Callahan D.A., van Aken J., Hackett G. and Hepler P.K.** 1996. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol.* 174(1):160-173.
- Pinçon G., Maury S., Hoffmann L., Geoffroy P., Lapierre C., Pollet B. and Legrand M.** 2001. Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* 57(7):1167-1176.
- Piquemal J., Lapierre C., Myton K., O'Connell A., Schuch W., Grima-Pettenati J. and Boudet A.M.** 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 13(1):71-83.
- Pittman J.K., Shigaki T., Cheng N.H., and Hirschi K.D.** 2002. Mechanism of N-terminal autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CAX1. *J. Biol. Chem.* 277:26452-26459.
- Plieth C.** 2001. Plant calcium signalling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. *Protoplasma* 218:1-23.
- Podila G.K., Rogers L.M. and Kolattukudy P.E.** 1993. Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103(1):267-272.
- Podstolski A., Havkin-Frenkel D., Malinowski J., Blount J.W., Kourteva G. and Dixon R.A.** 2002. Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 61:611-620.
- Poinssot B., Vandelle E., Bentejac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos-Thevenot P. and Pugin A.** 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant-Microbe Int.* 16:553-564.
- Pollack H.** 1928. Calcium ions in living protoplasm. *J. Gen. Physiol.* 11(2):539-545.
- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y. and Blein J.P.** 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol Life Sci.* 56(11-12):1020-1047.
- Pontier D., Godiard L., Marco Y. and Roby D.** 1994. *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* 5(4):507-521.
- Poovaiah B.W., Xia M., Liu Z., Wang W., Yang T., Sathyanarayanan P.V. and Franceschi V.R.** 1999. Developmental regulation of the gene for chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase in anthers. *Planta* 209(2):161-171.
- Pottosin I.I. and Schonknecht G.** 2007. Vacuolar calcium channels. *J. Exp. Bot.* 58: 1559-1569.
- Price A.H., Taylor A., Ripley S.J., Griffiths A., Trewavas A.J. and Knight M.R.** 1994. Oxidative Signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium. *Plant Cell* 6(9):1301-1310.
- Pugin A., Frachisse J.M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R. and Guern J.** 1997. Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* 9(11):2077-2091.
- Putney J.W. Jr. and Thomas A.P.** 2006. Calcium signaling: double duty for calcium at the mitochondrial uniporter. *Curr. Biol.* 16(18):812-815.



## -- Q --

- Qi Z., Kishigami A., Nakagawa Y., Lida H. and Sokabe M.** 2004. A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 45:1704-1708.
- Qi Z., Stephens N.R., and Spalding E.P.** 2006. Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* 142:963-971.
- Qudeimat E., Faltusz A.M., Wheeler G., Lang D., Brownlee C., Reski R. and Frank W.** 2008. A PIIB-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 19555-19560.
- Quentin M., Allasia V., Pegard A., Allais F., Ducrot P.H., Favery B., Levis C., Martinet S., Masur C., Ponchet M., Roby D., Schlaich N.L., Jouanin L. and Keller H.** 2009. Imbalanced lignin biosynthesis promotes the sexual reproduction of homothallic oomycete pathogens. *PLoS Pathog.* 5(1):e1000264.

## -- R --

- R Development Core Team** 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ralph J., Hatfield R.D., Piquemal J., Yahiaoui N., Pean M., Lapierre C. and Boudet A.M.** 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(22):12803-12808.
- Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F., Schatz P.F., Marita J.M., Ralph S.A., Reddy M.S., Chen F. and Dixon R.A.** 2006. Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. *J. Biol. Chem.* 281(13):8843-8853.
- Ramonell K.M., Zhang B., Ewing R.M., Chen Y. XU D., Stacey G. and Somerville S.** 2002. Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 3(5):301-311.
- Ranf S., Wunnenberg P., Lee J., Becker D., Dunkel M., Hedrich R., Scheel D. and Dietrich P.** 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J.* 53:287-299.
- Ranty B., Aldon D. and Galaud J.P.** 2006. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal. Behav.* 1(3):96-104.
- Rasmussen S. and Dixon R.A.** 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11:1537-1552.
- Rathore K.S., Cork R.J. and Robinson K.R.** 1991. A cytoplasmic gradient of Ca<sup>2+</sup> is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev Biol.* 148(2):612-619.
- Rauscher M., Adam A.L., Wirtz S., Guggenheim R., Mendgen K. and Deising H.B.** 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19:625-633.
- Ray S., Agarwal P., Arora R., Kapoor S. and Tyagi A.K.** 2007. Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Mol Genet Genomics.* 278(5):493-505.
- Reape T.J. and McCabe P.F.** 2008. Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytol.* 180:13-26.
- Reddy A.S.** 2001. Calcium : silver bullet in signaling. *Plant Sci.* 160(3):381-404.
- Reddy M.S., Chen F., Shadle G., Jackson L., Aljoe H. and Dixon R.A.** 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(46):16573-16578



