



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III – Paul Sabatier*

Discipline : Biosciences végétales

Présentée et soutenue par **Solène FROIDURE**

Le 8 Juillet 2010

Identification et caractérisation d'interacteurs d'AtMYB30, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*.

JURY

Pascal GENSCHIK, Directeur de recherches, IBMP, Strasbourg, Rapporteur

Dao-Xiu ZHOU, Professeur de l'Université Paris XI, IBP, Paris, Rapporteur

Thierry HEITZ, Chargé de recherches, IBMP, Strasbourg, Examineur

Harald KELLER, Directeur de recherches, IBSV, Sophia-Antipolis, Examineur

Rafaël PONT-LEZICA, Professeur de l'Université Paul Sabatier, SCSV, Toulouse, Examineur

Dominique ROBY, Directeur de recherches, LIPM, Toulouse, Directeur de thèse

Susana RIVAS, Chargée de recherches, LIPM, Toulouse, Directeur de thèse

Ecole doctorale : SEVAB

Unité de recherche : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM),
UMR CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde Rouge, BP52627, Castanet-Tolosan
Cedex, France.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Les questions et remarques qu'ils ont formulées au cours de ma soutenance donneront certainement des idées pour la poursuite de ces travaux de recherche après mon départ du labo.

Je souhaite ensuite remercier Dominique pour m'avoir accueillie dans son équipe pour mon stage de M2, et pour avoir co-encadré ma thèse. Tu as su me conseiller et être présente quand il y en avait besoin.

Mes remerciements se tournent naturellement vers ma deuxième directrice de thèse, Susana. Ton encadrement a été irréprochable : tu as su être toujours disponible quand j'en avais besoin, tout en me laissant de l'autonomie et une certaine liberté de décision. Tu m'as appris énormément de choses et ton côté perfectionniste m'a toujours tirée vers le haut.

Je garderai en mémoire nos manips protéomique avec la tonne de bouillie de bentha, la paillasse congelée par l'azote liquide, la blouse toute verte et le tampon d'extraction très « girly »... !

Je retiendrai aussi nos discussions scientifiques, et celles plus personnelles qui nous ont permis de partager nos joies et nos peines tout au long de ces 4 années.

Un grand merci à toute l'équipe !!!

Les membres passés : Amandine (ma compagne de galère en stage et en thèse !), Noëllie, Laure, Maurice, CAT, Olivier, Ilona... Et les actuels : JoJo le Mérou, Dani, Mickaël, Mehdi, Carine, Renier, Anne et Claudine. J'ai passé de très bon moments au labo avec vous tous. J'ai beaucoup appris sur les relations humaines à vos côtés dans ce si petit espace... ! Je pars avec la nostalgie de la bonne ambiance qui règne actuellement dans ce bureau... Je vous souhaite bon courage au labo et bon vent pour la suite.

Je souhaite également remercier la plate-forme d'imagerie, et en particulier Alain, pour ta rigueur scientifique, ta bonne humeur et ton optimisme à toute épreuve. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, tu étais toujours prêt à rendre service et tu as su me redonner espoir quand plus rien ne marchait.

Merci à tous les profs que j'ai eu l'occasion de croiser lors de mes enseignements à la fac. Merci à Colette pour le thé et les petits biscuits quand il gelait (au sens propre du terme !) dans les salles de TP. Merci aussi à Céline T. pour les séances de papotage et de rigolade en lisant les copies de nos élèves...

Un grand merci aux filles des « soirées filles », anciennes (Alice T., Marie, Alice B.) et actuelles (Céline R., Lisa, Sandra et Céline T.). Nos discussions m'ont permis de relativiser et de me sentir moins seule quand le moral n'était pas au beau fixe. Je compte sur vous pour me tenir au courant des potins du labo, même après mon départ... !

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont toujours soutenue pendant ces 4 années, en particulier dans mes périodes de doute, vers la fin. Merci à Clémentine, la mieux placée pour comprendre tout ça, et à Célia, pour son éternelle bonne humeur lors de nos déjeuners hebdomadaires à Labège.

Enfin, j'adresse un énorme « MERCI » à ma famille qui m'a toujours soutenue sans vraiment comprendre en quoi consistait ma thèse, et ce que je pouvais bien faire sur ces malheureuses petites plantes ! Je remercie mes parents pour leur présence, leur aide et leur intérêt pour ma soutenance.

Je tiens à remercier Xavier, mon mari (eh oui !), pour avoir essayé de comprendre ce que je faisais au labo. Je te revois le WE en train d'écrire des numéros sur des tubes ou de faire des points sur des plantes... tout en te demandant comment on pouvait faire un métier pareil ! Merci pour ta patience et ta compréhension, tu ne m'as jamais reproché de travailler le WE ou de te laisser partir en vacances tout seul pour cause de manip urgentes... Tu as été un soutien psychologique inestimable et je ne sais pas où j'en serai aujourd'hui si tu n'avais pas été là.

Pour ne pas perdre les bonnes habitudes, une petite larme a été versée avec ces remerciements... !

Table des matières

Introduction	9
I. La résistance spécifique des plantes face aux agents pathogènes	10
I.1 Concepts généraux sur la résistance spécifique	10
I.1.1 Coévolution des deux adversaires : le modèle Zig-Zag	10
I.1.2 La reconnaissance des PAMPs par la plante.....	11
I.1.3 Les effecteurs des bactéries phytopathogènes.....	12
I.1.4 Les protéines de résistance végétales.....	13
I.1.5 Modes de reconnaissance du couple R/Avr.....	14
I.2 Transduction du signal initié par la reconnaissance spécifique	15
I.2.1 Rôle des petites molécules signal dans les étapes précoces de signalisation	16
I.2.1.1 Flux ioniques au travers de la membrane plasmique	16
I.2.1.2 Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS).	17
I.2.1.3 Le monoxyde d'azote (Nitric Oxyde, NO)	18
I.2.2 Cascades de phosphorylation/déphosphorylation et transmission du signal	19
I.2.3 Loci impliqués dans la signalisation précoce	20
I.2.4 Le contrôle hormonal de la défense.....	21
I.2.4.1 Voies de signalisation dépendantes de l'acide salicylique	22
I.2.4.2 Voies de signalisation dépendantes de l'acide jasmonique	23
I.2.4.3 Voies de signalisation dépendantes de l'éthylène	24
I.2.4.4 Voies de signalisation dépendantes des gibbérellines	25
I.2.4.5 Voies de signalisation dépendantes de l'auxine.....	25
I.2.4.6 Voies de signalisation dépendantes de l'acide abscissique	26
I.2.4.7 Voies de signalisation dépendantes des brassinostéroïdes	27
I.2.4.8 Interactions entre les voies de signalisation hormonales	28
I.3 La HR : un suicide cellulaire programmé	29
I.3.1. La HR est sous le contrôle d'un programme génétique	30
I.3.2. Régulateurs putatifs du contrôle de la HR	30
I.3.2.1 Approches par analogie avec la mort cellulaire programmée chez les animaux	30
I.3.2.2 Approches moléculaires.....	32
I.3.2.3 Approches génétiques	33
II. Régulation transcriptionnelle de la mise en place de la défense	35
II.1 Rôle des facteurs de transcription de type WRKY dans la réponse aux agents pathogènes	35
II.1.1 WRKY impliqués dans les réponses de défense et régulation de leur activité	35
II.1.1.1 WRKY régulateurs des réponses de défense	35
II.1.1.2 Régulation de l'activité des WRKY impliqués dans les réponses de défense	36
II.1.2 Le réseau WRKY : une régulation complexe des réponses de défense.	37
II.2 La famille TGA et son rôle dans l'établissement de la résistance	38

II.3 Les cascades d'activation de facteurs de transcription permettant la réponse à l'ET.....	39
II.4 Les facteurs de transcription de type MYB	40
II.4.1 Caractéristiques et classification des MYB chez les plantes	40
II.4.2 Les MYB végétaux : des FT multifonctions	41
II.4.2.1 Séquences cibles et fixation à l'ADN	41
II.4.2.2 Rôles biologiques des facteurs MYB	42
III. Régulation de l'activité des facteurs de transcription MYB.....	43
III.1 Les interactions protéine-protéine impliquant des FT MYB.....	43
III.2 Les modifications moléculaires régulent l'activité des FT MYB.....	44
III.2.1 La phosphorylation peut réguler l'affinité des MYB pour l'ADN	45
III.2.2 La SUMOylation régule l'activité des FT MYB.....	45
III.2.3 L'ubiquitination peut provoquer la dégradation des FT MYB	46
IV. Résultats antérieurs et projet de thèse.....	48
IV.1 AtMYB30, un régulateur positif de l'initiation de la HR	48
IV.1.1 Identification d'AtMYB30	48
IV.1.2 Profil d'expression et étude de la fonction d'AtMYB30 par transgénèse ..	48
IV.1.2.1 AtMYB30 est impliqué dans l'initiation de la HR	48
IV.1.2.2 AtMYB30 est un régulateur positif de la HR.....	49
IV.1.3 Les cibles d'AtMYB30 au cours de la HR appartiennent au métabolisme des lipides.....	49
IV.1.4 AtMYB30 est impliqué dans la régulation de processus développementaux	51
IV.1.5 Recherche des partenaires protéiques d'AtMYB30.....	52
IV.2 Projet de thèse	52
Résultats	54
I. AtsPLA2-α régule négativement la HR et la défense via son interaction avec AtMYB30.....	55
I.1 Introduction	55
I.2 Article soumis (PNAS)	55
II. MIP1, une E3 ligase putative qui interagit avec AtMYB30 et régule négativement la défense	76
II.1 Introduction	76
II.2 Projet d'article	76
II.3 Données complémentaires	100
II.3.1 AtMYB30 serait dégradé par le protéasome 26S <i>in vitro</i>	100
II.3.2 AtMYB30 serait dégradé par le protéasome 26S <i>in vivo</i>	100
II.4 Conclusion, discussion et perspectives.....	101
II.4.1 Quel rôle pour MIP1 dans le contrôle de la résistance ?	101
II.4.2 Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre MIP1 et MIP1-L ?.....	103
II.4.3 AtMYB30, une cible d'ubiquitination ?.....	103

III. Recherche sans a priori des interacteurs d'AtMYB30 par une approche protéomique	105
III.1 Objectif global.....	105
III.2 Recherche des conditions optimales de production d'AtMYB30 purifiée	105
III.2.1 Expression stable d' <i>AtMYB30</i> chez <i>Arabidopsis</i>	105
III.2.1.1 Introduction.....	105
III.2.1.2 Article sous presse (Plant Physiol. Biotech.)	106
III.2.1.3 Conclusion.....	115
III.2.2 Expression transitoire d' <i>AtMYB30</i> chez <i>N. benthamiana</i>	115
III.3 Identification des interacteurs d'AtMYB30.....	116
III.4 Conclusions, Discussion et Perspectives.....	117
III.4.1 Fonctions biologiques des partenaires putatifs identifiés	117
III.4.1.1 Protéines impliquées dans des processus cellulaires	117
III.4.1.2 Protéines impliquées dans le contrôle de la résistance	118
III.4.1.2.1 BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase)	118
III.4.1.2.2 SOBER1 (Suppressor Of avrBst-Elicited Resistance).....	119
III.4.2 Avantages et inconvénients de cette approche, Perspectives.....	120
IV. Résultats complémentaires : étude de l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96	123
IV.1 Contexte scientifique et objectif global.....	123
IV.2 AtMYB96 et AtMYB30 sont co-localisés dans le noyau des cellules végétales	124
IV.3 AtMYB96 et AtMYB30 interagissent in planta	124
IV.4 Conclusion et perspectives.....	125
Discussion générale et Perspectives	127
I. AtMYB30 : membre d'un réseau protéique complexe ?.....	128
I.1 Effet des différents interacteurs d'AtMYB30 sur sa fonction	128
I.2 La mise en place de complexes multi-protéiques contenant AtMYB30.....	129
I.3 AtMYB30 et l'importance du trafic cellulaire pour l'interaction avec ses partenaires protéiques	130
I.4 Conclusion et perspectives.....	131
II. AtMYB30 : un facteur de transcription multi-modifié ?	132
II.1 AtMYB30 : une cible de phosphorylation ?	132
II.2 AtMYB30 : une cible de SUMOlation ?.....	133
II.3 AtMYB30 : une cible d'ubiquitination ?.....	134
II.4 Conclusion et perspectives	136
III. AtMYB30 : un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux processus biologiques ?.....	137
III.1 AtMYB30 impliqué dans la régulation de la défense	137
III.2 AtMYB30 impliqué dans la régulation de processus développementaux	139
III.3 L'existence de protéines communes pour la régulation de la défense et d'autres processus biologiques.....	140

Matériel et Méthodes	142
Références	147

Liste des abréviations

ABA : Acide abscissique	A
ACRE : Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited	
AIA : Auxine	
<i>Athsr</i> : Arabidopsis thaliana hypersensitivity-related	
BAK1 : BRI1-Associated Receptor Kinase	B
BI-1 : Bax-Inhibitor 1	
BKK1 : BAK1-LIKE 1	
BR : Brassinostéroïdes	
BRI1 : Brassinosteroid insensitive 1	
CDPK : Calcium-dependent protein kinase	C
CNGC : Cyclic Nucleotide-Gated Channel	
DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns	D
DR : Death Receptor	
EAR : ERF-associated Amphiphilic Repression	E
EDS1 : Enhanced Disease Susceptibility	
EIN3 : Ethylene Insensitive 3	
ERF : Ethylene Response Factors	
ET : Ethylène	
ETI : Effector-Triggered Immunity	
ETS : Effector-triggered susceptibility	
FT : Facteur de transcription	F
FLIM : Fluorescence Lifetime Imaging	
FLS2 : Flagellin Sensing 2	
FRET : Förster Resonance Energy Transfer	
GA : Gibbérellines	G
HECT : Homologous to E6-associated protein C-terminus	
HLM1 : HR-like lesion mimic 1	H
Hpi : Heures post-inoculation	
HR : Hypersensitive Response	
<i>hrp</i> : Hypersensitive Response and Pathogenicity	
iNOS : Pathogen-inducible NOS	
JA : Jasmonic acid	I
LMM : Lesion Mimic Mutant	J
LOX : Lipoxygénase	
	L

LRR : Leucine Rich Repeat
LRR-RLK : Leucine-rich repeat receptor-like kinase
LSD1 : Lesion simulating disease resistance response 1

M

MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase
MIP1 : AtMYB30-Interacting Protein 1
MIP1-L : MIP1- Like
MPT : Modification post-traductionnelle

N

Nano LC-MS/MS : Nano Liquid Chromatography associated to Mass Spectrometry
NBS : Nucleotide Binding Site
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Nitric oxyde synthase
NPR1 : Nonexpresser of PR1
NR : Nitrate réductase

P

PAD4 : PhytoAlexin Deficient
PAL : Phénylalanine ammonia-lyase
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
PR : Pathogenesis Related
PRR : Pattern Recognition Receptor
Pst : *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
PTI : PAMP-triggered immunity
PTM : Post-translational modification
PUB : Plant U-box
PVX : Potato Virus X

R

Ran : Ras-related nuclear
Rboh : Respiratory burst oxydase homolog
RE : Réticulum endoplasmique
RIN4 : Rpm1 Interactor 4
RING : Really Interesting New Gene
RLK : Receptor Like Kinase
RLP : Receptor Like Protein
ROS : Reactive Oxygen Species
RPM1 : Résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1
RPS2 : Résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 2

S

SA : Acide salicylique
SAG101 : Senescence Associated Gene
SAR : Systemic Acquired Resistance
SCF : Skp1, Cullin, F-box-type ligase
SGN : Solanaceae Genome Network
SGT1 : Suppressor of G2 allele of SKP1
siARN : Short interfering ARN
SID2 : Isochorismate synthase
SIPK : Salicylic-induced protein kinase
SOBER1 : Suppressor Of avrBst-Elicited Resistance 1
SOD : Superoxyde dismutase
SUMO : Small Ubiquitin-related Modifier

TAD : Transactivation domain
TLR5 : Toll Like Recepteur 5
TMV : Tobacco mosaic virus
ToMV : Tomato mosaic virus
TTSS : Type Three Secretion System

Ub : Ubiquitine
UPS : Ubiquitin/proteasome system

VLCFA : Very Long Chain Fatty Acid
VPE : Vacuolar Procession Enzyme

Xcc : *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Y2H : yeast two-hybrid
YFPv : YFPvenus

T

U

V

X

Y

Introduction

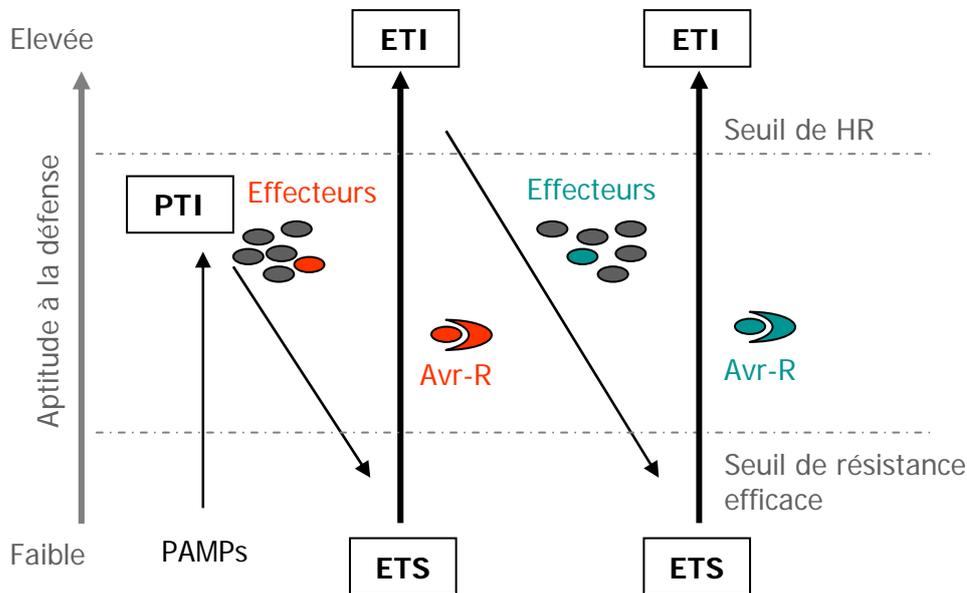


Figure 1. Le modèle zig-zag (d'après Jones and Dangl, 2006).

Phase 1 : Les plantes détectent les PAMPs microbiens *via* des récepteurs membranaires et mettent en place la résistance basale (**PTI**, PAMP-Triggered Immunity).

Phase 2 : Des agents pathogènes évoluent pour libérer des effecteurs qui vont interférer avec la résistance basale et favoriser le développement de l'agent pathogène, résultant en une sensibilité de la plante (**ETS**, Effector-Triggered Susceptibility).

Phase 3 : Un effecteur (en rouge) est reconnu par une protéine R végétale qui déclenche la résistance spécifique (**ETI**, Effector-Triggered Immunity), souvent accompagnée de HR.

Phase 4 : Les pathogènes ayant perdu l'effecteur rouge, et éventuellement gagné d'autres effecteurs (en bleu), au cours de l'évolution, sont sélectionnés.

Phase 5 : De nouveaux allèles de gènes *R*, capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, apparaissent au cours de l'évolution et permettent la mise en place de la résistance spécifique.

I. La résistance spécifique des plantes face aux agents pathogènes

Lorsqu'une plante est en contact avec un agent pathogène, un **dialogue moléculaire** s'établit entre les deux protagonistes. L'issue de ce dialogue va déterminer le type de relation qui va s'établir entre la plante et l'agent pathogène : sensibilité, tolérance ou résistance.

Dans le cas d'une relation dite **compatible** entre la plante et le pathogène, dit **virulent**, ce dernier se multiplie de façon active dans la plante. La plante réagit alors plus ou moins efficacement à cette agression et la quantité de symptômes est variable. Si la plante garde la capacité de se développer avec un rendement correct, on dit qu'elle est tolérante. Dans le cas contraire, la plante développe une maladie qui va altérer son développement, et elle est alors dite sensible. Des mécanismes de défense sont mis en jeu mais de manière trop lente ou trop faible pour que la plante puisse résister. Cet ensemble de réponses, induites par un agent pathogène virulent est appelé **résistance basale**.

Lorsqu'une **reconnaissance spécifique** s'établit entre la plante et l'agent pathogène, dit **avirulent**, l'interaction est dite **incompatible** et la plante est résistante. Cette résistance est fréquemment associée à la mise en place d'une réaction particulière, appelée réponse hypersensible (HR), qui se traduit par des lésions nécrotiques situées au niveau des points d'entrée du pathogène dans la plante. Dans le cas d'une plante résistante, deux cas de figure peuvent se présenter :

- Si toutes les variétés d'une même espèce végétale sont résistantes à toutes les races d'un même agent pathogène : on parle de **résistance non-hôte**.
- Si une variété donnée d'une espèce végétale est résistante à un isolat donné de l'agent pathogène : on parle de **résistance spécifique**.