- Reina-Pinto J.J. and Yephremov A.** 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem.* 47:540-549.
- Reichert A.I., He X.Z. and Dixon R.A.** 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochem J.* 424(2):233-242.
- Ren D., Yang K.Y., Li G.J., Liu Y. and Zhang S.** 2006. Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol.* 141(4):1482-1493.
- Ricci P., Bonnet P., Huet J.C., Sallantin M., Beauvais-Cante F., Bruneteau M., Billard V., Michel G. and Pernollet J.C.** 1989 Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183:555-563.
- Ricci P.** 1997. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitors. In *Plant Microbe Interactions* Stacey G. and Kenn N.T. ed 3:53-75.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G.** 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plants Sci.* 2(4):152-159.
- Ridgway E.B. and Ashley C.C.** 1967. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29(2):229-234.
- Ridley B.L., O'Neill M.A. and Mohnen D.** 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonides-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967.
- Riely B.K., Loughon G., Ane J.M. and Cook D.R.** 2007. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.* 49:208-216.
- Rietveld A. and Simons K.** 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376(3):467-479.
- Rivas S. and Thomas C.M.** 2005. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:395-436.
- Ro D.K., Mah N., Ellis B.E. and Douglas C.J.** 2001. Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol.* 126(1):317-329.
- Robatzek S., Chinchilla D. and Boller T.** 2006. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20(5):537-542.
- Roberts D.M. and Harmon A.C.** 1992. Calcium-modulated proteins : targets of intracellular signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:375-414.
- Roberts M.R.** 2003. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci.* 8(5):218-223.
- Romeis T., Ludwig A.A., Martin R. and Jones J.D.** 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20:5556-5567.
- Ron M. and Avni A.** 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16(6):1604-1615.
- Rose J.K., Braam J., Fry S.C. and Nishitani K.** 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43(12):1421-1435.
- Rose T.L., Bonneau L., Der C., Marty-Mazars D. and Marty F.** 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol. Cell* 98:53-67.
- Rosebrock T.R., Zeng L., Brady J.J., Abramovitch R.B., Xiao F. and Martin G.B.** 2007. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 448(7151):370-374.





- Rowland O., Ludwig A.A., Merrick C.J., Baillieul F., Tracy F.E., Durrant W.E., Fritz-Laylin L., Nekrasov V., Sjölander K., Yoshioka H. and Jones J.D.** 2005. Functional analysis of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes identifies a protein kinase, ACIK1, that is essential for full Cf-9-dependent disease resistance in tomato. *Plant Cell* 17(1):295-310.
- Russell D.W. and Conn E.E.** 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 122:256-258.
- Russell D.W.** 1971. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J. Biol. Chem.* 246:3870-3878.
- Rusterucci C., Stallaert V., Milat M.L., Pugin A., Ricci P. and Blein J.P.** 1996. Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111(3):885-891.

## -- S --

- Sai J.Q. and Johnson C.H.** 2002. Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol. *Plant Cell* 14:1279-1291.
- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J.A., Parniske M., Hayashi M. and Kawaguchi M.** 2007. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* 19(2):610-624.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C. and Harper J.F.** 2002 Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14:S401-417.
- Sarni F., Grand C. and Boudet AM.** 1984. Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). *Eur. J. Biochem.* 139(2):259-265.
- Sathyanarayanan P.V., Cremo C.R. and Poovaiah B.W.** 2000. Plant chimeric Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. *J. Biol. Chem.* 275:30417-30422.
- Sathyanarayanan P.V., Siems W.F., Jones J.P. and Poovaiah B.W.** 2001. Calcium-stimulated autophosphorylation site of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol. Chem.* 276(35):32940-32947.
- Schäfer S. and Schmölling T.** 2002. The CRK1 receptor-like kinase gene of tobacco is negatively regulated by cytokinin. *Plant Mol. Biol.* 50(2):155-166.
- Scheel D.** 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1(4):305-310.
- Schiøtt M., Romanowsky S.M., Bækgaard L., Jakobsen M.K., Palmgren M.G. and Harper J.F.** 2004. A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:9502-9507.
- Schmelzer E., Kruger-Lebus S. and Hahlbrock K.** 1989. Temporal and Spatial Patterns of Gene Expression around Sites of Attempted Fungal Infection in Parsley Leaves. *Plant Cell* 1(10):993-1001.
- Schmitt D., Pakusch A.E. and Matern U.** 1991. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *J. Biol. Chem.* 266(26):17416-17423.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P. and Werck-Reichhart D.** 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276(39):36566-36574.



- Schroeder J.I., Allen G.J., Hugouvieux V., Kwak J.M. and Waner D.** 2001. Guard Cell Signal Transduction. *Annu. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 52:627-658.
- Schweizer P., Felix G., Buchala A., Muller C. and Métraux J.P.** 1996. Perception of free cutin monomers by plant cells. *Plant J.* 10:331-341.
- Schwessinger B. and Zipfel C.** 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(4):389-395.
- Scruse-Field S.A. and Knight M.R.** 2003. Calcium: Just a chemical switch? *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:500-506.
- Sedbrook J.C., Kronebush P.J., Borisy G.G., Trewavas A.J. and Masson P.** 1996. Transgenic aequorin reveals organ specific cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* 111:243-257.
- Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J., Richaud P. and Rolland N.** 2006. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J. Biol. Chem.* 281:2882-2892.
- Sentenac H. and Grignon C.** 1981. A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell walls. *Plant Physiol.* 68(2):415-419.
- Shacklock P.S., Read N.D. and Trewavas A.J.** 1992. Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* 358:753-755.
- Shadle G.L., Wesley S.V., Korth K.L., Chen F., Lamb C. and Dixon R.A.** 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64(1):153-161.
- Shah J.** 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:459-464.
- Shi J., Kim K.N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S. and Kudla J.** 1999. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11:2393-2405.
- Shigaki T. and Hirschi K.D.** 2006. Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biology* 8:419-429.
- Shigaki T., Rees I., Nakhleh L, and Hirsch, K.D.** 2006. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. *J. Mol. Evol.* 63:815-825.
- Shimizu B., Miyagawa H., Ueno T., Sakata K., Watanabe K. and Ogawa K.** 2005. Morning glory systemically accumulates scopoletin and scopolin after interaction with *Fusarium oxysporum*. *Z. Naturforsch.* 60c:83-90.
- Shimomura O., Johnson F.H. and Saiga Y.** 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:222-239.
- Shinya T., Galis I., Narisawa T., Sasaki M., Fukuda H., Matsuoka H., Saito M. and Matsuoka K.** 2007. Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell Physiol.* 48:1404-1413.
- Sibout R., Eudes A., Pollet B., Goujon T., Mila I., Granier F., Séguin A., Lapierre C. and Jouanin L.** 2003. Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiol.* 132(2):848-860.
- Sibout R., Eudes A., Mouille G., Pollet B., Lapierre C., Jouanin L. and Séguin A.** 2005. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(7):2059-2076.
- Sieberer B.J., Chabaud M., Timmers A.C., Monin A., Fournier J. and Barker D.G.** 2009. A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago*



- truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol.* 151(3):1197-1206.
- Siegel R.S., Xue S., Murata Y., Yang Y., Nishimura N., Wang A. and Schroeder J.I.** 2009. Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 59:207-220.
- Simon-Plas F., Rusterucci C., Milat M.L., Humbert C., Montillet J.L. and Blein J.P.** 1997. Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Envir.* 20:1573-1579.
- Simon-Plas F., Elmayan T. and Blein J.P.** 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31(2):137-147.
- Singh K.M., Foley R.C. and Onate-Sanchez L.** 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. In Plant Biol.* 5:430-436.
- Sircar D. and Mitra A.** 2008. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *J. of Plant Physiol.* 165:407-414.
- Slinkard K. and Singleton V.L.** 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28:49-55.
- Smyth G.K.** 2005. Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, pages 397-420.
- Stakman E.C.** 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. of Agricultural Res.* 4:193-199.
- Stanislas T., Bouyssie D., Rossignol M., Vesa S., Fromentin J., Morel J., Pichereaux C., Monsarrat B. and Simon-Plas F.** 2009. Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol. Cell Proteomics* 8(9):2186-2198.
- Subbaiah C.C., Bush D.S. and Sachs M.M.** 1994. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *The Plant Cell* 6:1747-1762.
- Sudha G. and Ravishankar G.** 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:181-212.
- Sullivan M.L. and Zarnowski R.** 2010. Red clover coumarate 3'-hydroxylase (CYP98A44) is capable of hydroxylating p-coumaroyl-shikimate but not p-coumaroyl-malate: implications for the biosynthesis of phaselic acid. *Planta* 231(2):319-328.
- Sun J., Miwa H., Downie J.A. and Oldroyd G.E.D.** 2007. Mastoparan activates calcium spiking analogous to nod factor-induced responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol.* 144 695-702.
- Suty L., Blein J., Ricci P. and Pugin A.** 1995. Early changes in gene expression in tobacco cells elicited with cryptogein. *Mol. Plant Microbe Int.* 8:644-651.
- Szczegielnik J., Klimecka M., Liwosz A., Ciesielski A., Kaczanowski S., Dobrowolska G., Harmon A.C. and Muszyńska G.** 2005. A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 139:1970-1983.
- Sze H., Liang F., Hwang I., Curran A.C. and Harper J.F.** 2000. Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:433-462.