I.1 Concepts généraux sur la résistance spécifique

I.1.1 Coévolution des deux adversaires : le modèle Zig-Zag

L'interaction entre les plantes et les agents pathogènes peut être assimilée à une course aux armements où chacun des deux protagonistes est amené à évoluer pour vaincre l'autre. Le modèle Zig-Zag, représente de manière schématique l'évolution simultanée des protéines végétales et des protéines bactériennes, au cours du temps, ainsi que leurs conséquences pour la plante : résistance ou maladie (Jones and Dangl, 2006) (Figure 1). Les plantes peuvent détecter des motifs conservés chez les agents pathogènes (appelés PAMPs) *via* les récepteurs membranaires, et mettre en place la **résistance basale** (PTI, PAMP-Triggered Immunity). Afin de contourner cette résistance basale, des agents pathogènes ont évolué pour libérer des effecteurs qui vont interférer avec la résistance basale et favoriser le développement de l'agent pathogène, résultant en une **sensibilité** de la plante (ETS, Effector-Triggered Susceptibility). La plante développe alors à son tour, une protéine de résistance (R) qui reconnaît l'un de ces effecteurs et qui déclenche la **résistance spécifique**, souvent accompagnée d'une HR (ETI, Effector-Triggered Immunity). Enfin, au cours de l'évolution, les pathogènes modifient l'effecteur reconnu par la plante et gagnent éventuellement d'autres effecteurs afin de contourner la surveillance mise en place par la

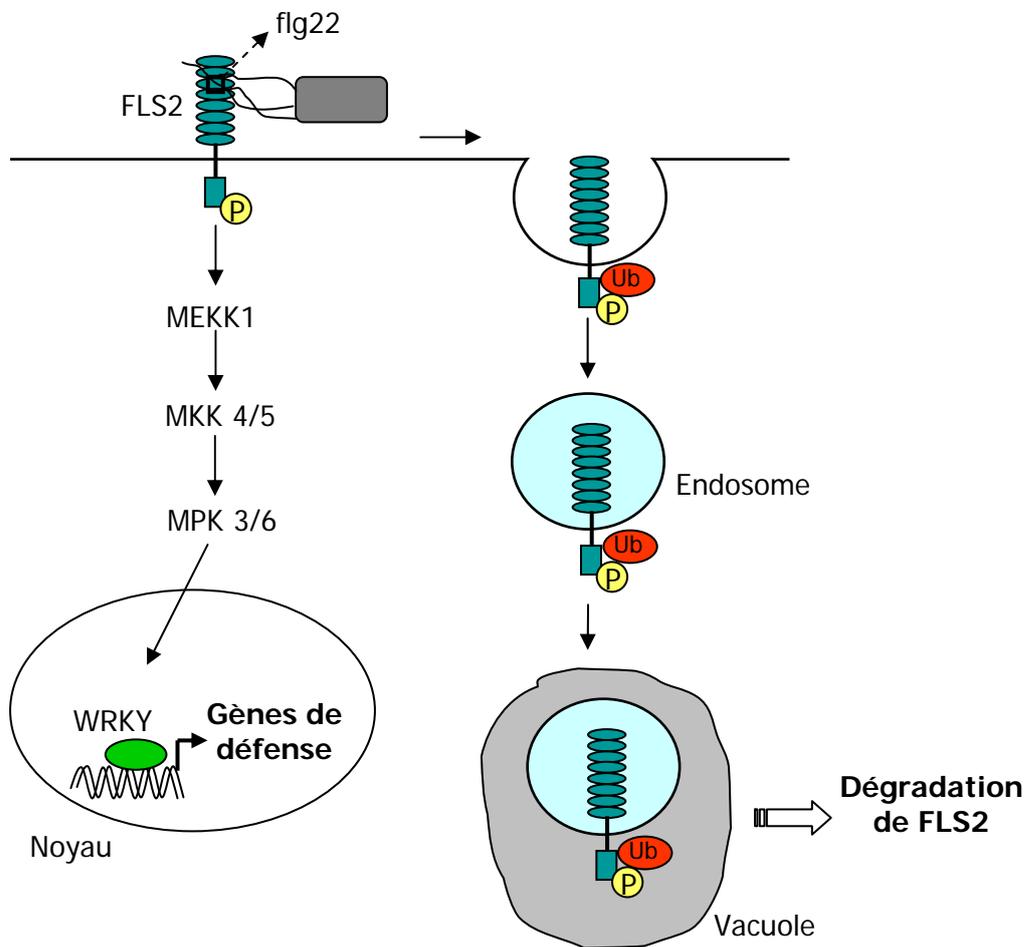


Figure 2 : Modèle d'internalisation de FLS2 après reconnaissance du peptide flg22 de la flagelline (d'après Robatzek et al., 2006).

La reconnaissance du peptide flg22 par FLS2 induit une cascade de MAP kinases qui transmet le signal jusqu'au noyau où des facteurs de transcription de type WRKY vont activer les gènes de défense. En parallèle, FLS2 est internalisé dans des endosomes puis dirigé vers la vacuole pour dégradation. L'endocytose de FLS2 nécessite sa phosphorylation et son ubiquitination.

plante. Chez la plante, la sélection favorise de nouveaux allèles de gènes *R*, capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, résultant en une résistance spécifique. Toutes ces étapes seront décrites avec précision dans la suite du chapitre I.1.

I.1.2 La reconnaissance des PAMPs par la plante

La plante peut reconnaître différents types de molécules composant l'agent pathogène ou découlant de son attaque. Ces différents types de reconnaissance vont aboutir à la mise en place d'une résistance plus ou moins efficace.

Dans le cas de la résistance basale et de la résistance non-hôte, la plante peut reconnaître des motifs moléculaires appelés **PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Zipfel and Felix, 2005). Ces éliciteurs généraux sont des molécules indispensables à la vie de l'agent pathogène et sont par conséquent des molécules très conservées. De nombreux PAMPs ont été isolés à partir de bactéries, champignons ou oomycètes, comme les lipopolysaccharides (Dow et al., 2000; Zeidler et al., 2004), la flagelline (Felix et al., 1999) et le facteur d'élongation Ef-Tu (Kunze et al., 2004).

Un des exemples les plus étudiés concerne la reconnaissance de la **flagelline**, constituant principal du flagelle bactérien. Chez les animaux, un récepteur TLR5 (Toll Like Recepteur 5) est capable de se lier directement à la flagelline (Smith et al., 2003). Chez *Arabidopsis*, la perception se fait *via* FLS2 (Flagellin Sensing 2), un récepteur PRR (Pattern Recognition Receptor) dont la structure est homologue à celle de TLR5 (Gomez-Gomez and Boller, 2000). FLS2 présente les caractéristiques d'un récepteur-kinase : domaine LRR extracellulaire potentiellement impliqué dans les interactions protéine-protéine, domaine transmembranaire et domaine Ser/Thr kinase cytoplasmique. FLS2 interagit directement avec un peptide de 22 acides aminés (flg22) situé dans la partie N-terminale de la flagelline, ce qui provoque son activation (Chinchilla et al., 2006). L'activation de FLS2 induit alors la production d'espèces réactives de l'oxygène, le déclenchement de cascades d'activation de MAP kinases ou encore l'activation de gènes de défense (Asai et al., 2002; Zipfel et al., 2004) (Figure 2). Ce système de reconnaissance, qui induit des réponses rapides, est nécessairement soumis à un rétro-contrôle négatif. Avant tout contact avec la flagelline, FLS2 est localisé sur la membrane plasmique. L'interaction entre flg22 et FLS2 induit l'internalisation du couple FLS2/flg22 puis la dégradation ciblée de FLS2 par le protéasome (Robatzek et al., 2006) (Figure 2). De façon intéressante, le mutant *fls2*, incapable de reconnaître la flagelline, présente une résistance diminuée à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, pour laquelle *Arabidopsis* n'est pas hôte, montrant l'importance de cette perception pour la mise en place de la résistance non-hôte (Li et al., 2005).

De nombreux agents pathogènes produisent des enzymes lytiques visant à dégrader les barrières physiques (paroi et membrane) des végétaux. Il a été découvert récemment que les produits de ces enzymes peuvent servir d'éliciteurs endogènes et ont été appelés **DAMPs** (Damage-Associated Molecular Patterns) (Boller and He, 2009). Ces DAMPs sont fréquemment rencontrés dans l'apoplasme et peuvent être des fragments de paroi, des monomères de cutine ou des peptides. Ils servent de signal d'alarme pour la plante, qui peut alors déclencher ses mécanismes de défense.

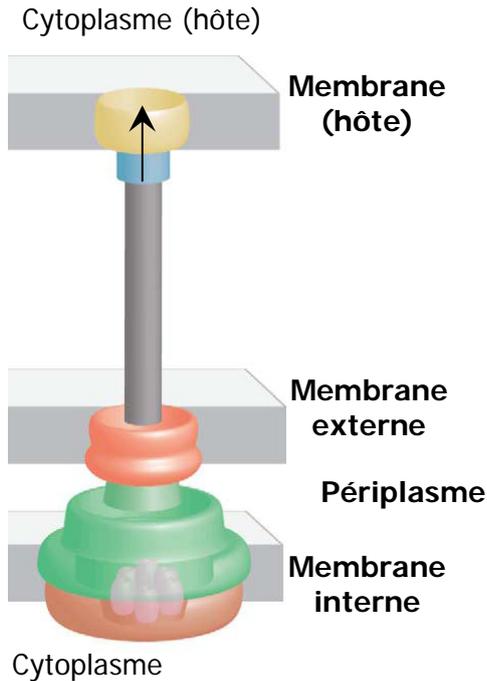


Figure 3 : Structure de l'appareil de sécrétion de type III (Yip and Strynadka, 2006).

L'appareil de sécrétion de type III est composé de deux complexes protéiques qui adoptent une structure en anneau, l'un dans la membrane interne (vert et marron) et l'autre dans la membrane externe de la bactérie (rouge), d'une ATPase (rose) associée à la membrane interne et d'une structure hélicale extracellulaire (gris). La translocation de protéines bactériennes dans la cellule hôte nécessite une extension de la seringue (en bleu) et un pore de translocation (en jaune) situés au niveau de la membrane cible.

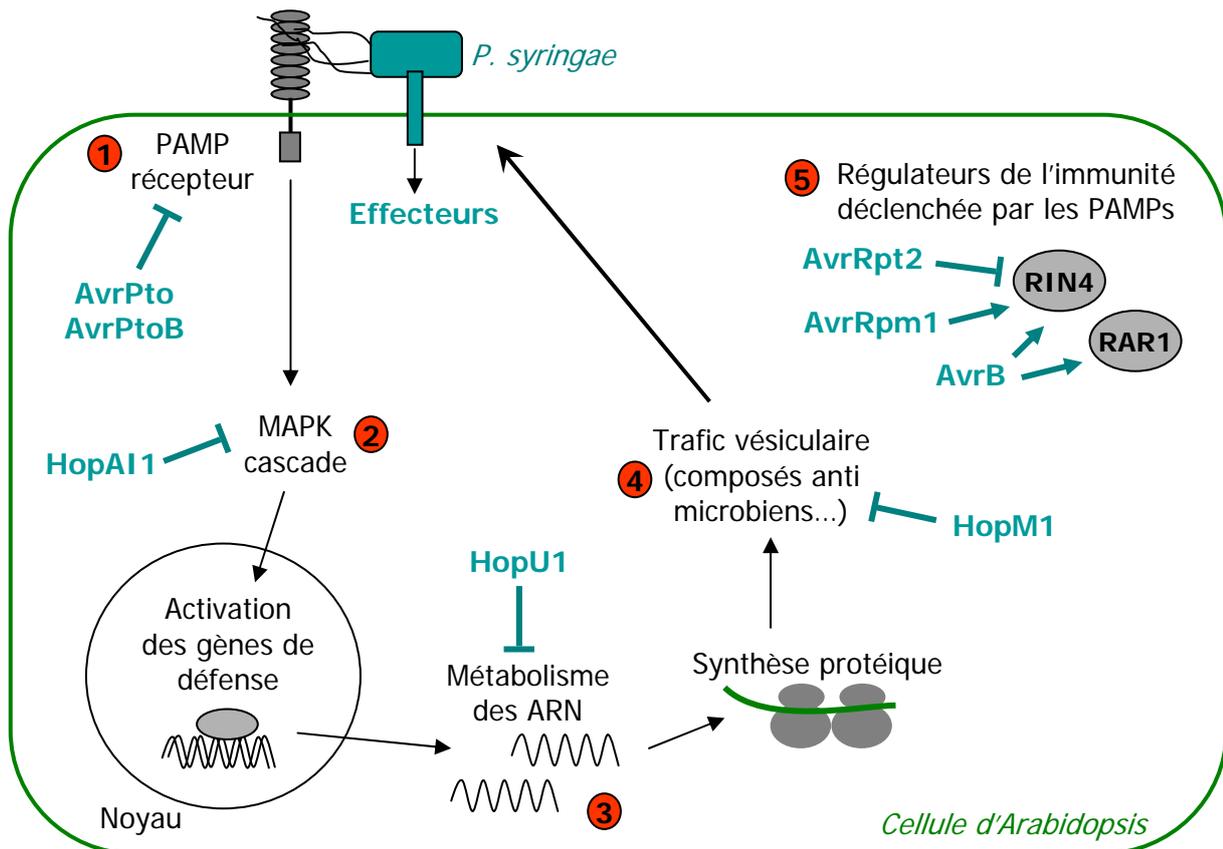


Figure 4 : Evènements de signalisation ciblés par des effecteurs de *P. syringae* (d'après Boller and He, 2009).

Les numéros entourés en rouge indiquent des évènements de signalisation qui peuvent être ciblés par les effecteurs de *P. syringae* (indiqués en bleu) : (1) perception des PAMPs, (2) cascade de MAPK, (3) métabolisme des ARN, (4) trafic vésiculaire, (5) régulation de l'immunité déclenchée par les PAMPs.

La reconnaissance des PAMPs, ou des DAMPs, par la plante aboutit donc à une résistance appelée **PTI (PAMP-Triggered Immunity)** (Figure 1). Celle-ci peut être contournée par les bactéries phytopathogènes *via* l'injection d'effecteurs dans la cellule de la plante hôte.

I.1.3 Les effecteurs des bactéries phytopathogènes

Pour coloniser une plante, les bactéries ont évolué pour contourner les mécanismes de résistance de celle-ci en supprimant les défenses de type PTI. Pour cela, les bactéries disposent d'effecteurs essentiels à leur pouvoir pathogène.

Le **système de sécrétion de type III** (Type Three Secretion System, TTSS) est le plus fréquemment employé par les bactéries phytopathogènes pour l'injection d'effecteurs (Buttner and Bonas, 2002; Alfano and Collmer, 2004; He et al., 2004; Yip and Strynadka, 2006). Il s'agit d'un complexe multiprotéique assemblé sous la forme d'une « seringue » transmembranaire, qui permet l'injection de protéines bactériennes, appelés effecteurs de type III, directement à l'intérieur de la cellule de l'hôte (Figure 3). Les protéines de ce complexe sont codées par des gènes regroupés en un cluster dans le génome de la bactérie. Celui-ci est appelé cluster *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), car des mutants affectés dans ces gènes (mutants *hrp*), ne sont plus capables ni de déclencher une HR chez les plantes hôtes, ni d'induire la maladie chez les plantes sensibles à la souche sauvage. Le TTSS et les protéines injectées sont donc essentiels pour la multiplication de la bactérie dans les tissus végétaux et le développement de la maladie (Bender et al., 1999; Kjemtrup et al., 2000; Buttner and Bonas, 2002).

Un grand nombre d'effecteurs bactériens a été identifié pour différentes bactéries phytopathogènes, et l'analyse de leur fonction moléculaire a permis de mieux comprendre les bases de la virulence bactérienne (Innes, 2003; Mudgett, 2005; Buttner and Bonas, 2006). Deux grands rôles peuvent être attribués à ces effecteurs : participer à la libération de nutriments favorisant le développement de l'agent pathogène, ou interférer avec le métabolisme de la plante pour inhiber ses mécanismes de défense (Abramovitch and Martin, 2004; Truman et al., 2006). Afin d'assurer un bon développement de l'agent pathogène dans la plante hôte, les effecteurs bactériens ciblent fréquemment des protéines végétales impliquées dans les voies de transduction du signal menant à la résistance. La figure 4 montre un exemple de différents événements de signalisation se déroulant dans la plante hôte et étant ciblés par certains effecteurs de *Pseudomonas syringae* (Boller and He, 2009). Ces événements de signalisation seront détaillés dans la suite de ce chapitre. **L'activité biochimique des effecteurs bactériens** a été largement étudiée ces dix dernières années et voici les principales fonctions connues à ce jour : les protéases, les inhibiteurs de protéases, les protéines impliquées dans l'ubiquitination ou la phosphorylation, les protéines manipulatrices de l'expression génique. Plusieurs exemples sont présentés dans le tableau 1.

L'injection d'effecteurs permet donc aux bactéries de contourner les défenses de la plante, celle-ci devient sensible, et on parle alors d'**ETS (Effector-Triggered Susceptibility)** (Figure 1). Les plantes ont alors développé des protéines de résistance leur permettant de détecter ces effecteurs et de contourner les attaques de l'agent pathogène.

Tableau 1. Exemples d'effecteurs de bactéries phytopathogènes possédant une activité biochimique démontrée ou putative.

Effecteur	Organisme	Activité biochimique	Référence
Protéases			
AvrRpt2	<i>P. syringae</i>	Protéase à cystéine	Mackey et al., 2003
AvrPphB	<i>P. syringae</i>	Protéase à cystéine	Shao et al., 2003
XopD	<i>X. campestris</i>	SUMO protéase	Hotson et al., 2003
Inhibiteurs de protéases			
Avr2	<i>C. fulvum</i>	Cystatin-like inhibitor	Rooney et al., 2005
EPI	<i>Phytophthora spp</i>	Kazal like inhibitor	Tian et al., 2004
Processus d'ubiquitination			
AvrPtoB	<i>P. syringae</i>	RING E3 ligase	Abramovitch et al., 2003
HopM1	<i>P. syringae</i>	E3 ligase	Nomura et al., 2006
VirF	<i>A. tumefaciens</i>	F-box E3 ligase	Schrammeijer et al., 2001
Processus de phosphorylation			
AvrB	<i>P. syringae</i>	Serine threonine kinase	Kim et al., 2005
HopA11	<i>P. syringae</i>	Phosphothréonine lyase	Li et al., 2007
Manipulation de l'expression génique			
AvrBs3	<i>X. campestris</i>	Activateur transcriptionnel	Kay et al., 2007
AvrXA27	<i>X. oryzae</i>	Activateur transcriptionnel	Gu et al., 2005
AvrXa5	<i>X. oryzae</i>	Activateur transcriptionnel	Bai et al., 2000

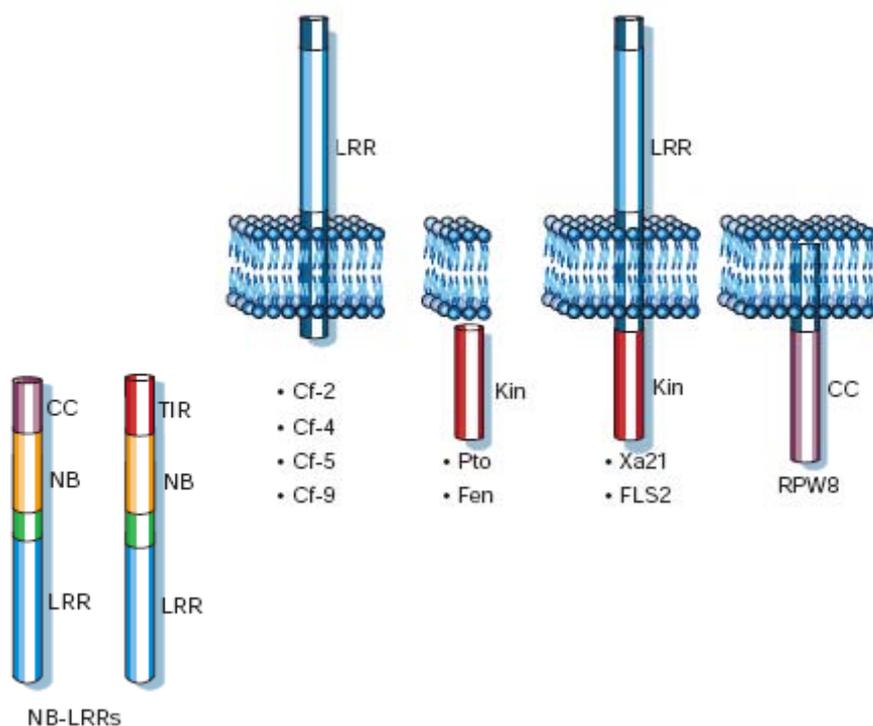


Figure 5 : Représentation de la structure et de la localisation des cinq principales classes de protéines de résistance (d'après Dangl and Jones, 2001)

Les protéines R du type NB-LRR représentent la plus grande classe et sont localisées dans le cytoplasme. De même, les Ser/Thr kinases telles que Pto sont également cytoplasmiques. A l'inverse, les protéines Cf ont un domaine transmembranaire, un domaine LRR extracellulaire et un domaine cytoplasmique court. Les protéines appartenant à la classe de FLS2 ont une structure similaire aux protéines Cf mais leur domaine cytoplasmique possède une activité kinase. Enfin, certaines protéines ont une structure originale, comme RPW8 qui possède un signal d'ancrage dans la membrane et un domaine CC.

Tableau 2 : Modèle génétique de la résistance gène-pour-gène (d'après Flor, 1971).