**Suzuki A., Yano A., Nishiuchi T., Nakano T., Kodama H., Yamaguchi K. and Shinshi H.** 2003. Comprehensive analysis of early response genes to two different microbial elicitors in tobacco cells. *Plant Science* 173:291-301.

-- T --

**Tadross M.R., Dick I.E. and Yue D.T.** 2008. Mechanism of local and global  $\text{Ca}^{2+}$  sensing by calmodulin in complex with a  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Cell* 133:1228-1240.

**Taguchi G., Sharan M., Gonda K., Yanagisawa Y., Shimosaka M., Hayashida N. and Okazaki M.** 1998. Effect of methyl jasmonate and elicitor on *PAL* gene expression in tobacco cultured cells. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 7:79-83.

**Takahashi A., Kawasaki T., Henmi K., Shi K., Kodama O., Satoh H. and Shimamoto K.** 1999. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J.* 17(5):535-545.

**Takahashi K., Isobe M., Knight M.R., Trewavas A.J. and Muto S.** 1997. Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in tobacco suspension-culture cells. *Plant Physiol.* 113:587-594.

**Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K. and Dolan L.** 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science.* 319(5867):1241-1244.

**Tang D., Simonich M.T. and Innes R.W.** 2007. Mutations in *LACS2*, a long-chain acyl-coenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144(2):1093-1103.

**Tanguy J. and Martin C.** 1972. Phenolic compounds and the hypersensitivity response in *Nicotiana tabacum* infected with Tobacco Mosaic Virus. *Phytochemistry* 11:19-28.

**Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.S., Han B., Zhu T., Zhou G. and Katagiri F.** 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15:317-330.

**Tavernier E., Wendehenne D., Blein J.P. and Pugin A.** 1995. Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 109(3):1025-1031.

**Taylor A.R., Manison N., Fernandez C., Wood J. and Brownlee C.** 1996. Spatial Organization of Calcium Signaling Involved in Cell Volume Control in the Fucus Rhizoid. *Plant Cell* 8(11):2015-2031.

**Thion L., Mazars C., Nacry P., Bouchez D., Moreau M., Ranjeva R., and Thuleau P.** 1998. Plasma membrane depolarization-activated calcium channels, stimulated by microtubule-depolymerizing drugs in wild-type *Arabidopsis thaliana* protoplasts, display constitutively large activities and a longer half-life in *ton 2* mutant cells affected in the organization of cortical microtubules. *Plant J.* 13:603-610.

**Thomma B.P., Penninckx I.A., Broekaert W.F. and Cammue B.P.** 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13(1):63-68.

**Thordal-Christensen H.** 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):351-357.

**Thuleau P., Ward J.M., Ranjeva R. and Schroeder J.I.** 1994. Voltage-dependent calcium-permeable channels in the plasma-membrane of a higher-plant cell. *EMBO Journal* 13: 2970-2975.

**Tieman D., Taylor M., Schauer N., Fernie A.R., Hanson A.D. and Klee H.J.** 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(21):8287-8292.





- Tietjen K.G. and Matern U.** 1983. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 2. Effects on enzyme activities. *Eur. J. Biochem.* 131:409-413.
- Tirichine L., Imaizumi-Anraku H., Yoshida S., Murakami Y., Madsen L.H., Miwa H., Nakagawa T., Sandal N., Albrektsen A.S., Kawaguchi M., Downie A., Sato S., Tabata S., Kouchi H., Parniske M., Kawasaki S. and Stougaard J.** 2006. Deregulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441(7097):1153-1156.
- Toquin V., Grausem B., Geoffroy P. and Legrand M.** 2003. Structure of the tobacco caffeic acid O-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Mol. Biol.* 52(3):495-509.
- Treutter D.** 2005. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4:147-157.
- Trewavas A.J. and Malho R.** 1997. Signal perception and transduction : the origin of the phenotype. *The Plant Cell* 9(7):1181-1195.
- Trewavas A.** 1999. Le Calcium, C'est la Vie: Calcium Makes Waves. *Plant Physiol.* 120(1):1-6.
- Tronchet M., Balagué C., Kroj T., Jouanin L. and Roby D.** 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Pathol.* 11(1):83-92.
- Tsien R.Y., Pozzan T. and Rink T.J.** 1982. Calcium Homeostasis in Intact Lymphocytes: Cytoplasmic Free Calcium Monitored With a New Intracellularly Trapped Fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* 94(2):325-334.
- Tyerman S.D., Niemietz C.M. and Bramley H.** 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25(2):173-194.

## -- U --

- Urquhart W., Gunawardena A.H., Moeder W., Ali R., Berkowitz G.A., and Yoshioka K.** 2007. The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca<sup>2+</sup> dependent manner. *Plant Mol. Biol.* 65: 747-761.

## -- V --

- Vainonen J.P., Sakuragi Y., Stael S., Tikkanen M., Allahverdiyeva Y., Paakkanen V., Aro E., Suorsa M., Scheller H.V., Vener A.V. and Aro E.M.** 2008. Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 275(8):1767-1777.
- Valle T., Lopez J.L., Hernandez J.M. and Corchete P.** 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Sci.* 125:97-101.
- van Bentem S.D. and Hirt H.** 2007. Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends Plant Sci.* 12:404-411.
- van Der Luit A.H., Olivari C., Haley A., Knight M.R. and Trewavas A.J.** 1999. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 121(3):705-714.
- van Doorn W.G. and Woltering E.J.** 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.* 10(3):117-122.



- Van Doorselaere J., Dumas B., Baucher M., Fritig B., Legrand M., Van Montagu M. and Inzé D.** 1993. One-step purification and characterization of a lignin-specific O-methyltransferase from poplar. *Gene* 133(2):213-217.
- Van Loon L.C. and Van Strien E.A.** 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97.
- Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Van Loon L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243-354.
- Vanderbeld B. and Snedden W.A.** 2007. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. *Plant Mol Biol.* 64(6):683-697.
- Vauthrin S., Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Maume B., Osman H. and Blein J.P.** 1999. Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1419(2):335-342.
- Very A.A. and Davies J.M.** 2000. Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 9801-9806.
- Viard M.P., Martin F., Pugin A., Ricci P. and Blein J.P.** 1994. Protein Phosphorylation Is Induced in Tobacco Cells by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiol.* 104(4):1245-1249.
- Villegas R.J. and Kojima M.** 1986. Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *J. Biol. Chem* 261(19):8729-8733.
- Vlot A.C., Klessig D.F. and Park S.W.** 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:436-442.
- Vogel J.P., Raab T.K., Schiff C. and Somerville S.C.** 2002. PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14(9):2095-2106.
- Vögeli U. and Chappell J.** 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 88(4):1291-1296.
- Vögeli U., Vögeli-Lange R. and Chappell J.** 1992. Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell-suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists. *Plant Physiol.* 100(3):1369-1376.
- Vogt T.** 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* 3(1):2-20.
- Von Röpenack E., Parr A. and Schulze-Lefert P.** 1998. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J. Biol. Chem.* 272:9013-9022.
- Vos J.W., Safadi F., Reddy A.S. and Hepler P.K.** 2000. The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *Plant Cell* 12(6):979-990.

## -- W --

- Waadt R., Schmidt L.K., Lohse M., Hashimoto K., Bock R. and Kudla J.** 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.* 56:505-516.
- Wan J., Zhang X.C., Neece D., Ramonell K.M., Clough S., Kim S.Y., Stacey M.G. and Stacey G.** 2008. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(2):471-481.