La présence de l'allèle *R* du gène de résistance chez la plante, et de l'allèle *Avr* correspondant chez l'agent pathogène déclenche la résistance spécifique. On parle alors d'interaction incompatible. Dans toutes les autres situations, l'interaction est dite compatible et la maladie se développe.

Agent Pathogène \ Plante	<i>R</i>	<i>r</i>
	<i>Avr</i>	résistance
<i>avr</i>	maladie	maladie

I.1.4 Les protéines de résistance végétales

Afin de contourner la stratégie offensive de l'agent pathogène, les plantes ont acquis au cours de l'évolution des protéines de résistance capables de reconnaître les effecteurs bactériens responsables de l'ETS.

Selon le modèle de Flor, les plantes possèdent des protéines de résistance capables de reconnaître un ligand, puis de transmettre un signal associé afin d'initier les réponses de défense (Flor, 1971). Les premières protéines R ont été identifiées sur la base de leur fonction : elles sont nécessaires à la résistance d'un génotype donné à une race d'agent pathogène donnée, et leur absence rend la plante correspondante sensible.

Dans le génome d'*Arabidopsis*, on dénombre 207 gènes correspondant potentiellement à des protéines de résistance (The Arabidopsis Initiative, 2000). Malgré le large spectre de résistance assuré par les protéines R (résistance aux bactéries, champignons, oomycètes, virus, insectes et nématodes), celles-ci peuvent être classées en seulement **cinq grandes classes** sur la base de critères structuraux (Dangl and Jones, 2001) (Figure 5) :

- La classe la plus représentée (149 gènes chez *Arabidopsis*) concerne les protéines R cytoplasmiques composées d'un domaine de liaison aux nucléotides (Nucleotide Binding Site, **NBS**) et d'un domaine **LRR** (Leucine Rich Repeat) riche en leucine, impliqué dans les interactions protéine-protéine. Dans leur extrémité N-terminale, elles possèdent un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor Like) ou CC (Coiled-Coil) qui seraient impliqués dans les interactions protéiques.
- La seconde classe, est représentée par les protéines R transmembranaires avec un domaine de type LRR extracellulaire, dont la structure est similaire aux récepteurs de PAMPs, et un domaine cytoplasmique court. Ils sont appelés **RLP** (Receptor Like Proteins) et parmi eux, les mieux caractérisés sont les protéines de la famille Cf qui confèrent la résistance à *Cladosporium fulvum* chez la Tomate (Rivas and Thomas, 2005).
- Les protéines cytoplasmiques à activité **sérine/thréonine kinase** constituent la troisième classe. Parmi elles, on peut citer Pto qui confère la résistance à *Pseudomonas syringae* chez la Tomate (Wulf et al., 2004).
- La quatrième classe est constituée des protéines R transmembranaires avec un domaine de type LRR extracellulaire et un domaine intracellulaire de transduction du signal. Ainsi, les **RLK** (Receptor Like Kinases) possèdent un domaine kinase intracellulaire qui assure la transduction du signal. Quant au domaine LRR, il est impliqué dans les interactions protéine-protéine et permet de moduler la spécificité du signal (Afzal et al., 2008). Parmi les RLK, on trouve Xa21, protéine de résistance à *Xanthomonas oryzae* chez le Riz (Ronald et al., 1992).
- Enfin, quelques protéines ont une **structure originale** qui ne rentre dans aucune des quatre classes précédentes. C'est le cas pour RPW8 qui confère la résistance au Mildiou chez *Arabidopsis* (Wang et al., 2009). On peut également citer l'exemple de la protéine de résistance d'*Arabidopsis* RRS1, qui possède en plus de la structure TIR-NBS-LRR, un domaine d'activation transcriptionnelle de type WRKY, et qui confère la résistance à la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Deslandes et al., 2002).

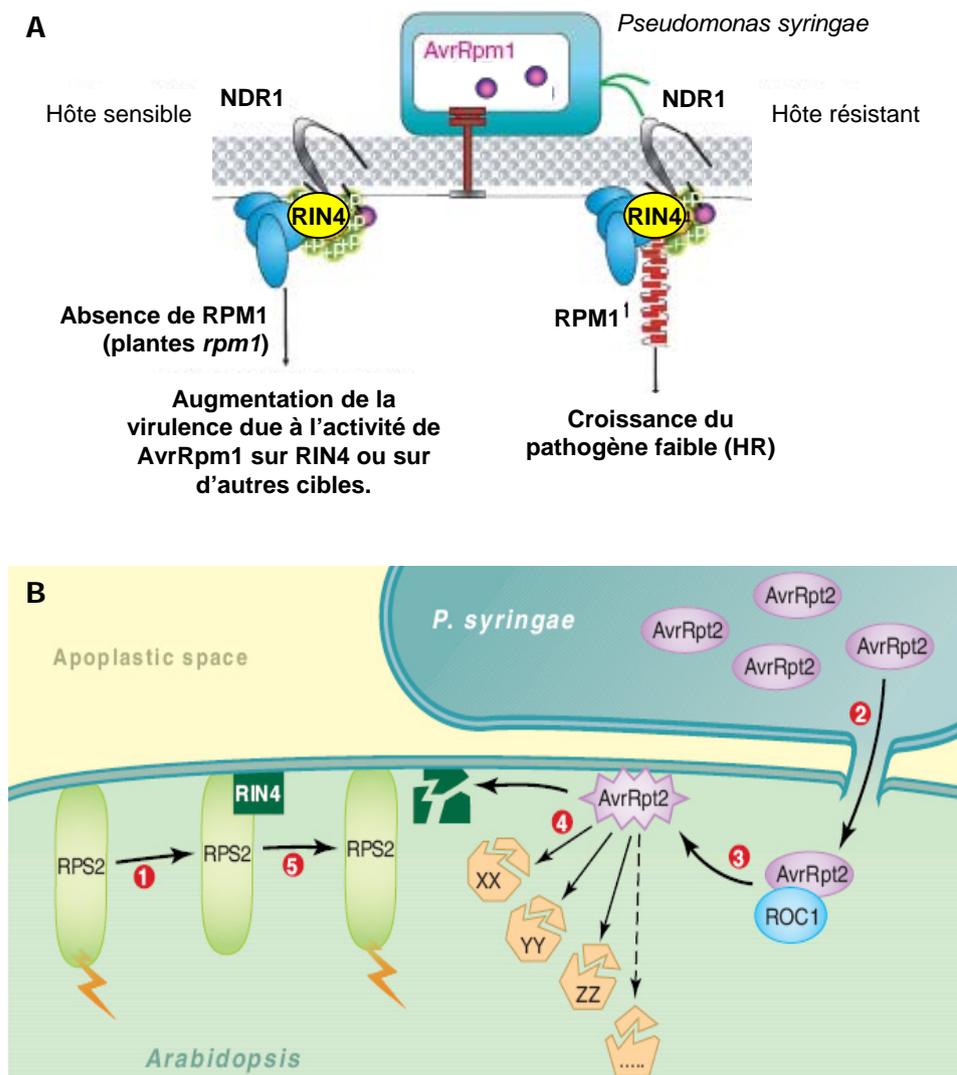


Figure 6. Deux exemples illustrant le modèle de garde.

(A) Activation de la protéine de résistance Rpm1 d'Arabidopsis par l'effecteur AvrRpm1 de *P. syringae* (d'après Jones and Dangl, 2006).

AvrRpm1 (en violet) est acétylé après avoir été injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte par le système de sécrétion de type III de *P. syringae*. Il est alors dirigé vers la membrane plasmique où il va interagir avec RIN4 (en jaune) et provoquer son hyper-phosphorylation. Cette modification de RIN4 active alors la protéine de résistance Rpm1 (en rouge) (partie droite de la figure). En l'absence de Rpm1 (partie gauche de la figure), AvrRpm1 agit certainement sur RIN4 ou sur d'autres cibles (en bleu) pour augmenter la virulence de l'agent pathogène.

(B) Reconnaissance indirecte du facteur d'avirulence AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* par la protéine de résistance RPS2 d'Arabidopsis (d'après Schulze-Lefert and Bieri, 2005).

(1) Chez les plantes saines, RIN4 se fixe à la protéine de résistance RPS2 et supprime son activité. (2) Le facteur d'avirulence bactérien AvrRpt2 est injecté dans la cellule hôte par le système de sécrétion de type III. (3) Des cyclophilines d'Arabidopsis (ROC1 par exemple) interagissent avec AvrRpt2 et l'activent. La protéase AvrRpt2 se fixe alors à la membrane plasmique. (4) AvrRpt2 activé clive RIN4 et au moins trois autres protéines d'Arabidopsis. (5) Le produit du clivage de RIN4 ne peut plus supprimer l'activité de RPS2, ce qui permet la transduction du signal.

Malgré des structures variables, les protéines de résistance ont une fonction commune : la reconnaissance, directe ou indirecte, des effecteurs bactériens, alors appelés facteurs d'avirulence.

I.1.5 Modes de reconnaissance du couple R/Avr

Le modèle génétique le plus simple d'interaction entre les facteurs d'avirulence (*Avr*) et les produits des gènes de résistance (*R*) est le **modèle «gène-pour-gène»** (Flor, 1971). Ce modèle consiste à dire qu'une plante est résistante quand elle possède un gène de résistance dominant et que le pathogène présente le gène d'avirulence complémentaire et dominant. Dans tous les autres cas, la maladie se développe (Tableau 2).

En raison des similarités de structure entre les protéines R et les récepteurs, la reconnaissance R/Avr a longtemps été expliquée, au niveau biochimique, par un **modèle de type Récepteur-Ligand**. Cette hypothèse traduit bien le modèle génétique de Flor. Cependant, malgré une recherche active pour valider ce modèle, une interaction physique directe entre un facteur d'avirulence et une protéine de résistance n'a pu être démontrée que dans un nombre très limité de cas. Ainsi on peut citer deux exemples : la protéine de résistance Pita interagit avec le facteur d'avirulence AvrPita dans le pathosystème Riz/*Magnaporthe grisea* (Jia et al., 2000), et RRS1 interagit avec la protéine d'avirulence PopP2 dans le pathosystème Arabidopsis/*Ralstonia solanacearum* (Deslandes et al., 2003).

Le peu d'exemples d'interaction directe R-Avr, ainsi que l'observation que, chez *Arabidopsis*, le nombre de gènes de résistance soit très inférieur au nombre de facteurs d'avirulence, rend improbable une reconnaissance directe R-Avr (Mackey et al., 2003). Un autre modèle, basé sur de nombreuses données expérimentales, a donc été proposé et appelé **« modèle de garde »** (van der Biezen and Jones, 1998b). Ce modèle place les protéines de résistance comme des «antennes moléculaires» qui enregistrent les interactions entre les facteurs d'avirulence et leurs cibles dans la cellule hôte (Hammond-Kosack and Parker, 2003). La protéine de résistance ne reconnaît pas directement le facteur d'avirulence mais la modification d'une autre protéine ciblée par le facteur d'avirulence. On dit que la protéine R « garde » une protéine végétale donnée dont elle surveille les modifications (Dangl and Jones, 2001).

Le modèle de garde peut être illustré au cours de l'interaction entre des plantes d'*Arabidopsis* exprimant le gène de résistance **RPM1** (Résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1) et des souches de *Pseudomonas syringae* exprimant les facteurs d'avirulence AvrRpm1 et AvrB (Holt et al., 2003). Aucune interaction directe entre Rpm1 et AvrRpm1 ou AvrB n'a pu être mise en évidence mais la protéine RIN4 (Rpm1 Interactor 4) interagirait avec ces trois protéines. Le complexe RPM1-RIN4 est présent constitutivement chez *Arabidopsis* et l'entrée d'AvrRpm1 dans le cytoplasme de la cellule hôte engendre une hyper-phosphorylation de RIN4 qui est reconnue par RPM1, ce qui va déclencher la résistance (Mackey et al., 2002) (Figure 6A). RIN4 interagit également avec la protéine de résistance **RPS2** (Résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 2) qui est complémentaire du facteur d'avirulence AvrRpt2 (Belkhadir et al., 2004). Le complexe RPS2-RIN4 est présent constitutivement chez *Arabidopsis* et l'entrée d'AvrRpt2 dans le cytoplasme de la cellule hôte engendre la disparition de RIN4 par protéolyse (Schulze-Lefert and Bieri, 2005). En effet,

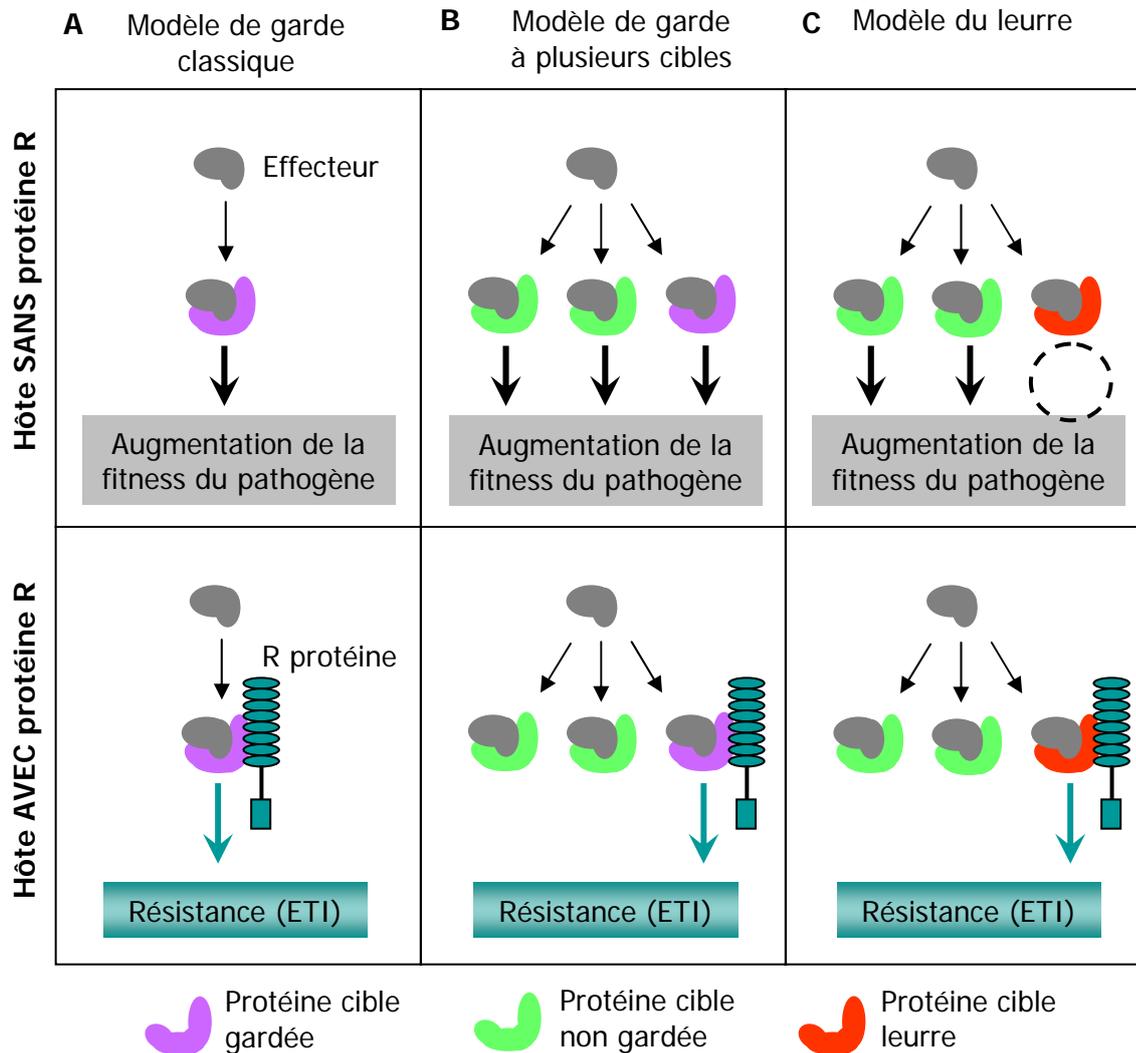


Figure 7. Comparaison entre le modèle de garde et le modèle du leurre (d'après van der Hoorn and Kamoun, 2008).

Le modèle de garde classique (**A**) est nuancé dans le modèle de garde à plusieurs cibles (**B**) où l'effecteur cible plusieurs protéines végétales. Enfin, le modèle du leurre est présenté (**C**). Des protéines végétales impliquées dans la mise en place des réponses de défense sont fréquemment ciblées par les effecteurs afin de diminuer la résistance de la plante. Dans le modèle du leurre, la protéine cible végétale (en orange) est impliquée uniquement dans la perception de l'effecteur. Dans le cas d'une interaction avec une plante-hôte sans protéine R, l'interaction entre l'effecteur (en gris) et la protéine cible leurre (en orange) ne permettra donc pas un meilleur développement de l'agent pathogène. De plus, si la plante possède la protéine R correspondante à l'effecteur injecté, l'interaction entre l'effecteur et la protéine cible leurre va permettre d'activer les réponses de défense.

AvrRpt2 interagit tout d'abord avec une protéine de la plante, ce qui va activer la fonction protéase de cet effecteur qui pourra alors s'attaquer à RIN4 et à au moins trois autres protéines de la cellule hôte. RPS2 est alors activé par cette disparition de RIN4, ce qui conduit à dire que RPS2 «garde» RIN4 (Figure 6B). Des données complémentaires placent RIN4 comme une cible privilégiée de nombreux effecteurs de *Pseudomonas* (Luo et al., 2009).

Au-delà du modèle de garde, le **modèle du Leurre** (Decoy Model) a été récemment formulé (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Les cibles végétales des effecteurs, gardées par les protéines R, sont soumises à deux pressions de sélection : (i) éviter la manipulation par les effecteurs, (ii) améliorer la perception de ces effecteurs. Afin de diminuer ces contraintes, il existerait donc des protéines végétales « leurres », impliquées uniquement dans la perception de l'effecteur (van der Hoorn and Kamoun, 2008) (Figure 7). Ainsi, ces protéines « leurres » ne sont pas manipulées par l'agent pathogène, mais elles reconnaissent efficacement les effecteurs injectés par celui-ci. La protéine **RIN4**, décrite dans le modèle de garde, pourrait aussi être un « leurre » étant donné qu'il n'a pas été démontré que la manipulation de RIN4 par l'agent pathogène augmente la virulence de celui-ci (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Par exemple, AvrRpm1 et AvrRpt2 assurent la virulence dans une même mesure, chez les plantes mutantes *rin4*, que chez les plantes sauvages (Belkhadir et al., 2004). L'information clé pour définir RIN4 comme une protéine « leurre » est donc de savoir si la modification de RIN4 par les effecteurs est bénéfique pour l'agent pathogène.

Les protéines R étant capables de reconnaître les premiers signes de l'invasion et d'activer les mécanismes de défense en aval, il est essentiel que la cellule évite une activation à tort de ces protéines (Takken et al., 2006). En effet, le mutant *ssi4*, dans lequel une protéine R est constitutivement induite présente des lésions chlorotiques spontanées sur ses feuilles (Shirano et al., 2002). Un des mécanismes permettant d'**empêcher une auto-activation des protéines R** est l'interaction de différents domaines de la protéine R entre eux. Ceci a été mis en évidence pour la protéine Rx qui confère la résistance au PVX (Potato Virus X) chez la Pomme de Terre (Moffett et al., 2002).

La reconnaissance précoce et spécifique de l'agent pathogène par la plante permet à celle-ci de déclencher très rapidement une cascade de réponses menant à la résistance, qui est alors appelée **ETI (Effector-Triggered Immunity)** (Figure 1). L'agent pathogène évolue ensuite afin de sélectionner des effecteurs non reconnus par la plante et ainsi de suite.

I.2 Transduction du signal initié par la reconnaissance spécifique

Après l'étape de reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante, des cascades de transduction du signal vont permettre d'acheminer cette information jusqu'au noyau, conduisant ainsi à la mise en place des mécanismes de résistance. Ces voies de transduction utilisent de nombreux seconds messagers impliqués dans un vaste réseau de voies interconnectées.

La régulation des mécanismes de défense spécifique s'effectue à différents niveaux. Le premier niveau de régulation se situe lors de la reconnaissance spécifique entre la plante et le pathogène. Cette étape implique un dialogue moléculaire qui aura des conséquences

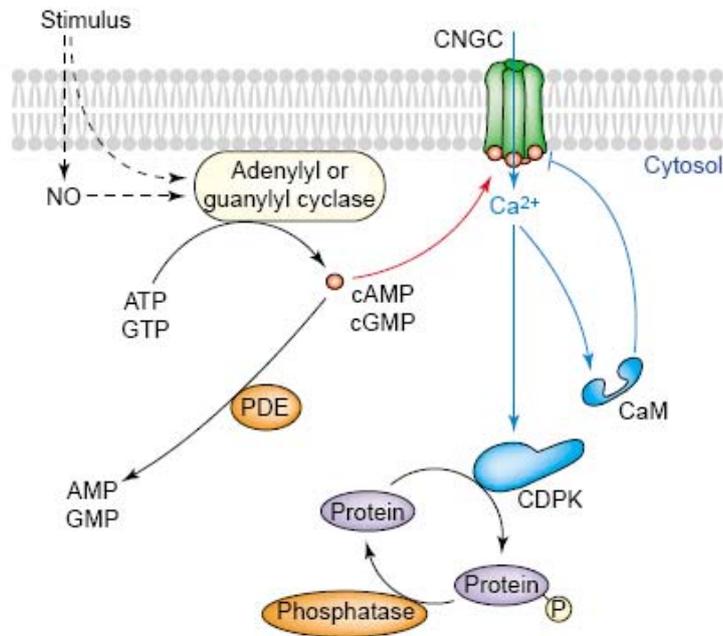


Figure 8. Modèle d'intégration des canaux à nucléotides cycliques (CNGCs) dans les réseaux de signalisation végétale (Talke et al., 2003).