- Wang C., Zien C.A., Afithile M., Welti R., Hildebrand D.F. and Wang X.** 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *arabidopsis*. *Plant Cell* 12(11):2237-2246.
- Wang D.Y., Xu Y.J., Li Q., Hao X.M., Cui K.M., Sun F.Z. and Zhu Y.X.** 2003. Transgenic expression of a putative calcium transporter affects the time of *Arabidopsis* flowering. *Plant J.* 33:285-292.
- Wang L., Liang S. and Lu Y.T.** 2001. Characterization, physical location and expression of the genes encoding calcium/calmodulin-dependent protein kinases in maize (*Zea mays* L.). *Planta.* 213(4):556-564.
- Wang X., Zafian P., Choudhary M. and Lawton M.** 1996. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defence proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(6):2598-2602.
- Wang X.** 2004. Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(3):329-336.
- Wang Y., Liang S., Xie Q.G. and Lu Y.T.** 2004. Characterization of a calmodulin-regulated  $Ca^{2+}$ -dependent-protein-kinase-related protein kinase, AtCRK1, from *Arabidopsis*. *Biochem J.* 383(1):73-81.
- Ward E.R., Uknes S.J., Williams S.C., Dincher S.S., Wiederhold D.L., Alexander D.C., Ahl-Goy P., Mettraux J.P. and Ryals J.A.** 1991. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 3(10):1085-1094.
- Ward H.M.** 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust. *Puccinia dispersa* (Erikss). *Ann. Bot.* 16:233-315.
- Ward J.M. and Schroeder J.I.** 1994. Calcium-activated  $K^+$  channels and calcium-induced calcium-release by slow vacuolar ion channels in guard-cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6:669-683.
- Ward J.M., Pei Z.-M. and Schroeder J.I.** 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *The Plant Cell* 7:833-844.
- Warren R.F., Henk A., Mowery P., Holub E. and Innes R.W.** 1998. A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene RPS5 partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 10(9):1439-1452.
- Watanabe N. and Lam E.** 2004. Recent advances in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol. Plant Pathology* 5:65-70.
- Watillon B., Kettman R., Boxus P. and Burny A.** 1993. A calcium/calmodulin-binding serine/threonine protein kinase homologous to the mammalian type II calcium/calmodulin protein kinase is expressed in plant cells. *Plant Physiol.* 101:1381-1384.
- Weber H., Chételat A., Caldelari D. and Farmer E.E.** 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11(3):485-494.
- Weckwerth W.** 2003. Metabolomics in systems biology. *Annu. Rev. of Plant Biol.* 54:669-689.
- Wegener C., Bartling S., Olsen O., Weber J. and vonWettstein D.** 1996. Pectate lyase in transgenic potatoes confers preactivation of defence against *Erwinia carotovora*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 49:359-376.
- Weinl S., Held K., Schlücking K., Steinhorst L., Kuhlert S., Hippler M. and Kudla J.** 2008. A plastid protein crucial for  $Ca^{2+}$ -regulated stomatal responses. *New Phytol.* 179(3):675-686.
- Weinl S. and Kudla J.** 2009. The CBL-CIPK  $Ca^{2+}$ -decoding signaling network: Function and perspectives. *New Phytol.* 184:517-528.



- Wendehenne D., Binet M.N., Blein J.P., Ricci P. and Pugin A.** 1995. Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett.* 374(2):203-207.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J.M., Barbier-Brygoo H. and Pugin A.** 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14:1937-1951.
- Wendehenne D., Durner J. and Klessig D.F.** 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4):449-455.
- Weng J.K., Li X., Sout J. and Chapple C.** 2008. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(22):7887-7892.
- Weng J.K., Akiyama T., Bonawitz N.D., Li X., Ralph J. and Chapple C.** 2010. Convergent Evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants. *Plant Cell* preview.
- Wengenmayer H., Ebel J. and Grisebach H.** 1976. Enzymic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of a cinnamoyl-CoA: NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *Eur. J. Biochem.* 65(2):529-536.
- Werner M., Uehlein N., Proksch P. and Kaldenhoff R.** 2001. Characterization of two tomato aquaporins and expression during the incompatible interaction of tomato with the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Planta* 213(4):550-555.
- Wheeler G.L. and Brownlee C.** 2008. Ca<sup>2+</sup> signalling in plants and green algae-changing channels. *Trends Plant Sci.* 13:506-514.
- White P.J., Bowen H.C., Demidchik V., Nichols C. and Davies J.M.** 2002 Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1564:299-309.
- White P.J. and Broadley M.R.** 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:487-511.
- Williams C.A. and Grayer R.J.** 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21(4):539-573.
- Willingham M.C. and Pastan I.** 1984. Endocytosis and exocytosis: current concepts of vesicle traffic in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 92:51-92.
- Winkel B.S.J.** 2004. Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:85-107.
- Winkel-Shirley B.** 2001a. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126(2):485-493.
- Winkel-Shirley B.** 2001b. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiol.* 127(4):1399-1404.
- Wymer C.L., Bibikova T.N. and Gilroy S.** 1997. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 12(2):427-439.

-- X --

- Xiang T., Zong N., Zou Y., Wu Y., Zhang J., Xing W., Li Y., Tang X., Zhu L., Chai J. and Zhou J.M.** 2008. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* 18(1):74-80.
- Xiao F., Goodwin S.M., Xiao Y., Sun Z., Baker D., Tang X., Jenks M.A. and Zhou J.M.** 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J.* 23(14):2903-2913.
- Xiong T.C., Jauneau A., Ranjeva R. and Mazars C.** 2004. Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *Plant J.* 40:12-21.
- Xiong T.C., Bourque S., Lecourieux D., Amelot N., Grat S., Brière C., Mazars C., Pugin A. and Rangeva R.** 2006. Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1763 :1209-1215.





**Xu J., Tian Y.S., Peng R.H., Xiong A.S., Zhu B., Jin X.F., Gao F., Fu X.Y., Hou X.L. and Yao Q.H.** 2010. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* 231(6):1251-1260.

-- Y --

**Yamaguchi Y., Pearce G. and Ryan C.A.** 2006. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:10104-10109.

**Yamanaka T., Nakagawa Y., Mori K., Nakano M., Imamura T., Kataoka H., Terashima A., Iida K., Kojima I., Katagiri T., Shinozaki K. and Lida H.** 2010. MCA1 and MCA2 That Mediate Ca<sup>2+</sup> Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 152:1284-1296.

**Yamauchi K., Yasuda S., Hamada K., Tsutsumi Y. and Fukushima K.** 2003. Multifunctional biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. *Planta* 216(3):496-501.

**Yang Y., Costa A., Leonhardt N., Siegel R.S. and Schroeder J.I.** 2008. Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4:6.

**Yoshioka H., Asai S., Yoshioka M. and Kobayashi M.** 2009. Molecular mechanisms of generation for nitric oxide and reactive oxygen species, and role of the radical burst in plant immunity. *Mol. Cells* 28(4):321-329.

**Yoshioka K., Moeder W., Kang H.G., Kachroo P., Masmoudi K., Berkowitz G., and Klessig D.F.** 2006. The chimeric *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell* 18:747-763.

**Young J.J., Mehta S., Israelsson M., Godoski J., Grill E. and Schroeder J.I.** 2006. CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:7506-7511.

**Yu C.K., Springob K., Schmidt J., Nicholson R.L., Chu I.K., Yip W.K. and Lo C.** 2005. A stilbene synthase gene (*SbSTS1*) is involved in host and nonhost defense responses in sorghum. *Plant Physiol.* 138(1):393-401.

**Yuasa K. and Maeshima M.** 2000. Purification, properties and molecular cloning of a novel Ca<sup>2+</sup> binding protein in radish vacuoles. *Plant Physiol.* 124:1069-1078.

**Yun M.S., Chen W., Deng F., Kiyokawa T., Mametsuka K. and Yogo Y.** 2006. An in vitro screening assay to discover novel inhibitors of 4-coumarate:CoA ligase. *Pest. Manag. Sci.* 62(11):1065-1071.

**Yun M.S., Chen W., Deng F. and Yogo Y.** 2007. Propanil and swep inhibit 4-coumarate:CoA ligase activity in vitro. *Pest. Manag. Sci.* 63(8):815-820.

-- Z --

**Zeier J., Delledonne M., Mishina T., Severi E., Sonoda M. and Lamb C.** 2004. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 136:2875-2886.

**Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X; and Zhou J.M.** 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1(3):175-185.