Les CNGC seraient responsables de la traduction d'un signal «nucléotides cycliques» en signal «calcium». L'élévation de la quantité de calcium cytosolique conduit à l'activation de kinases dépendant de la concentration en calcium cytosolique (CDPK), puis à la phosphorylation de protéines en aval. La calmoduline (CaM) pourrait inhiber les CNGC par un mécanisme de rétrocontrôle. Des voies possibles d'activation des cyclases à adenylyl et/ou guanylyl sont mentionnées en pointillés. PDE, phosphodiesterase.

multiples dans la cellule végétale. Ensuite, les réponses de défense sont régulées par des évènements précoces qui découlent de la reconnaissance spécifique : modifications des flux ioniques, production de formes actives de l'oxygène, activation de certains loci, etc. Enfin, plusieurs hormones jouent un rôle important dans le contrôle de la défense. Toutes ces étapes de contrôle des mécanismes de défense spécifique seront décrites dans la suite de ce chapitre.

I.2.1 Rôle des petites molécules signal dans les étapes précoces de signalisation

I.2.1.1 Flux ioniques au travers de la membrane plasmique

Les modifications des flux ioniques sont une réponse très précoce à la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante (Atkinson et al., 1990). Ils consistent en une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) et de protons (H^+) et en un efflux d'ions potassium (K^+).

Chez *Arabidopsis*, l'étude du mutant *hlm1* (HR-like lesion mimic) a permis de mettre en évidence le rôle d'un canal ionique dépendant du **calcium** : CNGC4 (Cyclic Nucleotide-Gated Channel) (Balagué et al., 2003). Le fonctionnement général des CNGC est présenté dans la Figure 8 (Talke et al., 2003). Le mutant *hlm1* est affecté dans le contrôle de la HR et dans la résistance à un large spectre de bactéries avirulentes. En effet, CNGC4 est habituellement régulé positivement en réponse à une infection. De même, le mutant *dnd1* (*defense, no death*) correspond à une mutation dans la protéine CNGC2, très proche phylogénétiquement de CNGC4, et présente une résistance accrue face aux pathogènes avirulents (Clough et al., 2000). Ces données montrent bien l'importance des flux ioniques dans les étapes précoces de signalisation menant à la résistance. De plus, le flux d'ions calcium est particulièrement important car il agit comme second messenger dans l'activation des mécanismes de défense. Ainsi, un pic d'ions calcium est nécessaire à l'induction du burst oxydatif chez le Persil (Jabs et al., 1997). De plus, des expériences des « patch-clamp » sur des protoplastes de Persil ont montré l'activation d'un canal membranaire permettant l'influx de calcium dans la cellule en réponse à l'application de Pep-13, un éliciteur dérivé d'une protéine pariétale de *Phytophthora sojae* (Zimmermann et al., 1997). L'utilisation de plantes transgéniques exprimant l'aéuorine, une protéine dont la luminescence est dépendante de la fixation du calcium, a permis de mieux comprendre le rôle de la signalisation calcique dans la transduction du signal (Blume et al., 2000). L'augmentation de la concentration en calcium, quelques minutes seulement après la perception de l'agent pathogène, peut avoir plusieurs causes : des évènements de phosphorylation, la signalisation *via* les protéines G, et/ou l'augmentation de la concentration en nucléotides cycliques (Hu et al., 2004; Ma and Berkowitz, 2007). En aval de ce pic calcique, vont se dérouler des évènements d'activation de la calmoduline et de protéines kinases, et la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Le réservoir principal de calcium permettant à la cellule de mettre en place ce pic calcique semble être l'apoplaste car de nombreux canaux calciques situés sur la membrane plasmique ont été identifiés chez la Tomate, le Persil et le Tabac (Gelli et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Kadota et al., 2004). Cependant, des études ont montré l'importance du stockage du calcium dans la vacuole et le réticulum endoplasmique (RE) (White and Broadley, 2003). De plus, une modification de la concentration en calcium libre

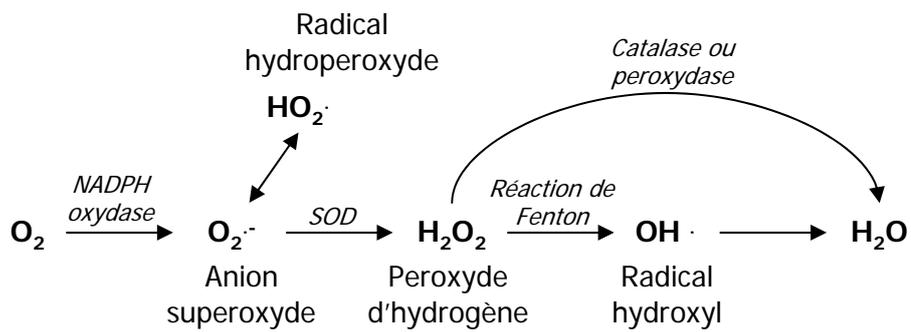


Figure 9. Réactions chimiques clés impliquant des formes actives de l'oxygène dérivées du dioxygène (d'après Hammond-Kosack and Jones, 1996).
 SOD, superoxyde dismutase.

du noyau pourrait être une des étapes clé de la signalisation menant aux réponses de défense (Lecourieux et al., 2005).

L'entrée de **protons**, couplée à une augmentation du pH extra-cellulaire, pourrait être causée par une modification des ATPases membranaires. Cette alcalinisation pourrait avoir pour conséquence un renforcement pariétal. Quant à l'acidification du cytosol, elle pourrait provoquer des modifications de l'activité cellulaire (Mittler et al., 1995; Pontier et al., 2002).

Les **canaux anioniques** de la membrane plasmique transportant les ions chlore et nitrate sont également des composants essentiels de la transduction du signal chez le Tabac, en réponse à la cryptogéine (Wendehenne et al., 2002). Le canal qui permet la sortie des ions chlore et nitrate est dépendant d'une entrée d'ions calcium. Le flux de nitrates joue un rôle dans la mise en place de la résistance car une inhibition de la sortie de nitrates provoque une diminution et un retard de la HR, ainsi qu'une diminution ou une suppression de l'activation des gènes de défense (Wendehenne et al., 2002). Une des fonctions de ces canaux anioniques pourrait être d'initier ou d'amplifier la dépolarisation membranaire qui activerait ensuite les canaux calciques voltage-dépendant et/ou les canaux potassiques (Ward et al., 1995).

I.2.1.2 Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS)

Les ROS, produites lors du burst oxydatif, sont des dérivés très réactifs du dioxygène produits de façon rapide et intense dans différentes conditions, notamment en réponse à un agent pathogène (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Parmi les ROS, on trouve principalement des **ions superoxyde** ($O_2^{\cdot-}$) et du **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2).

Des données suggèrent que la production des ROS se situerait en aval des flux calciques, ces deux étapes étant étroitement liées (Rentel and Knight, 2004). Ainsi, dans des cellules de Tabac traitées à la cryptogéine, la production de ROS est totalement abolie en présence de chélateurs ou de substituts du calcium (Lecourieux et al., 2002).

La production des ROS implique une **NADPH oxydase** qui est présente sur les membranes des chloroplastes, mitochondries et peroxysomes (Torres and Dangl, 2005). Tout comme chez les animaux, l'activité de la NADPH oxydase d'Arabidopsis implique l'activation d'une dizaine de gènes appartenant à la famille des Rboh (Respiratory burst oxydase homolog) (Desikan et al., 1998; Keller et al., 1998; Torres et al., 1998). Les protéines RbohD et RbohF semblent être impliquées directement dans la production apoplastique des ROS en réponse à un agent pathogène (Torres et al., 2002). Les ROS générées par RbohD ont un rôle de régulateurs négatifs de la mort cellulaire dans les cellules entourant un site de HR. Ils seraient donc impliqués dans la limitation de l'extension de la HR (Overmyer et al., 2003).

Les principales réactions chimiques aboutissant à la production des ROS sont présentées dans la figure 9 et décrites dans la suite de ce paragraphe. La production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) à partir du dioxygène implique une NADPH oxydase membranaire. $O_2^{\cdot-}$ est ensuite dismuté par une superoxyde dismutase (SOD), ce qui provoque la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Contrairement à $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 peut franchir les membranes plasmiques et peut donc se retrouver à l'intérieur de la cellule végétale. $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 étant

modérément réactifs, il va y avoir formation d'un radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$) qui intervient dans la peroxydation des lipides et dont la durée de vie est de l'ordre de la seconde. $\text{HO}_2\cdot$ est capable de franchir les membranes et de convertir les acides gras en peroxydes lipidiques. Ces dommages membranaires produisent tout un cortège de messagers chimiques. En présence de Fe^{2+} , peut se dérouler la réaction de Fenton qui transforme H_2O_2 en un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$). Ce radical est extrêmement destructeur et peut initier une peroxydation autoentretenu des lipides. Puis $\text{OH}\cdot$ est transformé en eau, ce qui assure la détoxification du milieu. De même, la détoxification de H_2O_2 est assurée par des catalases ou peroxydases.

Le **burst oxydatif** apparaît très précocement au cours d'interactions compatibles et incompatibles. Cependant, lors d'une interaction incompatible, un second burst oxydatif, plus intense et plus long que le premier, se met en place environ deux heures après l'inoculation (Buchanan et al., 2000). Il engendre potentiellement la mort cellulaire en raison de la forte toxicité des molécules produites. Le rôle des ROS dans les mécanismes de défense est, d'une part, d'être toxique pour les pathogènes. En effet, H_2O_2 serait toxique pour les micro-organismes, aux concentrations observées dans les cellules végétales. D'autre part, les ROS interviennent dans le renforcement de la paroi cellulaire en stimulant les flux d'ions calcium (Ca^{2+}) (Hammond-Kosack and Jones, 1996), et en activant la formation de précurseurs de la lignine *via* l'induction d'activité peroxydase. Cet épaissement permet d'augmenter la résistance aux pathogènes en limitant leur entrée, en diminuant la disponibilité des nutriments ou encore en retardant la diffusion des toxines. H_2O_2 aurait également un rôle dans l'activation de certains gènes de défense (synthèse de phytoalexines) ou de protection (rétrocontrôle de la production des ROS pour limiter la toxicité) (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Enfin, les ROS seraient impliqués dans l'activation des cascades de MAP kinases (Kovtun et al., 2000) (voir Introduction 1.2.2).

I.2.1.3 Le monoxyde d'azote (Nitric Oxyde, NO)

Chez les animaux, la synthèse de NO est effectuée par les enzymes NOS (Nitric oxyde synthase) et NR (nitrate réductase) (Mayer and Hemmens, 1997). Actuellement, seule AtNOS1 a pu être identifiée comme impliquée dans la production du NO chez Arabidopsis, mais cette enzyme ne possède pas d'homologie avec les NOS animales. Cependant, aucune activité de type NOS n'a pu être mise en évidence en utilisant une protéine NOS1 recombinante, suggérant un rôle indirect sur la biosynthèse du NO (Crawford, 2006). Il paraît plus probable que les plantes utilisent des enzymes de type NR pour synthétiser le NO. L'étude du double-mutant *nia1/nia2*, affecté dans des gènes codant des NR, a permis de montrer que les NR fournissent la majeure partie du NO produit au cours des interactions plantes-pathogènes (Modolo et al., 2005).

Le NO est supposé agir en **synergie avec les ROS** pour induire la mort cellulaire lors de la HR car (i) il faut un certain niveau relatif de NO et H_2O_2 pour induire la HR, (ii) le NO ralentit la détoxification de H_2O_2 en inhibant la catalase et la peroxydase (Buchanan et al., 2000). D'autre part, le NO possède un rôle dans la propagation de la mort cellulaire en favorisant la signalisation de cellule à cellule (Greenberg and Yao, 2004). Le rôle du NO dans la défense est confirmé par le phénotype du mutant *nos1* (*nitric oxide synthase 1*), renommé *noa1* (**NO** Associated 1), qui produit peu de NO, et qui est beaucoup plus sensible à *P.*

syringae (Zeidler et al., 2004; Zhao et al., 2007). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'expression de gènes codant pour des protéines PR (Pathogenesis Related) était régulée par le NO (Polverari et al., 2003). L'implication du NO dans la régulation de la défense est également soutenue par l'observation qu'une augmentation rapide et transitoire de la production de NO est observée en réponse aux agents pathogènes, dans différents pathosystèmes. On peut citer l'exemple des cultures cellulaires de Tabac traitées avec des éliciteurs fongiques (Lamotte et al., 2004).

Ces données mettent en évidence le rôle du NO dans l'établissement de la HR, ainsi que dans les mécanismes de signalisation de la résistance.

I.2.2 Cascades de phosphorylation/déphosphorylation et transmission du signal

Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation peuvent modifier l'activité biologique d'une protéine ainsi que sa localisation et sa durée de vie. Elles peuvent aussi permettre l'activation de gènes. L'inhibition de protéines kinases, permettant la phosphorylation, et de phosphatases, permettant la déphosphorylation de protéines, a montré le rôle de ces réactions dans l'induction de quasi toutes les réponses de défense (Suzuki and Shinshi, 1995). De plus, certaines protéines R, telle Xa21 impliquée dans la résistance à *Xanthomonas oryzae* chez le Riz (Ronald et al., 1992), ou des récepteurs aux PAMPs, tel FLS2 (Gomez-Gomez and Boller, 2000), possèdent leur propre domaine kinase. Dans les étapes situées en aval de la reconnaissance de l'agent pathogène, deux grandes classes de protéines kinases sont impliquées dans la défense : les MAP kinases et les CDPK.

Des protéines phosphorylables, les **MAP kinases** (Mitogen-Activated Protein kinase) font partie des régulateurs clé des voies de signalisation (Davis, 2000). La MAP kinase est la dernière kinase activée dans une cascade de phosphorylation impliquant trois kinases. Cette activation est due à une phosphorylation régie par une MAPK kinase (MAPKK) qui est activée à son tour par une MAPKKK. Ce type de cascade est efficace et permet de répondre en quelques minutes, en convertissant les signaux générés par différents récepteurs. Une fois activées, les MAP kinases peuvent être transloquées dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription. On peut citer l'exemple des facteurs de transcription WRKY25 et WRKY33, induits en réponse à une souche avirulente de *Pst* (DC3000) *via* MSK1, une cible directe de la MAP kinase 4 (Andreasson et al., 2005). Le rôle clé des MAP kinases dans la transmission du signal menant à la résistance est renforcé par le fait que des effecteurs bactériens ciblent ces MAP kinases pour les neutraliser. Ainsi, il a été montré que MPK3 et MPK6 sont des cibles directes de l'effecteur HopAI1 de *Pseudomonas syringae* (Zhang et al., 2007) (Figure 4). HopAI1 inactive ces MAP kinases, ce qui a pour conséquence de supprimer deux réponses de défense : le renforcement de la paroi et l'activation transcriptionnelle de gènes de défense.

SIPK (Salicylic-Induced Protein Kinase), une MAPK de 48 kDa identifiée chez le Tabac, est impliquée dans la signalisation des mécanismes de défense (Zhang and Liu, 2001). L'amplitude et la durée de son activation pourraient influencer sur le sort des cellules sous stress. Ainsi, son activation transitoire permettrait aux cellules de s'adapter à

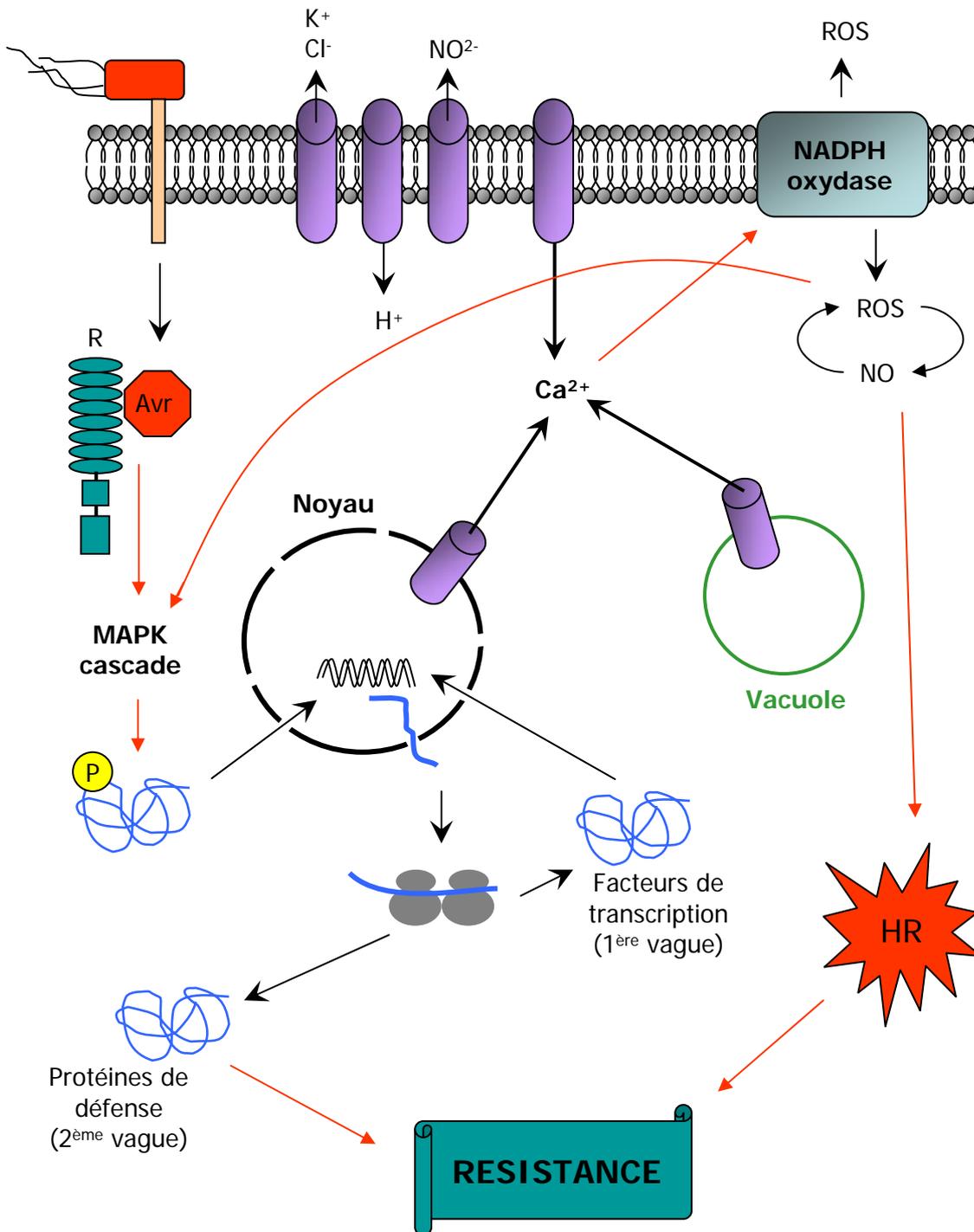


Figure 10. Événements précoces après reconnaissance spécifique de l'agent pathogène par la plante.

La reconnaissance R/Avr déclenche des flux ioniques, et en particulier une modification de la concentration en Ca^{2+} cytosolique qui active la production des ROS. Les ROS vont induire des cascades de MAPK qui permettent l'activation de facteurs de transcription. Ces derniers vont activer des gènes de défense. La HR, qui accompagne fréquemment la résistance spécifique, est induite par les flux ioniques ainsi que par une balance entre ROS et NO. Tous ces événements précoces mènent à la résistance de la plante.

l'environnement, alors que son activation persistante aurait un rôle dans la régulation de la mort cellulaire de type HR et dans l'activation de gènes de défense (Romeis et al., 1999).

Les **CDPK** (Calcium-Dependant Protein Kinases) font partie d'une grande famille de sérine/thréonine kinases qui fixent le calcium et qui sont activées par leur phosphorylation (Romeis et al., 2001). NtCDPK2 et NtCDPK3, identifiées chez le Tabac, sont activées en présence de différents stress biotiques ou abiotiques et semblent avoir un rôle dans l'induction de la HR (Ludwig et al., 2004). NtCDPK2, qui possède un orthologue chez *Arabidopsis* et chez la Courgette, pourrait être impliquée dans les premières modifications de flux ioniques après une interaction avec un agent pathogène. Par ailleurs, il a été montré que les cascades de MAPK et les CDPK agissent au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, respectivement, sur la régulation des protéines Rboh, impliquées dans la synthèse des ROS (Yoshioka et al., 2003; Asai et al., 2008).

Il existe donc une grande diversité de mécanismes aboutissant à la transduction du signal de reconnaissance de l'agent pathogène par la plante. Tous ces mécanismes sont interconnectés et forment un vaste réseau (Figure 10). Au-delà de ces éléments de signalisation identifiés par des approches biochimiques et/ou physiologiques au départ, d'autres acteurs de ce réseau, impliqués dans la résistance à certains isolats d'agents pathogènes, ont été identifiés par des approches génétiques et sont décrits ci-après.

I.2.3 Loci impliqués dans la signalisation précoce

Des approches génétiques basées sur l'étude de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la résistance à différents agents pathogènes a permis d'identifier des gènes spécifiquement impliqués dans la résistance à certains isolats d'agents pathogènes. Ces études ont permis de définir plusieurs voies de transduction du signal :

➤ **La voie EDS1 – PAD4 – SAG101** (Enhanced Disease Susceptibility1 – PhytoAlexin Deficient4 – Senescence-Associated Gene101) a été impliquée dans la résistance spécifique, chez *Arabidopsis*, à certaines souches avirulentes de *Pseudomonas syringae* et de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Parker et al., 1996; Glazebrook et al., 1997). La mutation de ces protéines diminue la résistance dépendante de gènes *R* du type TIR-NB-LRR (Gassmann et al., 1999; Feys et al., 2001). EDS1 interagit directement avec PAD4, même en dehors de toute interaction avec un agent pathogène (Feys et al., 2001), mais aussi avec SAG101 (Feys et al., 2005). Cependant, des expériences de fractionnement cellulaire et de localisation ont montré qu'EDS1 seul et les complexes EDS1-PAD4 et EDS1-SAG101 ne sont pas localisés au même endroit de la cellule. En effet, EDS1 serait impliqué dans un trafic nucléo-cytoplasmique, au cours de la transduction du signal de reconnaissance spécifique. EDS1 est nécessaire pour les étapes précoces de signalisation et pour l'établissement de la HR et il permet l'induction de l'expression de PAD4. Par la suite, EDS1 et PAD4 s'associent et permettent l'accumulation d'acide salicylique, une molécule clé des étapes de transduction situées en aval. Enfin, il est intéressant de noter que les mutants *eds1* et *pad4* sont également plus sensibles à des souches virulentes de *Pseudomonas syringae* et de *Hyaloperonospora arabidopsidis*, ce qui suggère qu'EDS1 et PAD4 possèdent également un rôle clé dans la résistance basale (Glazebrook et al.,

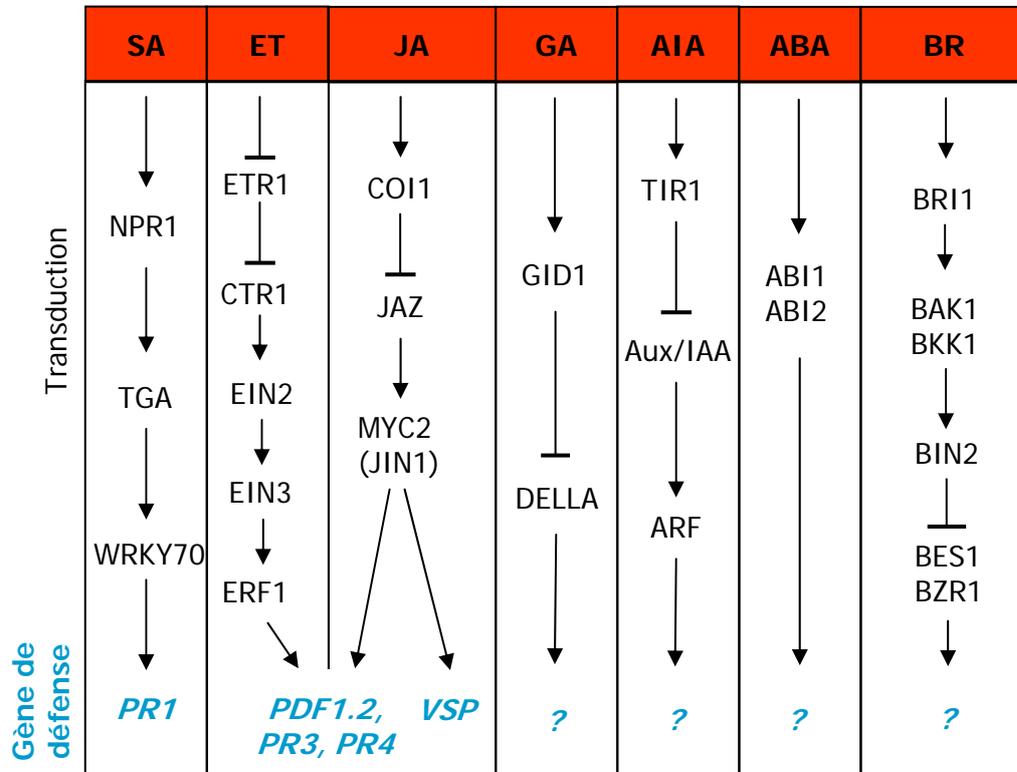


Figure 11. Quelques protéines clés participant aux voies de transduction des principales hormones impliquées dans la régulation des réponses de défense.

Après production, SA, ET, JA, GA, AIA, ABA et BR participent à des voies de transduction interconnectées (non représentées ici pour plus de clarté) qui aboutissent à l'activation de gènes de défense nécessaires à la mise en place de la résistance.

1996; Parker et al., 1996). Ceci est un exemple de l'existence d'interconnexions multiples entre résistances basale et spécifique.

➤ **La voie NDR1** (Non-race specific Disease Resistance1) est également impliquée dans la résistance spécifique à certaines souches avirulentes de *Pseudomonas syringae* et de *Hyaloperonospora arabidopsidis* mais ce sont des souches différentes de celles utilisant la voie EDS1 – PAD4 – SAG101 (Cahill et al., 1994; Century et al., 1995; Century et al., 1997). En effet, le mutant *ndr1* est sensible aux souches de *Pseudomonas* portant divers facteurs d'avirulence (AvrB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrPphB). NDR1 serait donc recruté pour la signalisation dépendante de gènes *R* de type CC-NBS-LRR (Wiermer et al., 2005). La protéine NDR1 est ancrée dans la membrane par un glycosylphosphatidyl-inositol (GPI), probablement à la surface externe, et pourrait participer à la transduction d'un signal émis par l'agent pathogène, ou interagir directement avec lui (Coppinger et al., 2004).

➤ **Les éléments de signalisation RAR1 – SGT1** (Required for MLA Resistance1 – Suppressor of G2 allele of SKP1) sont impliqués dans de nombreuses interactions incompatibles (Zhou et al., 2001; Austin et al., 2002; Muskett et al., 2002; Tornero et al., 2002a). Les protéines R peuvent recruter RAR1 ou SGT1 séparément ou les deux en même temps, et ceci est indépendant de l'implication de NDR1 ou EDS1 – PAD4 en amont (Shapiro and Zhang, 2001; Tornero et al., 2002b). RAR1 agirait avec HSP90 dans l'activation et la stabilisation de complexes pré-activés contenant une protéine R de type NBS-LRR et d'autres protéines (Azevedo et al., 2006). Quant à SGT1, il agirait dans la dégradation ciblée de protéines R présentant un mauvais repliement ou déjà activées par un facteur d'avirulence (Azevedo et al., 2002; Holt et al., 2005). RAR1, HSP90 et SGT1 agirait donc dans les étapes précoces de signalisation *via* le maintien d'un certain niveau de protéines R pré-activées.

Les éléments majeurs des voies de transduction décrits ici ne constituent qu'une petite partie du vaste réseau de signalisation menant à la résistance, et ces voies ne sont pas exclusives. De plus, il existe des résistances à certains agents pathogènes qui ne sont associées aucune de ces voies. Un des mécanismes efficaces de contrôle de ce réseau de signalisation est assuré par les hormones végétales. En effet, la plupart d'entre elles sont impliquées dans la régulation des réponses défense.

1.2.4 Le contrôle hormonal de la défense

Les plantes possèdent de nombreuses hormones leur permettant de réguler divers processus biologiques. Parmi elles, plusieurs jouent un rôle central dans l'établissement de la résistance et de la HR : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET), les gibbérélines (GA), l'auxine (AIA), l'acide abscissique (ABA) et les brassinostéroïdes (BR). Ces hormones agissent dans le contrôle de la transmission du signal de reconnaissance et dans l'induction des mécanismes de résistance. L'étude de mutants affectés dans la production de ces hormones, ainsi que dans les voies de signalisation qui leur sont liées a permis d'identifier des gènes clé de leurs voies de transduction. Les principaux acteurs de ces voies sont représentés sur la Figure 11 et décrits dans les sections ci-après.

I.2.4.1 Voies de signalisation dépendantes de l'acide salicylique

Les plantes synthétisent de l'acide salicylique en réponse à un stress biotique et activent ainsi des processus physiologiques SA-dépendants. Un rôle clé du SA chez les plantes est d'activer les mécanismes de défense conduisant à la HR. Cette résistance locale est souvent suivie par l'établissement d'une résistance systémique acquise (SAR).

L'activation de la **voie des phénylpropanoïdes** permet la synthèse de SA à partir d'acide *trans*-cinnamique (tCA) et d'acide benzoïque (BA) (Coquoz et al., 1998). La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse les premières étapes de la voie qui transforme la phénylalanine en tCA. Une activation transcriptionnelle de la PAL est observée en réponse à une attaque par un agent pathogène (Dixon and Paiva, 1995). L'activation du gène *PAL* par un pathogène avirulent peut être bloquée en inhibant l'activité de l'enzyme PAL. Cela suggère que cette voie peut être auto-amplifiée par un intermédiaire et que SA pourrait contribuer à cette amplification.

Chez *Arabidopsis*, la majorité de SA est produite par une voie impliquant une isochorismate synthase (SID2) (Glazebrook, 2005). En effet, chez le mutant *sid2*, la **production de SA** est fortement réduite et une sensibilité accrue à des souches virulentes et avirulentes de *Pst* et de *Hyaloperonospora* est observée (Nawrath and Métraux, 1999; Ton et al., 2002). Cependant, ce mutant contient un niveau faible de SA qui est sûrement synthétisé par la voie des phénylpropanoïdes (Wildermuth et al., 2001b). Le gène *SID1* est également nécessaire à la production de SA en réponse à un agent pathogène. Ce gène code une protéine membranaire de type MATE (Multidrug And Toxin Extrusion) qui pourrait être impliquée dans le transport du SA du chloroplaste vers le cytosol (Nawrath et al., 2002). *EDS1* et *PAD4* (voir Introduction I.1.2.3) agissent en amont du SA en induisant son accumulation, le SA exerçant un rétro-contrôle positif sur leur expression (Feys et al., 2001; Wildermuth et al., 2001a; Nawrath et al., 2002).

Il existe des relations spatio-temporelles entre l'accumulation de SA, et la **mort cellulaire** (Alvarez, 2000). Un premier pic de SA aurait pour rôle d'accélérer l'initiation de la mort cellulaire ainsi que sa propagation. Ensuite, une accumulation plus tardive de SA aurait un rôle dans l'établissement de la résistance systémique. Par ailleurs, les lésions engendrées lors de la HR ont comme caractéristique de présenter une limite très précise entre les cellules mortes et les cellules encore vivantes (Alvarez, 2000). Cela pourrait être dû à une distribution non homogène de SA au sein des lésions. Chez le Tabac, un gradient de SA s'établit très rapidement et se maintient jusqu'à 6 jours après la formation des lésions. Les niveaux les plus élevés de SA sont trouvés au centre des lésions, puis ils diminuent vers les bords (Enyedi et al., 1992). Le gradient de SA pourrait donc permettre une réponse différente des cellules en fonction de la concentration en SA. Ainsi, de faibles concentrations de SA pourraient ne pas être suffisantes pour induire la mort cellulaire mais au contraire, pourraient induire les mécanismes de défense. Cela suggère que des niveaux faibles de SA contribueraient à réguler la limitation des lésions alors que des niveaux élevés pourraient induire la mort cellulaire (Alvarez, 2000).

La présence de SA est absolument nécessaire dans les interactions incompatibles impliquant différents agents pathogènes bactériens, viraux ou fongiques (Hammond-Kosack and Jones, 1996). En effet, les plantes d'*Arabidopsis* exprimant le gène bactérien *NahG* qui

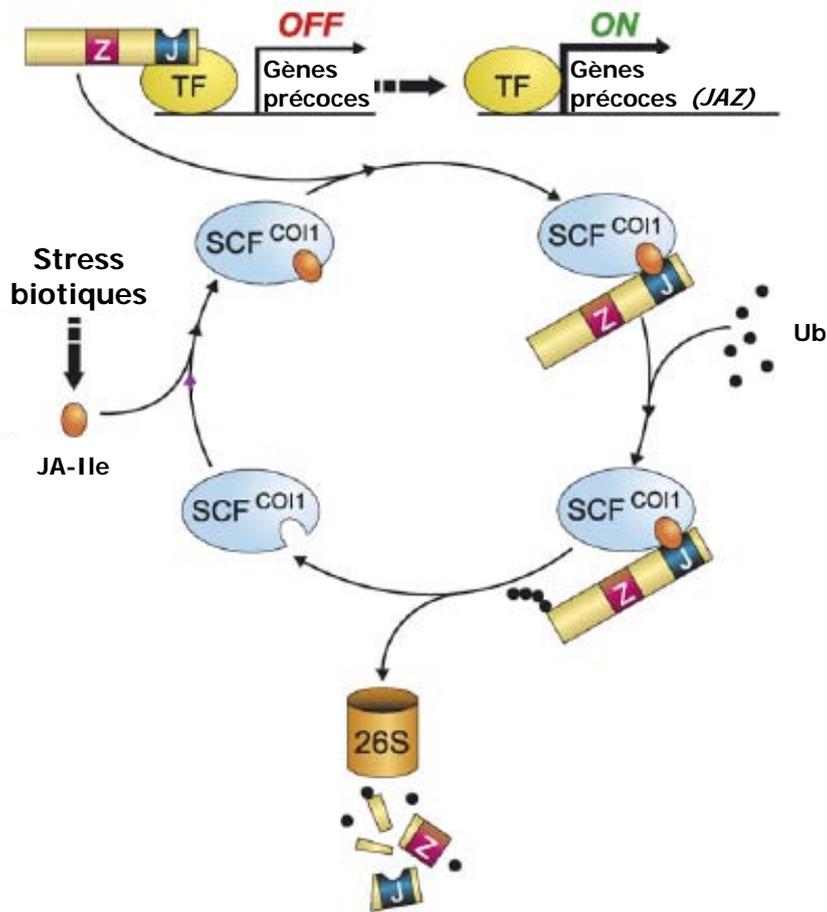


Figure 12. Activation des réponses au JA par le complexe SCF^{COI1} (d'après Katsir et al., 2008).

Dans les cellules végétales contenant des niveaux faibles en JA, les gènes précoces de réponse au JA sont réprimés (OFF) par les protéines JAZ (Z, domaine ZIM ; J, domaine Jas) qui diminuent l'activité de certains facteurs de transcription (MYC2 par exemple). En réponse à un stress biotique, la plante accumule une forme bioactive du JA, le JA-Ile, qui se fixe au domaine LRR de COI1. Un complexe SCF^{COI1}-JAZ se forme alors et provoque la polyubiquitination de JAZ et sa dégradation par le protéasome. La levée de la répression exercée par les protéines JAZ sur certains facteurs de transcription permet alors l'expression de gènes précoces de réponse au JA (ON).

code une salicylate hydroxylase qui convertit SA en catéchol, possèdent des niveaux très réduits de SA (Heck et al., 2003). L'absence d'accumulation de SA dans ces plantes est corrélée à une résistance très affaiblie et à un blocage de l'induction de certains gènes de défense, mais ces effets pourraient être induits par l'accumulation de catéchol, provoquée par la surexpression du gène *NahG* (Abreu and Munne-Bosch, 2009). Cependant, l'expression ectopique de l'ICS ne provoque pas l'apparition de nécroses de type HR, même avec des niveaux de SA jusqu'à 1000 fois supérieures à la normale (Verberne et al., 2000). L'accumulation de SA n'est donc pas suffisante pour déclencher la HR.

Enfin, l'activation du **gène *PR-1*** s'effectue par la dissociation SA-dépendante de NPR1 (Non expressor of PR1) en monomères qui entrent dans le noyau pour interagir avec des facteurs de transcription TGA (Fobert and Despres, 2005) (voir Introduction II.2). NPR1 participe ainsi au contrôle transcriptionnel de l'expression de certains gènes (Figure 11).

I.2.4.2 Voies de signalisation dépendantes de l'acide jasmonique

Une augmentation de la synthèse d'un cyclopentanone, l'acide jasmonique (JA) est observée en réponse à un agent pathogène. En effet, lors d'une interaction incompatible, l'activité de la **lipoxygénase** (LOX) est augmentée (Glazebrook, 2005). Cette enzyme est impliquée dans la peroxydation des lipides, permettant la production de peroxydes lipidiques mais aussi de dérivés d'acides gras tels que le JA et le méthyl-JA. Cependant, le JA est impliqué dans des processus autres que la mise en place de la résistance : réponse à la blessure ou aux attaques d'herbivores, croissance racinaire et sénescence.

Le gène ***COI1*** (**C**oronatine **I**nsensitive1) est un élément central de la voie de transduction associée au JA. En effet, le mutant *coi1* est totalement insensible au JA et présente un défaut d'induction des gènes associés à la défense (Xie et al., 1998). Il a d'ailleurs été montré récemment que COI1 est un récepteur du jasmonate (Yan et al., 2009). De plus, le mutant *coi1* est plus sensible à *Alternaria brassicicola* et *Pythium irregulare* (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Le gène *COI1* code une F-Box, membre d'un complexe E3 ubiquitine-ligase de type SCF, et impliquée dans la reconnaissance spécifique du substrat avant le transfert de l'ubiquitine (Xu et al., 2002). La protéine RPD3b, une histone déacetylase capable de diminuer l'accessibilité de la chromatine à la machinerie de transcription, serait une cible de SCF^{COI1} (Devoto et al., 2002). Ainsi, en dégradant RPD2b, SCF^{COI1} permettrait de lever la répression de la transcription de certains gènes. Plus récemment, plusieurs protéines JAZ (**J**asmonate **Z**IM-domain) ont été identifiées comme cibles directes de SCF^{COI1}, celles-ci étant dégradées par le protéasome en présence de JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2009). De plus, l'expression d'une forme mutée de JAZ1, empêchant son ubiquitination par SCF^{COI1}, confère à la plante une insensibilité au JA similaire à celle observée pour le mutant *coi1* (Thines et al., 2007). Le complexe SCF^{COI1} permettrait donc la dégradation, en présence de JA, de régulateurs négatifs de l'expression des gènes de réponse au JA, parmi lesquels les *JAZ* (Figure 12) (Katsir et al., 2008). Cette dégradation des JAZ est nécessaire à la résistance, puisque des plantes exprimant la forme mutée de JAZ1 qui ne s'associe plus avec le complexe SCF^{COI1}, sont plus résistantes à *P. syringae* (Melotto et al., 2008).

Le JA possède un rôle dans l'activation des gènes de défense tels que *PDF1.2* ou *VSP1* (Glazebrook, 2005). De plus, l'expression de certains facteurs de transcription (*ERF1*, *JIN1*) peut être induite par le JA (voir Introduction II.3). La surexpression d'*ERF1* conduit à l'activation de nombreux gènes de défense : ***PR4* et *PDF1.2***. A l'inverse d'*ERF1*, *JIN1* induit l'expression, JA-dépendante, de gènes de réponse à la blessure, mais réprime l'expression ET- et JA-dépendante, de gènes de défense (Anderson et al., 2004). La mutation *jln1* affecte un facteur de transcription de type bZip, *AtMYC2* (Figure 11) (Lorenzo et al., 2004).

Le JA aurait également un rôle dans la régulation de la mort cellulaire liée à la HR mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien connus à ce jour. Il semblerait que le JA régule négativement la mort cellulaire et la formation des lésions induites par l'ozone, en diminuant la production des ROS (Overmyer et al., 2000).

I.2.4.3 Voies de signalisation dépendantes de l'éthylène

La synthèse d'éthylène (ET) s'effectue à partir de méthionine et nécessite l'activité d'une SAM synthase, d'une ACC synthase et enfin d'une ACC oxydase (Wang et al., 2002). L'ET est une petite molécule régulatrice de nombreux processus biologiques et son rôle dans la sénescence et dans la mort cellulaire liée au développement des plantes est déjà bien connu. Le mutant *ein2* (Ethylene Insensitive) est totalement insensible à l'ET et présente une résistance accrue aux pathogènes biotrophes, capables de se nourrir à partir d'une cellule végétale sans la tuer (Berrocal-Lobo et al., 2002).

Cependant, l'effet de mutations conduisant à l'insensibilité à l'éthylène sur la résistance aux agents pathogènes varie en fonction des pathosystèmes (Ciardi et al., 2000). Dans certains pathosystèmes, une réduction de la sensibilité à l'ET, par le biais de récepteurs à l'ET, peut réduire la mort cellulaire (Lund et al., 1998). Ces récepteurs sont des régulateurs négatifs de la réponse à l'ET. Ainsi chez la Tomate, une expression réduite du gène codant un récepteur à l'ET, *LeETR4*, augmente la sensibilité à l'ET et améliore la HR (Ciardi et al., 2001). La plante peut donc moduler sa sensibilité à l'ET en modifiant le niveau d'expression de ses récepteurs. Ainsi, une induction précoce du gène *LeETR4* lors d'une interaction incompatible limite la mort cellulaire au site d'infection. C'est donc bien la réduction de la sensibilité à l'ET causée par l'induction de ses récepteurs qui contribue à la régulation de la HR. L'ET aurait donc un rôle dans la propagation de la mort cellulaire. Cette hypothèse est renforcée par l'étude du phénotype du mutant lésions spontanées *vad1* (Vascular Associated Death 1) qui est affecté dans la propagation des lésions de type HR (Bouchez et al., 2007). L'expression de gènes liés à la biosynthèse et aux voies de signalisation de l'ET est augmentée dans ce mutant, après une interaction avec un agent pathogène. De plus, des données complémentaires montrent que l'ET agirait, avec le SA, comme régulateur positif de la propagation de la mort cellulaire (Bouchez et al., 2007).

Chez *Arabidopsis*, l'étude de mutants insensibles à l'ET a permis d'identifier **5 récepteurs membranaires à l'ET** : *ETR1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS1* et *ERS2* (Hua et al., 1995; Sakai et al., 1998). Ils possèdent un domaine conservé, contenant 3 à 4 régions transmembranaires, qui serait responsable de la fixation de l'ET (Hall et al., 2000). *ETR1* et *ERS1* sont présents sous forme d'homodimères sur la membrane du RE (Schaller et al., 1995). En l'absence de signal, ces récepteurs activent une Raf-like kinase, *CTR1*, qui régule

négativement les voies de réponse à l'éthylène situées en aval (Clark et al., 1998). Cette voie de signalisation sera décrite dans la partie Introduction II.3. Brièvement, des analyses génétiques et moléculaires ont permis de montrer qu'une **cascade transcriptionnelle** est impliquée dans la régulation des gènes de réponse à l'ET (Alonso and Stepanova, 2004; Broekaert et al., 2006). Dans cette cascade, **EIN3** (Ethylene Insensitive), un régulateur positif de la voie de transduction de l'ET, agit en aval de **EIN2**. En effet, EIN2 transmet le signal à la famille de FT EIN3 et déclenche *via* les FT **ERF**, une cascade transcriptionnelle impliquée dans la régulation de gènes de réponse à l'ET, **PR3**, **PR4** et **PDF1.2** (Figure 11) (Guo and Ecker, 2004).

I.2.4.4 Voies de signalisation dépendantes des gibbérellines

Les gibbérellines (GA) régulent positivement la croissance des plantes en stimulant la dégradation de régulateurs négatifs, les **protéines DELLA** (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Chez le Riz, la protéine **GID1** (GA Receptor Insensitive Dwarf 1) interagit avec la protéine DELLA SLR1 de façon GA-dépendante. Cette interaction conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de SLR1 par le protéasome (Ueguchi-Tanaka et al., 2005).

Récemment, il a été mis en évidence que ces protéines DELLA modulent les réponses de défense dépendantes du SA, du JA et de l'ET (Navarro et al., 2008). En effet, un quadruple mutant affecté dans 4 gènes DELLA est très sensible à des champignons nécrotrophes, dont le développement nécessite la présence de tissus nécrosés. Mais ce quadruple mutant est plus résistant que les plantes sauvages à des agents pathogènes biotrophes. De plus, l'expression de gènes marqueurs des voies SA, JA et ET est affectée dans ce mutant. Comme le GA active la dégradation des protéines DELLA, il est probable que le GA augmente la sensibilité aux agents pathogènes nécrotrophes, et active la résistance face aux agents pathogènes biotrophes. Cette hypothèse a été validée par des expériences d'application exogène de GA. De plus, il a récemment été établi que les protéines DELLA activent l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification des ROS (Achard et al., 2008). Cependant, les conséquences de la modulation du niveau des ROS sur la régulation des réponses de défense sont encore inconnues. De façon intéressante, le GA a été identifié à l'origine, comme une molécule sécrétée par un champignon nécrotrophe pathogène du Riz (Kurosawa, 1926). Cependant, le mécanisme par lequel le GA favorise la virulence de ce champignon est encore inconnu. On pourrait émettre l'hypothèse que le GA sécrété par ce champignon nécrotrophe va activer la dégradation des protéines DELLA et donc réprimer les voies de défense JA-dépendantes.

I.2.4.5 Voies de signalisation dépendantes de l'auxine

L'auxine (AIA) est une hormone végétale qui active la dégradation d'une famille de répresseurs transcriptionnels appelés Aux/IAA (Auxin/Indole-3-Actic Acid). Les répresseurs Aux/IAA se fixent à des gènes **ARF** (Auxine Response Factor), ce qui inhibe la transcription de gènes de réponse à l'auxine (Kepinski and Leyser, 2005; Leyser, 2006; Parry and Estelle, 2006). TIR1, une protéine de type F-Box avec une fonction de récepteur à l'auxine, interagit en présence d'AIA avec des protéines Aux/IAA et est responsable de leur dégradation par le

protéasome (Kepinski and Leyser, 2005; Parry and Estelle, 2006). Ceci permet alors la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Figure 11).

L'auxine est connue depuis longtemps pour être un régulateur des réponses de défense (Shinshi et al., 1987; Yamada, 1993), mais les mécanismes moléculaires impliqués sont encore très peu connus. Cependant, il a été observé que l'auxine affecte différemment la résistance en fonction de l'agent pathogène impliqué (Kazan and Manners, 2009). Ainsi, des résultats récents ont montré que l'effecteur de *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 active la production d'AIA après injection dans la cellule hôte (Chen et al., 2007). Ceci permettrait d'augmenter le développement de cet agent pathogène dans la plante. Par ailleurs, la reconnaissance par la plante du peptide flg22 de la flagelline active l'expression du microARN miR393, qui réprime ensuite l'expression des gènes codant les récepteurs à l'AIA (Navarro et al., 2006). Ceci conduit à la suppression de l'expression des gènes de réponses à l'AIA et à une réduction du développement de la maladie. Ces deux exemples montrent donc un rôle négatif de l'AIA sur la résistance. A l'inverse, des voies de signalisation de l'AIA intactes sont nécessaires à la résistance à *B. cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina*, deux champignons nécrotrophes (Llorente et al., 2008).

L'AIA pourrait agir directement et/ou indirectement dans la régulation de la résistance. En effet, une régulation directe pourrait s'effectuer *via* une interférence avec les autres voies hormonales contrôlant la défense (voir Introduction 1.2.4.7), alors qu'une régulation indirecte pourrait être liée aux effets de l'AIA sur le développement végétal (Kazan and Manners, 2009). En effet, les mutants affectés dans les voies de signalisation liées à l'AIA présentent des altérations développementales (développement des racines latérales, des poils racinaires, des tissus vasculaires) qui pourraient influencer sur le processus d'infection par l'agent pathogène.

1.2.4.6 Voies de signalisation dépendantes de l'acide abscissique

Le rôle de l'acide abscissique (ABA) dans la défense est encore mal connu et controversé. Alors que certaines données suggèrent une corrélation inverse entre les niveaux en ABA et la résistance aux agents pathogènes, d'autres mettent en évidence un rôle positif de cette hormone dans l'activation des gènes de défense et de la résistance (Mauch-Mani and Mauch, 2005). De plus, un lien entre l'ABA et les ROS a été mis en évidence récemment. En effet, l'ABA induit l'expression d'une catalase (CAT1), impliquée dans la détoxification du H₂O₂, et active simultanément la production de H₂O₂ (Xing et al., 2008).

Dans le cas des **agents pathogènes biotrophes**, l'ABA joue un rôle important dans l'activation de la fermeture des stomates, ce qui représente une barrière contre l'invasion bactérienne (Melotto et al., 2006). Par conséquent, des mutants déficients en ABA sont plus sensibles à une infection par *Pseudomonas syringae* ou *Ralstonia solanacearum* (Hernandez-Blanco et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que des effecteurs bactériens augmentent la sensibilité de la plante hôte en augmentant la production d'ABA ou en activant des gènes de réponse à l'ABA (de Torres-Zabala et al., 2007). L'ABA aurait donc des actions différentes en fonction des étapes de l'infection par un agent pathogène biotrophe : restriction de l'entrée de l'agent pathogène dans les étapes précoces, et atténuation des défenses lors des étapes plus tardives de l'infection.

Les effets de l'ABA sur la résistance des plantes aux **agents pathogènes nécrotrophes** portent également à controverse. En effet, l'ABA est un régulateur négatif de la résistance à *F. oxysporum* (Anderson et al., 2004) ou *B. cinerea* (Abuqamar et al., 2006). De plus, la rôle négatif de l'ABA sur la résistance à *B. cinerea* est renforcé par des résultats montrant que la production d'ABA par *B. cinerea* est impliquée dans son pouvoir pathogène (Siewers et al., 2004). Enfin, lors d'interactions avec divers agents pathogènes fongiques, des études ont montré que (i) l'ABA augmente la sensibilité en contrecarrant les défenses dépendantes du SA, et (ii) l'ABA active le dépôt de callose qui a un effet négatif sur les défenses dépendantes du SA (Nishimura et al., 2003; Ton and Mauch-Mani, 2004). A l'inverse, l'ABA a été identifié comme un régulateur positif de la défense contre *Phytophthora irregularis* et *Alternaria brassicicola* (Adie et al., 2007; Flors et al., 2008).

L'ABA est une hormone clé pour la régulation des interactions plantes-pathogènes mais son mode d'action reste encore inconnu. Ses conséquences variables sur la mise en place de la défense pourraient s'expliquer par des régulations fines de sa concentration.

I.2.4.7 Voies de signalisation dépendantes des brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes (BR), dont la structure est proche de celle des hormones stéroïdes animales, sont impliqués dans la régulation de divers processus physiologiques : la croissance, l'élongation cellulaire, la germination, la floraison ou la réponse aux stress abiotiques (Bajguz, 2007). Les BR sont perçus par **BRI1** (**B**rassinosteroid **i**nsensitive1), un récepteur membranaire de type RLK, dont le domaine kinase est alors activé. Ceci provoque l'hétérodimérisation de BRI1 avec un autre RLK, **BAK1** (**B**RI1-**A**ssociated **K**inase1), qui est alors phosphorylé par BRI1. L'activation de ces deux RLK conduit à la déphosphorylation des FT **BZR1** (**B**rassina**Z**ole-**R**esistant1) et **BES1** (**B**RI1-**E**ms-**S**uppressor1), probablement par l'inhibition de la kinase BIN2 (**B**rassinosteroid **I**nsensitive2) ou l'activation de la phosphatase BSU (**B**RI1 **S**uppressor1) (Figure 11) (Gendron and Wang, 2007). Après déphosphorylation, BZR1 et BES1 se fixent sur les promoteurs de gènes de réponse aux BR et activent leur expression.

Des données montrent que les BR seraient également impliqués dans la régulation des réponses de défense végétales. Ainsi, les BR augmenteraient la résistance du Tabac face à *Pseudomonas*, au TMV et à l'Oïdium, et du Riz face à *Magnaporthe grisea* et *Xanthomonas oryzae* (Nakashita et al., 2003). De plus, des données montrent que la protéine C4 du virus BCTV (**B**eet **C**urly **T**op **V**irus) interagit avec BIN2, une protéine kinase impliquée dans la signalisation des BR chez Arabidopsis (Piroux et al., 2007). BIN2 est un régulateur négatif de la voie de transduction des BR et est impliqué dans la phosphorylation des FT BES1 et BZR1, ce qui induit leur dégradation par le protéasome (Li and Nam, 2002). La fixation de la protéine virale C4 sur BIN2 diminuerait son activité kinase et activerait donc les gènes cibles des FT BES1 et BZR1 (Piroux et al., 2007).

Récemment, trois équipes de recherche indépendantes ont montré l'implication d'un composant centrale de la voie de signalisation des BR, **BAK1**, dans la régulation de la défense basale et de la mort cellulaire programmée (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007; Kemmerling et al., 2007). Après perception des BR par le récepteur BRI1, BAK1 interagit avec BRI1 et déclenche la transduction du signal (Li et al., 2002). L'expression de

BAK1 est induite en réponse aux PAMPs et le mutant *bak1* d'*Arabidopsis* présente une diminution de sa réponse aux PAMPs (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que BAK1 interagit avec FLS2, après reconnaissance de la flagelline par FLS2, déclenchant ainsi la transduction du signal dans la cellule (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Des résultats récents montrent que les effecteurs bactériens AvrPto et AvrPtoB ciblent BAK1 et empêchent la formation du complexe FLS2-BAK1 induit par la flagelline, diminuant ainsi la réponse de la plante aux PAMPs (Shan et al., 2008). Enfin, il a été récemment mis en évidence que BAK1 interagit avec la protéine de type RLK, BIR1 (Gao et al., 2009). La mutation de *BIR1* conduit à une extension de la mort cellulaire et à l'activation constitutive des réponses de défense. BIR1 serait donc un régulateur négatif des réponses de défense, *via* son interaction avec BAK1.

De plus, le mutant *bak1* présente une sensibilité accrue face à divers agents pathogènes nécrotrophes, tels *A. brassicicola* et *B. cinerea*, alors qu'il montre une résistance accrue face à l'agent pathogène biotrophe *H. arabidopsidis* (Kemmerling et al., 2007). Chez *Arabidopsis*, la protéine BKK1 (BAK1-like 1) agirait de façon redondante avec BAK1 pour activer la croissance végétale dépendante des BR, et réprimer la mort cellulaire indépendante des BR (He et al., 2007). BAK1 et BKK1 auraient donc un rôle dual dans la régulation de la défense et du développement.

Toutes ces données montrent bien l'implication des voies de signalisation dépendantes des BR dans la régulation des défenses végétales, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu sont encore mal connus.

I.2.4.8 Interactions entre les voies de signalisation hormonales

Il existe de fortes interactions entre les différentes voies de signalisation présentées dans ce chapitre (Glazebrook, 2005; Lopez et al., 2008; Shinshi, 2008; Bari and Jones, 2009). Ces interactions se manifestent surtout par des **répressions mutuelles**.

L'application de SA sur des feuilles de Tomate inhibe la synthèse d'inhibiteurs de protéases induits normalement par le JA (Doares et al., 1995). De plus les plantes NahG, affectées dans la production de SA, produisent jusqu'à 25 fois plus de JA que les plantes sauvages (Runyon et al., 2008). Par ailleurs, la voie JA, par l'intermédiaire de MYC2 et de COI1, régule négativement la voie SA, celle-ci exerçant en réponse un effet similaire sur les voies JA et ET par l'intermédiaire de NPR1 et WRKY70 (Li et al., 2004). Ainsi, une surexpression du facteur de transcription WRKY70 résulte en une signalisation constitutive de la voie du SA, alors que son expression antisense active les gènes de la voie du JA. Ces phénotypes ne sont pas associés avec des modifications des niveaux en SA ou JA donc WRKY70 affecterait des gènes régulés par le SA et le JA, en aval de la production de ces molécules signal. Ces données confirment l'antagonisme des voies SA et JA.

MPK4 est une kinase qui réprime le complexe EDS1/PAD4 et qui inhibe l'accumulation de SA (Petersen et al., 2000). D'autre part, MPK4 active les voies de défense liées à l'ET, mais est nécessaire à l'activation du gène marqueur de défense *PDF1.2*, un gène de défense activé par le JA. MPK4 régulerait donc précocement le dialogue entre les voies JA et SA *via* la régulation négative du complexe EDS1/PAD4. Ceci aurait deux conséquences : la répression de la biosynthèse de SA et la potentialisation de la perception du JA (Brodersen et al., 2006).

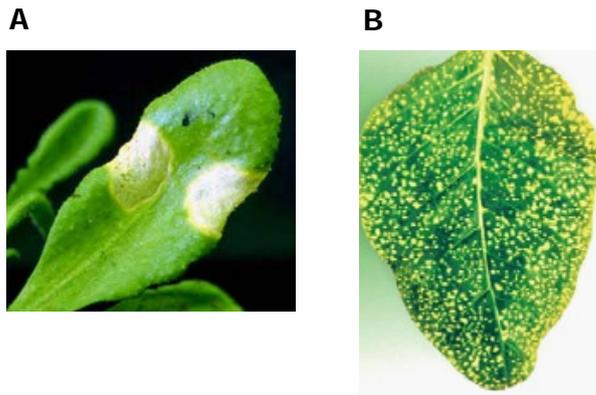


Figure 13. Quelques observations de HR.

(A) HR localisée au site d'inoculation sur une feuille d'*Arabidopsis* infectée par la souche 147 de *Xcc* (d'après Godard et al. 2000). **(B)** Symptômes d'HR sur une feuille de Tabac infecté par le virus TMV (Hofius et al., 2007).

Une interaction entre les voies JA et ET a pu être mise en évidence dans le cas de l'induction du gène *PDF1.2*. En effet, les mutants *ein2* traité au MeJA, ou *jar1* traité à l'ET, sont incapables d'accumuler des transcripts *PDF1.2* (Penninckx et al., 1998). Le JA et l'ET auraient donc un effet synergique nécessaire à l'expression de ce marqueur de défense.

L'AIA serait impliqué dans la régulation de l'expression des gènes associés à la biosynthèse, au catabolisme et aux voies de signalisation d'autres hormones (Paponov et al., 2008). Cependant les mécanismes par lesquels l'AIA affecte la balance des autres hormones et régule spécifiquement les réponses de défense en fonction de l'agent pathogène impliqué sont encore mal connus. Des résultats récents montrent que les voies de l'AIA et du SA agiraient de façon antagoniste sur la régulation des mécanismes de défense. Ainsi, l'AIA supprime les défenses SA-dépendantes, comme l'expression de *PR1* (Wang et al., 2007). Alors que des plantes déficientes en SA (plantes NahG par exemple) présentent des niveaux d'AIA plus élevés (Abreu and Munne-Bosch, 2009). A l'inverse, les voies de l'AIA et du JA interagissent positivement pour la régulation de la défense. En effet, l'expression pathogène-dépendante du gène *PDF1.2*, un gène marqueur de la voie JA, est supprimée dans des plantes traitées par un inhibiteur du transport de l'AIA (Llorente et al., 2008). Ceci est corrélé avec une sensibilité accrue aux pathogènes nécrotrophes. En conclusion, interférer avec le transport de l'AIA semble affecter positivement les voies SA et la résistance aux agents pathogènes biotrophes, mais semble affecter négativement les voies JA et la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes (Kazan and Manners, 2009).

Enfin, les BR affecteraient l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse d'autres hormones végétales. Par exemple, des gènes impliqués dans la biosynthèse d'ET (*ACC synthase*) ou du JA (*OPR3*) chez *Arabidopsis*, sont induits par les BR (Yi et al., 1999; Mussig et al., 2006).

Ces interconnexions entre les différentes voies hormonales sont indispensables à l'établissement d'une réponse adaptée à l'attaque par un agent pathogène. En général, les voies SA et GA sont activées au détriment des voies JA et ET, en réponse à des agents pathogènes biotrophes tels *Pseudomonas* ou *Hyaloperonospora*. A l'inverse, les voies JA, ET, et AIA sont plutôt activées en réponse à des agents pathogènes nécrotrophes. Le subtil équilibre entre ces différentes hormones, établi après la perception de l'agent pathogène par la plante, permet la mise en place de la résistance basale et/ou de la résistance spécifique, fréquemment accompagnée d'une mort cellulaire hypersensible.

I.3 La HR : un suicide cellulaire programmé

La HR est l'un des mécanismes de défense des plantes les plus spectaculaires et les plus efficaces. Elle est généralement associée à la résistance spécifique de type hôte mais certains types de résistance non-hôte sont aussi accompagnés de HR. La HR est une forme de **mort cellulaire programmée génétiquement**, mise en place de façon très rapide, et limitée à la zone infectée par l'agent pathogène (Figure 13).

Deux rôles sont attribués à cette réponse de défense. D'une part, la **mort des cellules végétales entourant l'agent pathogène** perturberait considérablement le développement de ce dernier. En effet, celui-ci se retrouve dans un milieu dépourvu

d'éléments nutritifs, au pH et à l'hygrométrie défavorables, et contenant des composés toxiques libérés suite à la mort des cellules. Cependant, ces conditions sont favorables à l'invasion par certains agents pathogènes nécrotrophes comme *Botrytis* (Govrin and Levine, 2002). D'autre part, la HR jouerait un rôle de signal d'alarme, informant les autres parties de la plante de l'attaque. Ce signal généré lors de la HR se propagerait à l'ensemble de la plante, autorisant la mise en place de **défenses systémiques** (SAR).

La mort cellulaire de type HR possède des **caractéristiques morphologiques** différentes des autres formes de mort cellulaire programmée (Programmed Cell Death, PCD). Contrairement aux autres PCD végétales, la fragmentation de l'ADN, au cours de la HR, se déroule avant la rupture de la vacuole. Voici la séquence des événements observés dans le cas de la mort cellulaire observée en réponse à *Pseudomonas* : (i) augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique, (ii) gonflement de la mitochondrie, (iii) fragmentation de l'ADN, (iv) rétractation de la vacuole et du cytoplasme (Wakabayashi and Karbowski, 2001; van Doorn and Woltering, 2005).

I.3.1. La HR est sous le contrôle d'un programme génétique

De nombreuses interactions plantes-pathogènes peuvent conduire à une mort des cellules qui n'est pas liée à la HR pour deux raisons : (1) cette mort cellulaire n'est pas associée à une résistance, et (2) elle apparaît trop tard après l'infection et n'est pas accompagnée de déshydratation des tissus (Greenberg, 1996). La mort cellulaire observée lors d'une interaction incompatible, contrairement à celle précédemment décrite, est donc sous le contrôle d'un programme génétique. D'autre part, la HR nécessite un **métabolisme actif** de la plante (Rusterucci et al., 1996; Pontier et al., 1998). Ainsi, les plantes doivent pouvoir synthétiser activement des protéines pour mettre en place une HR en réponse à une bactérie et être transcriptionnellement actives pour répondre à des éliciteurs purifiés inducteurs de HR. Enfin, la HR est modulée par les conditions environnementales : température, hygrométrie et luminosité. Ainsi, une hygrométrie élevée (May et al., 1996) ou une faible intensité lumineuse (Genoud et al., 2002) retardent ou suppriment la HR.

L'expression de transgènes peut induire l'apparition de lésions nécrotiques (Mittler and Rizhsky, 2000). Il peut s'agir de gènes d'avorulence bactériens comme *AvrRpt2* dont l'expression ectopique provoque une HR accompagnée de l'induction du gène de défense *PR1* (McNellis et al., 1998). Il peut s'agir également de gènes végétaux liés à la résistance tels que les gènes *Pto* chez la Tomate (Xiao et al., 2001) ou *NPR1* chez le Riz (Fitzgerald et al., 2004).

La HR étant sous le contrôle d'un programme génétique, différentes approches ont été menées afin d'identifier certains gènes clé pour la régulation de ce processus.

I.3.2. Régulateurs putatifs du contrôle de la HR

I.3.2.1 Approches par analogie avec la mort cellulaire programmée chez les animaux

Les travaux sur la mort cellulaire hypersensible se sont orientés vers la recherche de similarités avec la **mort cellulaire programmée animale** (Hoeberichts and Woltering,

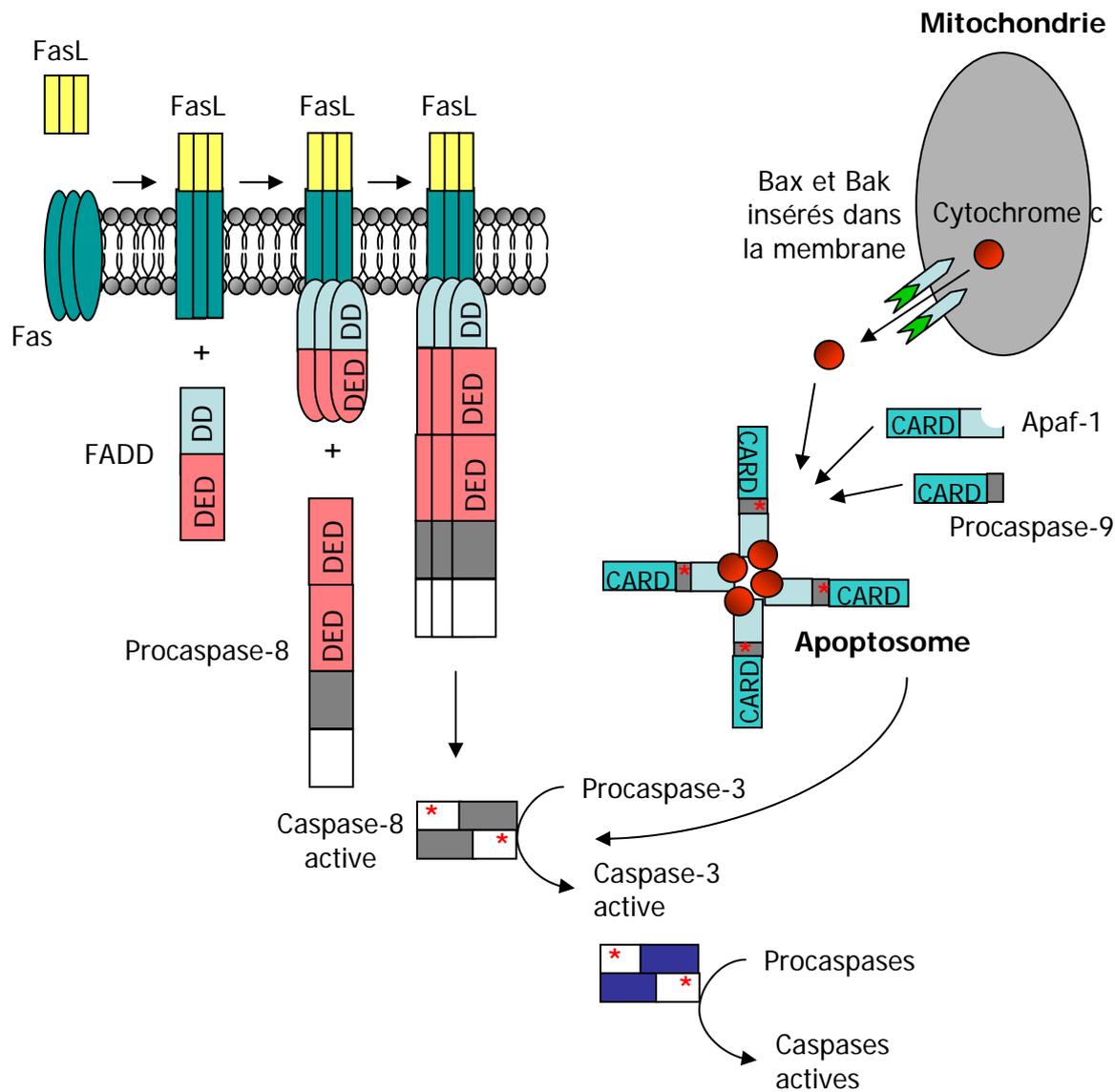


Figure 14. Les voies d'activation des caspases (d'après Kaufmann and Hengartner, 2001).

La voie des « Death Receptor », est présentée sur la moitié gauche de la figure. La fixation de FasL sur le « Death Receptor » Fas permet l'interaction de ce complexe avec FADD et la procaspase-8 *via* les domaines DD (Death Domain) et DED (Death Effector Domain), respectivement. Ceci permet l'activation de la caspase-8 qui peut alors activer la caspase-3.

La voie mitochondriale, présentée dans la moitié droite de la figure, implique une libération du cytochrome c à partir de la mitochondrie. Cette étape fait intervenir Bax et Bak, dont l'insertion dans la membrane mitochondriale va permettre le passage du cytochrome c. Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c va activer l'assemblage d'Apaf-1 et de la procaspase-9 dans une structure macromoléculaire appelée apoptosome. L'apoptosome, qui contient des formes actives de la caspase-9, est alors capable d'activer la caspase-3.

Dans cette figure, les changements de conformation sont indiqués par des changements de formes géométriques, et les caspases actives sont indiquées par des astérisques (*).

2003). En effet, plusieurs similarités morphologiques et biochimiques ont été trouvées entre les cellules animales ou végétales subissant une mort cellulaire programmée, telles que la condensation du cytoplasme, le rétrécissement du noyau ou la dégradation de l'ADN.

Voici un résumé simplifié des principales données obtenues concernant la mise en place de la mort cellulaire chez les animaux. Les **caspases**, mises en évidence chez *Caenorhabditis elegans*, jouent un rôle clé dans l'activation de la mort cellulaire. Ce sont des protéases à cystéine clivant leur substrat au niveau d'un résidu aspartate (Hengartner and Horvitz, 1994). Un grand nombre de clivages de protéines observés au cours de l'apoptose sont réalisés par les caspases. Il existe deux voies principales d'activation des caspases : la voie des « Récepteurs de mort » et la voie mitochondriale (Figure 14). En présence de leur ligand, les « **Récepteurs de mort** » (DR, Death Receptor) membranaires sont capables de se lier, *via* leur « Death Domain » cytoplasmique, à des molécules adaptatrices cytoplasmiques possédant également un « Death Domain » (Kaufmann and Hengartner, 2001). Une fois ce complexe inducteur formé, des changements de conformation permettent la fixation de la caspase 8, qui est ainsi activée, et susceptible d'activer ensuite d'autres caspases. La **voie mitochondriale** fait appel au re-largage du cytochrome c et d'autres polypeptides mitochondriaux de la mitochondrie vers le cytoplasme (Kaufmann and Hengartner, 2001). Ce phénomène est possible grâce au recrutement, dans la membrane externe de la mitochondrie, des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak. Dans la membrane mitochondriale, ces protéines changent de conformation et forment des oligomères qui permettent la libération du cytochrome c. Une fois dans le cytoplasme, celui-ci se lie à la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor) et provoque son oligomérisation. La procaspase 9 et Apaf-1 forment alors un complexe appelé « apoptosome », capable d'activer la caspase 3.

Un nombre très faible de protéines homologues des différents protagonistes décrits ci-dessus a pu être identifié dans les génomes de plantes séquencés. Parmi ces homologues identifiés chez les plantes, leur fonction dans la régulation de la mort cellulaire a été étudiée. De plus, les régulateurs animaux ont été testés chez les plantes afin d'identifier des homologues fonctionnels. Voici différents exemples résultant de ces deux approches et permettant une meilleure compréhension de l'exécution de la mort cellulaire chez les plantes :

- L'étude des **homologues des caspases** (CLP, Caspase-Like Proteins) a permis d'identifier des para- et métacaspases qui ne contiennent pas le motif correspondant au site actif des caspases, mais qui présentent de fortes homologies avec celles-ci. Les études réalisées sur l'unique métacaspase de la levure, Yca1, suggèrent que les métacaspases pourraient être des protéases exécutrices de la mort cellulaire chez les plantes (Madeo et al., 2002). Les enzymes végétales VPE (Vacuolar Procession Enzyme) possèdent une homologie structurale importante avec les caspases animales (Hofius et al., 2007). Elles ont d'ailleurs une activité caspase-like nécessaire à l'exécution de la HR.
- Le **gène BAX** active la mort cellulaire chez les animaux en interagissant avec la membrane de la mitochondrie (Lam et al., 1999) (Figure 14). L'induction d'une PCD, *via* la surexpression de *BAX* chez les plantes, requiert également le domaine d'adressage à la mitochondrie de *BAX* (Lacomme and Santa Cruz, 1999). De plus, le cytochrome c est re-

largué dans le cytosol au cours des PCD, chez le Tabac notamment, suggérant un rôle important de la mitochondrie dans les PCD végétales (Lam, 2004). Le gène *Bax-Inhibitor 1* (*BI-1*) est capable de supprimer la mort cellulaire induite par le gène *BAX* chez les animaux (Xu and Reed, 1998), mais également chez *Arabidopsis* (Huckelhoven et al., 2003). En effet, un homologue de ce gène a été identifié dans le génome d'*Arabidopsis*, *AtBI-1* (Danon et al., 2000).

➤ Le gène ***Defender against Apoptotic Death 1*** (*DAD1*) est un suppresseur de la mort cellulaire, découvert chez le hamster, possédant un homologue chez *Arabidopsis* et chez le Riz (Alvarez, 2000). Cet homologue de *DAD1* chez *Arabidopsis* est exprimé de manière constitutive dans plusieurs organes, dont les feuilles. Chez les animaux, la fonction exacte de *DAD1* dans la mort cellulaire est encore mal comprise mais ce gène coderait une sous-unité d'un complexe oligosaccharyltransférase des mammifères. Des études ont montré que *DAD1* est un gène hautement conservé au sein des règnes animaux et végétaux, et *DAD1* pourrait être un régulateur négatif universel de la mort cellulaire programmée (Hoeberichts and Woltering, 2003).

➤ Plusieurs motifs de similarité ont pu être identifiés entre **APAF-1** (Figure 14), qui régule la mort cellulaire chez les animaux, et des protéines codées par des gènes de résistance régulant la HR chez les plantes (van der Biezen and Jones, 1998a). Ainsi, les gènes de résistance *RPM1*, *RPS2*, *RPP5*, *N* et *L6* possèdent environ 50% de similarité avec *APAF-1*. Les produits de ces gènes *R* agiraient en inhibant, de manière constitutive, la mort cellulaire et pourraient l'activer après avoir interagi avec des facteurs d'avirulence.

➤ Enfin, des résultats récents ont montré que **l'autophagie**, contribuerait à l'exécution de la HR chez les plantes (Hofius et al., 2009). L'autophagie, bien étudiée chez les animaux, est un mécanisme vésiculaire de digestion du contenu cellulaire des Eucaryotes menant à la mort cellulaire (Mizushima, 2007). Ainsi, la HR conditionnée par *RPS4*, *via* *EDS1*, implique la mise en place de la machinerie d'autophagie (Hofius et al., 2009).

Les approches par analogie avec la mort cellulaire programmée chez les animaux ont révélé quelques pistes sur les gènes impliqués dans l'exécution de la HR chez les plantes. Cependant, devant la difficulté d'identification de régulateurs communs entre les voies de PCD végétales sur animales, d'autres approches sans *a priori* ont été entreprises.

I.3.2.2 Approches moléculaires

Au-delà de ces approches par analogie, des approches sans *a priori* ont été développées, chez les plantes, visant à identifier des gènes clé du contrôle de la mort cellulaire hypersensible. Ainsi, des gènes dont l'activation est rapide, très localisée et spécifique des interactions incompatibles ont été caractérisés. Ils peuvent servir de marqueurs moléculaires de la HR, et représenter des régulateurs putatifs de cette réponse (Pontier et al., 1999). Par exemple, le gène ***HSR203J*** (*HyperSensitivity Related 203J*), identifié chez le Tabac, est activé spécifiquement durant la HR, plusieurs heures avant l'apparition des premières lésions (Pontier et al., 1994). Ce gène ne semble pas nécessaire à d'autres processus physiologiques et est activé uniquement dans les cellules inoculées par un agent pathogène avirulent. Le gène *HSR203J* code une sérine hydrolase à activité estérase

Tableau 3. Liste des clones *Athsr* et fonctions putatives.

Clone	Locus	Annotation TAIR
Athsr1	At3g28910	MYB family transcription factor (AtMYB30)
Athsr2	At5g15090	Outer mitochondrial membrane protein porin (Voltage-dependent anion-selective channel protein)
Athsr3	At3g22370	Isoform of alternative oxidase (AOX1A)
Athsr4	At3g50930	AAA-type ATPase family protein
Athsr5	At5g63970	Copine-related
Athsr6	At2g02180	Identical to tobamovirus multiplication protein (TOM3)
Athsr7	At3g14990	4-methyl-5(b-hydroxyethyl-thiazolenmonophosphate) biosynthesis protein

(Baudouin et al., 1997). Son expression en orientation antisense chez le Tabac conduit à une accélération de la HR et à une amélioration de la résistance aux agents pathogènes (Tronchet et al., 2001). Cela suggère un rôle dans l'établissement ou dans la limitation de la mort cellulaire.

Un autre gène peut servir de marqueur moléculaire de la HR: le gène *HIN1* (*Harpin-Induced 1*) (Gopalan et al., 1996). La harpine est un éliciteur protéique bactérien capable d'induire la HR. *HIN1* a été isolé chez le Tabac et se comporte comme *HSR203J* à la différence près qu'il est également activé pendant les stades avancés de la sénescence (Pontier et al., 1999). C'est donc un marqueur de mort cellulaire plus général que *HSR203J*. La fonction biochimique de *HIN1* n'est pas encore connue mais il existe des homologues avec *NDR1*, qui est nécessaire aux mécanismes de défense impliquant des gènes *R* chez *Arabidopsis* (Tornero et al., 2002b), et avec des régions d'ATPases et ATP synthases de mitochondries chez différents organismes (Gopalan and He, 1998). Il existerait donc une interaction entre la mort cellulaire liée à la sénescence et celle liée à la HR (Pontier et al., 1999). Ces deux marqueurs, *HSR203J* et *HIN1*, possèdent donc des profils d'activation spécifiques et peuvent être utiles pour étudier les mécanismes menant à la mort cellulaire.

Chez *Arabidopsis*, une étude pour identifier des **marqueurs moléculaires de la HR** a été effectuée en 1999 au sein de l'équipe (Lacomme and Roby, 1999). Ils ont développé un système expérimental pour identifier les gènes activés pendant la HR et dont l'expression ne dépend pas d'une nouvelle synthèse protéique. Pour cela, du cycloheximide a été utilisé pour inhiber la synthèse protéique puis des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* ont été inoculées avec une bactérie avirulente. Des gènes exprimés spécifiquement ou préférentiellement pendant la HR ont alors été isolés et appelés *Athsr* (*Arabidopsis thaliana hyper-sensitivity-related*). Ces gènes se répartissent en 7 familles (Tableau 3). Ces gènes sont donc de bons candidats pour la régulation des événements précoces des programmes de mort cellulaire. En utilisant cette approche, le gène *Athsr1* (*AtMYB30*) a pu être identifié (Lacomme and Roby, 1999). Ce gène étant le sujet central de cette thèse, ses caractéristiques seront décrites dans la partie Introduction IV.1.

I.3.2.3 Approches génétiques

Parmi les stratégies mises en place pour identifier les gènes impliqués dans l'exécution et la régulation de la mort cellulaire liée à la HR, la recherche de mutants pour lesquels cette mort cellulaire est dérégulée négativement (mutants présentant une HR diminuée ou retardée) ou positivement (mutants présentant des lésions spontanées de type HR) s'est avérée très utile (Greenberg and Ausubel, 1993; Dietrich et al., 1994; Lorrain et al., 2003). Ainsi, un certain nombre de mutants présentant une mort cellulaire spontanée ressemblant à celle liée à la HR ont d'abord été identifiés chez le Maïs (Hoisington et al., 1982) et ont été appelés « **mutants lésions spontanées** » (Lesion Mimic Mutants, LMM). Ils ont maintenant été identifiés chez d'autres plantes telles *Arabidopsis*, le Riz ou l'Orge. De nombreux LMM déclenchent une augmentation de la production de SA, de l'expression des gènes de défense et une résistance accrue face à certains agents pathogènes, ce qui suggère que leur mutation est liée aux mécanismes de défense (Shirasu and Schulze-Lefert, 2003).

Chez Arabidopsis, 41 LMM ont été identifiés, dont 35 **mutants d'initiation** qui sont altérés dans l'initiation de la mort cellulaire, et 6 **mutants de propagation** pour lesquels le contrôle du taux et de l'extension des lésions est altéré (*acd1*, *acd2*, *lsd1*, *dll1*, *acd11* et *vad1*), et qui sont donc affectés dans les gènes contrôlant la suppression ou la limitation de la mort cellulaire (Lorrain et al., 2003; Lorrain et al., 2004). Certains LMM initient la HR pour un niveau d'inoculum pathogène plus faible (*acd1* et *acd2*), ou développent une HR accélérée (*cpn1*), ou présentent une HR incontrôlée (*lsd1*, *acd1* et *acd2*), ou enfin possèdent une HR partiellement ou totalement supprimée (*acd6*, *agd2*, *dnd1*, *hrl1*) (Lorrain et al., 2003). Plusieurs de ces gènes mutés ont été identifiés :

- **CPN1** (*CoPiNe1*) coderait une protéine calcium-dépendante de liaison aux phospholipides qui empêcherait le déclenchement de la mort cellulaire, quand les flux de calcium ne sont pas induits par des agents pathogènes, et qui inhiberait donc la HR (Jambunathan et al., 2001).
- **LSD1** (*Lesion Simulating Disease resistance response1*) est une protéine de type Zinc-finger qui régule négativement une voie de signalisation SA-dépendante menant à la HR (Aviv et al., 2002). La perte de *LSD1* conduit à une augmentation de la résistance basale.
- **DND1** (*Defense, No Death1*) et **HLM1** (*HR-like Lesion Mimic1*) sont des protéines membranaires appartenant à la famille des canaux cationiques CNGC (Clough et al., 2000; Lorrain et al., 2003). Ce sont des canaux peu sélectifs qui interviennent en aval des voies de signalisation. Une mutation de *HLM1* affecte positivement la HR et la résistance à de nombreux pathogènes (Balagué et al., 2003). *DND1* semble avoir une fonction distincte car, contrairement à *HLM1*, il est exprimé constitutivement à des niveaux élevés et est réprimé lors d'une inoculation par un pathogène (Genger et al., 2008). De plus, les mutants *dnd1* ne sont pas affectés dans la limitation de la croissance des pathogènes avirulents.
- **VAD1** (*Vascular-Associated Death1*) code une protéine membranaire qui pourrait jouer un rôle dans la signalisation hormonale, l'éthylène en particulier, menant à la mort cellulaire (Lorrain et al., 2003; Bouchez et al., 2007).

De nombreux gènes sont donc impliqués dans l'exécution de la mort cellulaire liée à la HR et leur identification à l'aide des différentes stratégies décrites dans cette partie a permis d'améliorer la compréhension de ce système. La régulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation des réponses de défense s'effectue grâce à divers facteurs de transcription. En effet, de nombreuses familles de **facteurs de transcription** jouent un rôle majeur dans la mise en place des réponses de défense, et leurs modes d'action sont décrits dans la partie suivante.

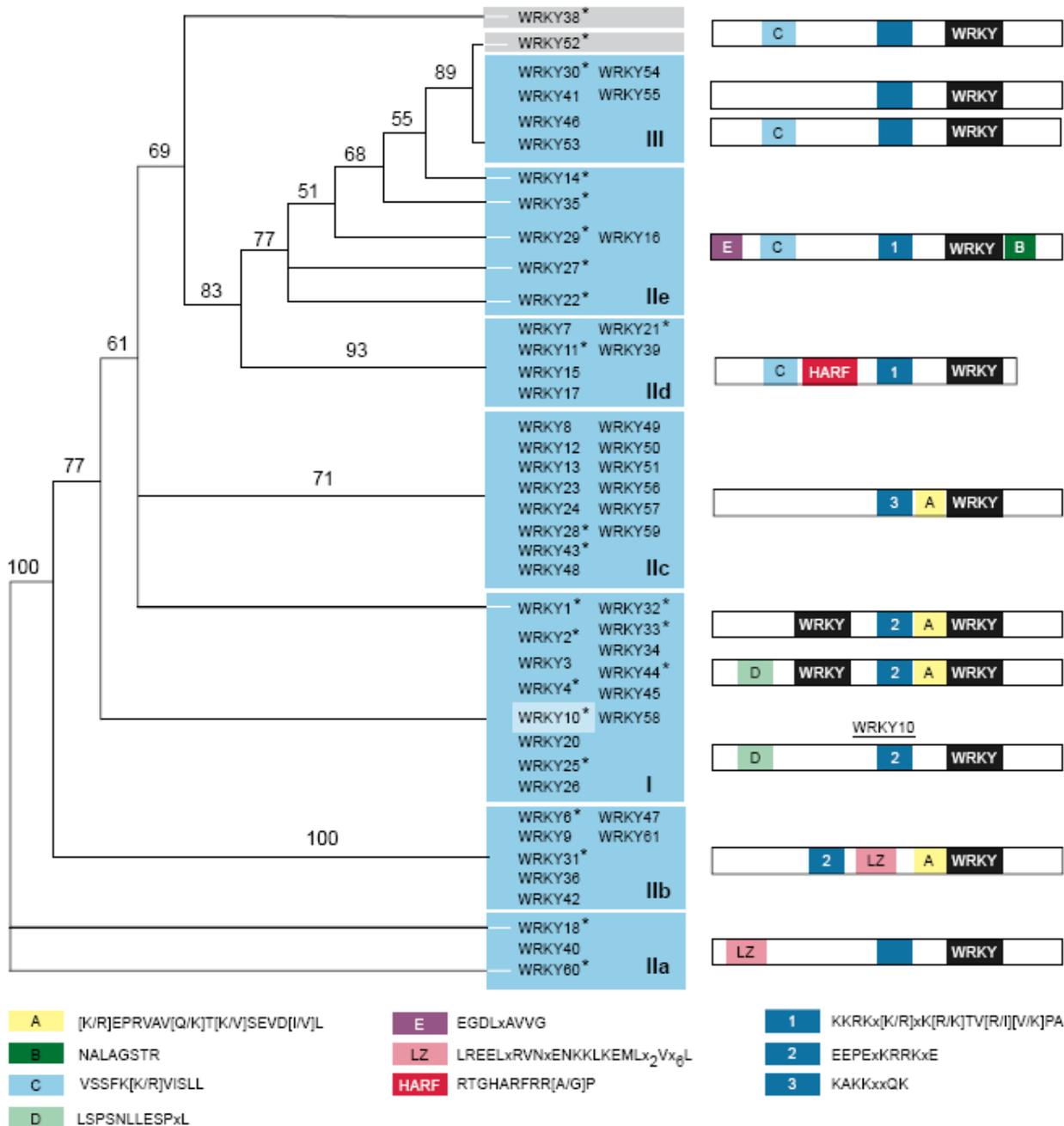


Figure 15. Analyse phylogénétique de 58 membres de la famille WRKY (Eulgem et al., 2000). Une représentation schématique typique des membres de chaque sous-groupe est visible sur la droite de la figure. Les domaines WRKY sont représentés en noir. Les motifs 1, 2 et 3 pourraient correspondre à des signaux de localisation nucléaire. Les motifs A-E sont conservés au sein de certains sous-groupes de WRKY. Les WRKY apparaissant dans un cadre gris n'ont pu être placés dans aucun sous-groupe.

II. Régulation transcriptionnelle de la mise en place de la défense

Chez les Eucaryotes, l'expression de gènes codant pour des protéines est soumise à une régulation très finement élaborée et contrôlée. Le principal niveau de contrôle se situe au niveau de la transcription. Les facteurs de transcription (FT) ont un rôle de régulateur positif ou négatif sur cette étape. En effet, ils peuvent se fixer sur les séquences *cis* situées sur le promoteur de leur gène cible *via* leur domaine de liaison à l'ADN.

Des études globales ont permis de montrer que les principales différences entre les différents types de défense (PTI, ETI, défense basale) sont peu qualitatives et plutôt quantitatives et/ou temporelles (Katagiri, 2004). Ceci suggère que la plupart des agents pathogènes déclenchent un réseau de signalisation commun. Les réponses progressives associées à l'immunité indiquent l'existence d'un circuit de régulation complexe comprenant des activateurs, et des répresseurs de l'expression des gènes de défense (Eulgem, 2005).

II.1 Rôle des facteurs de transcription de type WRKY dans la réponse aux agents pathogènes

Les membres de différentes familles de facteurs de transcription modulent le transcriptome associé à la défense (Eulgem, 2005). En particulier, la présence de sites de fixation des FT WRKY (C/TTGACC/T, W boxes) dans de nombreux promoteurs de gènes de défense d'*Arabidopsis* suggère un rôle majeur et central des FT WRKY dans la régulation de la défense.

Les FT WRKY se caractérisent par la présence d'un **domaine WRKY**, comprenant une séquence conservée adjacente à un doigt de zinc, et impliqué dans la liaison à l'ADN. Le nombre de domaines WRKY et la structure du doigt de zinc permet de classer les WRKY en trois grands groupes (Eulgem et al., 2000). Ces groupes sont subdivisés en fonction d'homologies de séquences et de la présence éventuelle d'autres motifs (Figure 15). Un rôle biologique des WRKY au cours du développement végétal (Robatzek and Somssich, 2001; Luo et al., 2005) et plus récemment au cours de la défense (Eulgem and Somssich, 2007) a pu être mis en évidence.

II.1.1 WRKY impliqués dans les réponses de défense et régulation de leur activité

II.1.1.1 WRKY régulateurs des réponses de défense

Plusieurs travaux ont révélé l'importance de **WRKY70** sur la balance entre l'activation des voies de signalisation SA-dépendantes et la répression des voies JA-dépendantes (Li et al., 2006). La mutation de WRKY70 rend les plantes plus sensibles à *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* et *Botrytis cinerea* (Abuqamar et al., 2006). De plus, WRKY70 est nécessaire à la défense basale et la résistance spécifique *via* le gène *RPP4* de résistance à *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Knoth et al., 2007). De façon similaire, les mutants affectés dans l'expression de **WRKY33** sont plus sensibles à l'infection par *Botrytis cinerea* et *Alternaria brassicicola* (Zheng et al., 2006).

Une branche phylogénétique, le **sous-groupe IIa** des gènes WRKY (Figure 15), comprenant WRKY18, WRKY40 et WRKY60, joue un **rôle important et partiellement**

redondant dans la régulation de la défense. En effet, les double-mutants *wrky18/wrky40* et *wrky18/wrky60* sont plus résistants à *Pseudomonas syringae* DC3000 mais plus sensibles à *Botrytis cinerea* (Xu et al., 2006). Le double-mutant *wrky18/wrky40* est aussi plus résistant face à une autre souche virulente de Mildiou, *Golovinomyces orontii* (Shen et al., 2007). De façon intéressante, dans ces deux études, les simples mutants se comportaient comme le sauvage, suggérant que plusieurs FT WRKY de ce sous-groupe agissent, de façon redondante, comme régulateurs négatifs de la résistance. Chez l'Orge, il a été montré que deux FT WRKY, membres du sous-groupe IIa, suppriment les défenses basales face à une souche virulente de *Blumeria graminis* (Eckey et al., 2004; Shen et al., 2007). Ces résultats montrent que les membres du sous-groupe IIa peuvent avoir un **effet négatif ou positif sur les réponses de défense**. En accord avec cela, il a été mis en évidence que la surexpression de WRKY18 seul provoque une résistance basale accrue face à *Pseudomonas syringae*, alors que sa surexpression combinée avec d'autres membres du sous-groupe IIa abolit ce phénotype (Xu et al., 2006).

De façon intéressante, un effet négatif sur les réponses de défense a également été mis en évidence pour des WRKY du sous-groupe IIc. Ainsi, la résistance basale déclenchée par une souche virulente de *Pseudomonas syringae* est accrue dans les mutants *wrky7* et *wrky11/wrky17* (Journot-Catalino et al., 2006; Kim et al., 2006).

II.1.1.2 Régulation de l'activité des WRKY impliqués dans les réponses de défense

Les motifs leucine zipper des protéines WRKY du sous-groupe IIa seraient impliqués dans la **formation d'homo- ou hétéro-dimères entre membres** de ce sous-groupe (Xu et al., 2006). Par exemple, *HWRKY1*, *HWRKY2* et *OsWRKY71* forment des homodimères *in vivo* (Xie et al., 2006; Shen et al., 2007). La capacité des FT WRKY du sous-groupe IIa à former des dimères pourrait permettre d'expliquer, au moins en partie, les données contradictoires sur les effets positifs ou négatifs (Xu et al., 2006) des WRKY du sous-groupe IIa sur la résistance basale à *Pseudomonas* (Eulgem and Somssich, 2007). Les conditions environnementales pourraient affecter la balance entre les différents dimères WRKY IIa et par conséquent modifier l'issue de l'interaction plante-pathogène.

Le « **motif D** » de WRKY25 et WRKY33 est un motif conservé chez plusieurs FT WRKY du groupe I (Eulgem et al., 2000) (Figure 15). Ce motif peut être phosphorylé par MPK4, une MAPK qui réprime la voie SA (Andreasson et al., 2005). WRKY25 et WRKY33 ne semblent pas interagir directement avec MPK4, mais seraient associés à cette MAPK *via* le facteur de couplage nucléaire MKS1. Une caractéristique intéressante du motif D est d'être riche en dimères « Ser-Pro » qui constituent le **site préférentiel de phosphorylation par les MAPK**. Ainsi chez le Tabac, le FT NtWRKY1 appartenant au groupe I, est phosphorylé par la MAPK SIPK (Menke et al., 2005). Cette phosphorylation accroît *in vitro* l'activité de fixation de NtWRKY1 aux W boxes. De plus, la co-expression de SIPK et de NtWRKY1 déclenche rapidement une HR.

Enfin, les FT WRKY du sous-groupe IIc contiennent un « **motif C** » qui est un **domaine de fixation de la calmoduline** (Park et al., 2005) (Figure 15). Ainsi que plusieurs autres régulateurs de défense connus, les FT WRKY du sous-groupe IIc pourraient

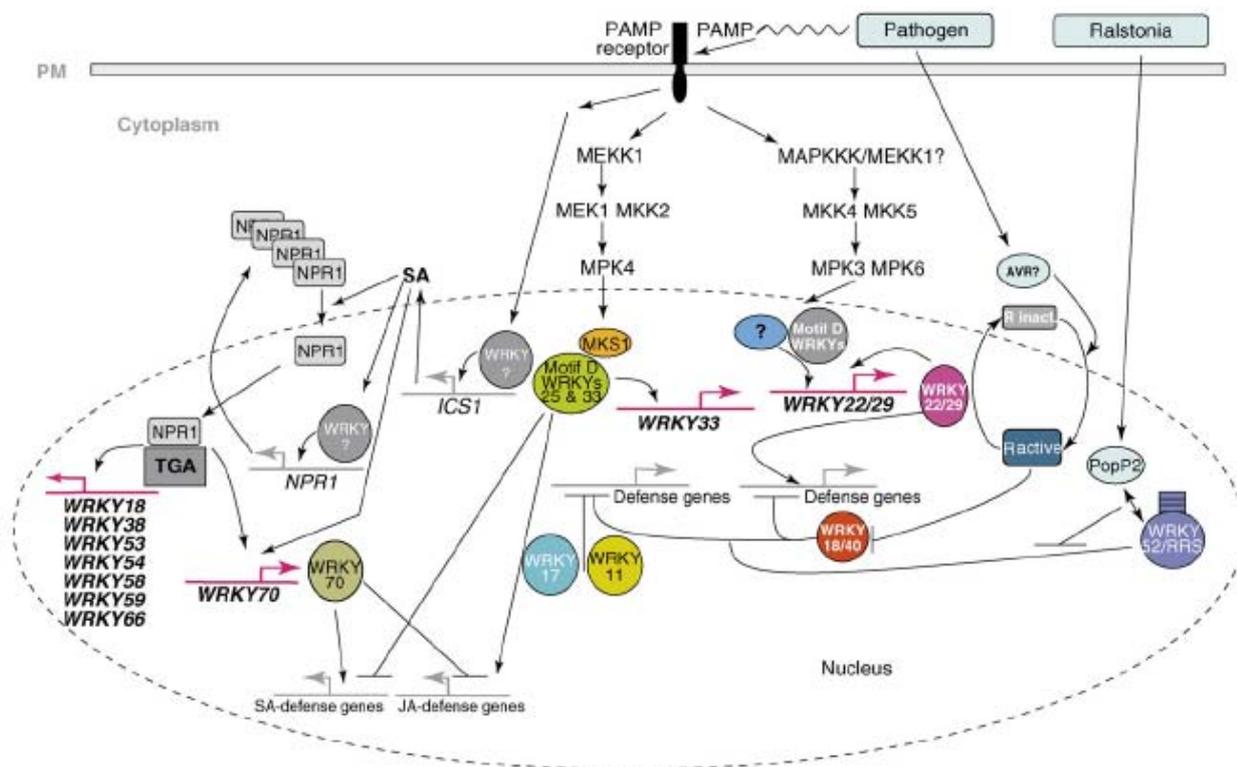


Figure 16. Le réseau WRKY (Eulgem and Somssich, 2007).

La perception des PAMPs par un récepteur de la membrane plasmique déclenche une transduction du signal *via* des cascades de MAPK. Dans le cas de la résistance spécifique, une reconnaissance R/Avr déclenche ces voies de signalisation. Dans les deux cas, des modifications rapides de l'expression des gènes sont assurées par des facteurs de transcription tels les WRKY. La production de SA déclenchée par la reconnaissance de l'agent pathogène provoque le clivage des oligomères de NPR1, ce qui résulte en une accumulation de monomères de NPR1 dans le noyau. NPR1 s'associe alors avec des FT TGA au niveau du promoteur de plusieurs WRKY. Tous ces WRKY vont alors pouvoir activer ou réprimer leurs cibles en aval. Les autres événements présentés dans cette figure sont décrits dans le texte.

percevoir et répondre aux fluctuations de la concentration en Ca^{2+} cytosolique déclenchées par les agents pathogènes (Eulgem and Somssich, 2007).

De nombreux FT WRKY sont donc impliqués dans la régulation des réponses de défense et ils présentent la particularité de fonctionner de manière interconnectée.

II.1.2 Le réseau WRKY : une régulation complexe des réponses de défense

La réponse immunitaire végétale est associée à une modulation fine de l'expression d'un grand nombre de FT WRKY (Dong et al., 2003). En effet, après activation des défenses SA-dépendantes, au moins 49 gènes WRKY présentent une modification de leur expression au travers de différentes vagues d'accumulation ou de répression des transcrits. Leur promoteurs sont statistiquement enrichis en W boxes, suggérant un autocontrôle ou une régulation par d'autres WRKY. En accord avec cela, il a été montré lors d'expériences de co-transfection que de nombreux WRKY interagissent avec leur propre promoteur ou avec d'autres gènes WRKY (Cormack et al., 2002; Robatzek and Somssich, 2002). De plus, l'étude de mutants d'insertion a révélé que des gènes WRKY régulent positivement ou négativement l'expression d'autres membres de la famille WRKY (Kalde et al., 2003; Journot-Catalino et al., 2006). Ces observations suggèrent un lien fonctionnel entre les différents WRKY *via* des mécanismes d'autorégulation ou de régulation croisée (Eulgem and Somssich, 2007). Les FT WRKY forment un réseau qui assure une amplification et une diversité des signaux de défense menant à la résistance.

Quelques caractéristiques du réseau WRKY sont désormais connues (Figure 16):

- Comme les WRKY du groupe I contiennent un motif D (voir ci-dessus) capable d'être phosphorylé par une MAPK, ils sont susceptibles d'être **les premières protéines WRKY activées en aval de la cascade de MAPK**. Leurs cibles pourraient inclure des gènes WRKY du groupe IIe, WRKY22 et WRKY29 qui sont surexprimés après une cascade de MAPK induite par les PAMPs, et qui contiennent de nombreuses W boxes dans leur promoteur (Asai et al., 2002). De plus, WRKY22 et WRKY29 peuvent auto-amplifier leur expression *via* une boucle de rétrocontrôle positif.
- La **synthèse de SA et l'expression de NPR1**, un régulateur clé des réponses de défense, sont partiellement contrôlées par des WRKY. En effet, *NPR1* est régulé par des WRKY qui interagissent avec deux W boxes situées dans sa région 5'UTR (Yu et al., 2001) (voir Introduction II.2). De même, l'expression du gène *ICS*, impliqué dans la production de SA, est certainement régulée par des WRKY. Cependant, l'identité des WRKY régulant l'expression de *NPR1* ou *ICS* est encore inconnue à ce jour.
- Huit gènes WRKY (WRKY18, 38, 53, 54, 58, 59, 66 et 70) ont été identifiés comme des **cibles directes de NPR1** (Wang et al., 2006). Ainsi, l'expression de ces huit gènes est réduite ou abolie dans le mutant *npr1-1*. L'utilisation de mutants d'insertion a permis de confirmer le rôle de ces huit gènes WRKY dans la régulation des défenses NPR1-dépendantes.
- Le facteur de transcription WRKY52 (RRS1-R) appartient au groupe III mais possède également les **caractéristiques d'une protéine R**. RRS1-R interagit au sein du noyau avec PopP2, un effecteur de la bactérie phytopathogène *R. solanacearum* (Deslandes et

al., 2003). Une mutation dans le domaine WRKY de RRS1-R a permis de mettre en évidence son rôle de régulateur négatif des réponses de défense (Noutoshi et al., 2005). Ainsi, son interaction avec PopP2 empêcherait RRS1-R de réguler ses cibles et activerait donc la défense par dé-répression.

Toutes ces données montrent que les WRKY opèrent à différents niveaux des voies de transduction menant à la résistance. L'activité des WRKY régulant positivement la défense est contrebalancée par celle des WRKY régulant négativement la défense, suggérant l'existence de mécanismes de rétrocontrôle limitant l'amplitude et la durée de la réponse immunitaire (Eulgem and Somssich, 2007).

II.2 La famille TGA et son rôle dans l'établissement de la résistance

L'induction de la résistance systémique acquise (SAR) est corrélée avec l'expression des gènes *PR* (Durrant and Dong, 2004). Certains de ces gènes codent pour des protéines avec une activité antimicrobienne conférant une résistance à un large spectre d'agents pathogènes (Van Loon and Van Strien, 1999). D'autre part, une augmentation de la production de SA est essentielle à **l'établissement de la SAR**. Chez Arabidopsis, l'expression de gènes SA-dépendants et la mise en place de la résistance nécessitent la fonction de NPR1 (Nonexpressor of PR1) (Cao et al., 1994). En effet, le mutant *npr1* est affecté dans la mise en place de la SAR et de la résistance basale (Cao et al., 1997; Delaney, 1997).

NPR1 régule l'expression des gènes *PR* en tant que cofacteur des TGA, des FT qui possèdent une structure de type « basic leucine zipper ». En effet, il a été montré que NPR1 interagit *in planta* avec des FT TGA (Subramaniam et al., 2001; Fan and Dong, 2002). Parmi les 10 TGA identifiés chez Arabidopsis, 7 TGA (TGA1-7) interagissent avec NPR1, mais deux d'entre eux (TGA1 et TGA4) n'interagissent avec NPR1 qu'en présence de SA. En effet, l'interaction entre TGA1 et NPR1 nécessite une réduction SA-dépendante des pont disulfures de TGA1 (Despres et al., 2003). Un traitement SA conduit également à une réduction des résidus cystéines de NPR1, ce qui provoque le passage de NPR1 d'une forme oligomérique à une forme monomérique (Mou et al., 2003). Sous forme monomérique, NPR1 est alors transloqué du cytosol vers le noyau où il favorise l'interaction de TGA2 et TGA3 avec leur séquences cibles (Fan and Dong, 2002; Johnson et al., 2003). Des expériences de CHIP ont montré que TGA2 et TGA3 se fixent de manière SA-dépendante sur le promoteur de *PR1* (Johnson et al., 2003).

Des approches moléculaires visant à étudier le **rôle des TGA dans la défense** ont produit des résultats conflictuels. La surexpression d'un mutant de TGA2, qui entre en compétition avec tous les autres TGA pour leur fixation sur un promoteur cible, provoque une expression accrue des gènes *PR* (Pontier et al., 2001; Fitzgerald et al., 2005). Par ailleurs, la surexpression de TGA5 protège les plantes contre *Hyaloperonospora arabidopsidis*, sans affecter l'expression des gènes *PR* (Kim and Delaney, 2002). L'étude d'un triple mutant *tga2-1/tga5-1/tga6-1* a montré que ce mutant est altéré dans la mise en place de la SAR, dans la réponse au SA et dans l'induction de *PR1* (Zhang et al., 2003). Cependant, ce triple mutant n'est pas affecté dans la résistance basale et présente même un