**Zhang L. and Lu Y.T.** 2003. Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci.* 8(3):123-127.

**Zhang S., Du H. and Klessig D.F.** 1998. Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10(3):435-450.



- Zhang S., Liu Y. and Klessig D.F.** 2000. Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J.* 23(3):339-347.
- Zhang W., Zhou R.G., Gao Y.J., Zheng S.Z., Xu P., Zhang S.Q. and Sun D.Y.** 2009. Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1773-1784.
- Zhao J., Barkla B.J., Marshall J., Pittman J.K. and Hirschi K.D.** 2008. The *Arabidopsis* *cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Planta* 227:659-669.
- Zhao J., Shigaki T., Mei H., Guo Y.Q., Cheng N.H. and Hirschi K.D.** 2009a. Interaction between *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers CAX1 and CAX3. *J. Biol. Chem.* 284:4605-4615.
- Zhao J., Connorton J.M., Guo Y., Li X., Shigaki T., Hirschi K.D. and Pittman J.K.** 2009b. Functional Studies of Split *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>Exchangers. *J. Biol. Chem.* 284(49):34075-34083.
- Zhu X., Caplan J., Mamillapalli P., Czymmek K. and Dinesh-Kumar S.P.** 2010. Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. *EMBO J.* 29:1007-1018.
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G. and Boller T.** 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428(6984):764-767.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D., Boller T. and Felix G.** 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125(4):749-760.
- Zobel A.M.** 1997. Coumarins in fruits and vegetables. In *Phytochemistry of Fruits and Vegetables* (Tomas-Barberan, F.A.A. and Robins, R.J., eds). Oxford: Clarendon Press :173-203.
- Zou J. and Taylor D.C.** 1994. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologous to parsley S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *Plant Physiol. Biochem.* 32:423-427.



## **TITRE**

Couplage entre signalisation calcique et modulation du transcriptome en réponse à la cryptogéine chez des cellules de tabac.

## **RESUME**

Les plantes utilisent des voies de signalisation calciques pour transcrire des stimuli en réponses adaptatives. Cependant, le couplage entre signalisation calcique, régulation transcriptionnelle et processus biochimiques reste méconnu. Dans ce contexte, mon travail visait à étudier chez le tabac la modulation calcium-dépendante du métabolisme des phénylpropanoïdes en réponse à la cryptogéine. L'activation de ce métabolisme conduit à l'accumulation pariétale d'acide hydroxycinnamiques. La régulation transcriptionnelle des gènes impliqués est non-linéairement corrélée avec les composantes du signal calcique, suggérant un modèle de contrôle de la transcription *via* l'action coordonnée de deux modules de décodage calcique. Par ailleurs, une étude microarray a révélé que 10% du transcriptome de tabac était modulé par la cryptogéine, les gènes identifiés constituant de bons candidats pour l'amélioration génétique des défenses des plantes.

## **TITLE**

Coupling between calcium signalling and transcriptome modulation in response to cryptogein in tobacco BY-2 cells.

## **ABSTRACT**

Plants use calcium-based signalling to transduce stimuli into adaptative responses. However, little is known about the coupling between calcium signalling, transcriptional regulation and biochemical processes. In this context, my work aimed at studying the calcium-dependent modulation of the phenylpropanoid metabolism in response to cryptogein perception in tobacco cells. The induction of this metabolism led to parietal accumulation of hydroxycinnamic acids. The transcriptional regulation of the implicated genes is non-linearly correlated with components of the calcium signal, suggesting a model of coupling exerting control of transcription through the coordinated action of two calcium decoding modules. Furthermore, a microarray study revealed that 10% of the tobacco transcriptome was modulated by cryptogein perception; the genes identified being good candidates for genetic improvement of plant defenses.



**AUTEUR :** Nicolas Amelot.

**TITRE :** Couplage entre signalisation calcique et modulation du transcriptome en réponse à la cryptogéine chez des cellules de tabac.

**DIRECTEUR DE THESE :** Jacqueline Grima-PETTENATI et Christian BRIERE.

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** 7 Octobre 2010, Salle de Conférence IFR 40.

---

## **RESUME**

Les plantes utilisent des voies de signalisation calciques pour transcrire des stimuli en réponses adaptatives. Cependant, le couplage entre signalisation calcique, régulation transcriptionnelle et processus biochimiques reste méconnu. Dans ce contexte, mon travail visait à étudier chez le tabac la modulation calcium-dépendante du métabolisme des phénylpropanoïdes en réponse à la cryptogéine. L'activation de ce métabolisme conduit à l'accumulation pariétale d'acide hydroxycinnamiques. La régulation transcriptionnelle des gènes impliqués est non-linéairement corrélée avec les composantes du signal calcique, suggérant un modèle de contrôle de la transcription *via* l'action coordonnée de deux modules de décodage calcique. Par ailleurs, une étude microarray a révélé que 10% du transcriptome de tabac était modulé par la cryptogéine, les gènes identifiés constituant de bons candidats pour l'amélioration génétique des défenses des plantes.

---

## **MOTS-CLES :**

Cryptogéine, phénylpropanoïdes, calcium, régulation transcriptionnelle, *Nicotiana tabacum*, modélisation, transcriptomique.

---

## **DISCIPLINE ADMINISTRATIVE:**

Biosciences végétales.

---

## **INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE:**

UMR5546 CNRS-UPS, Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux, Pôle de Biotechnologies Végétales, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan.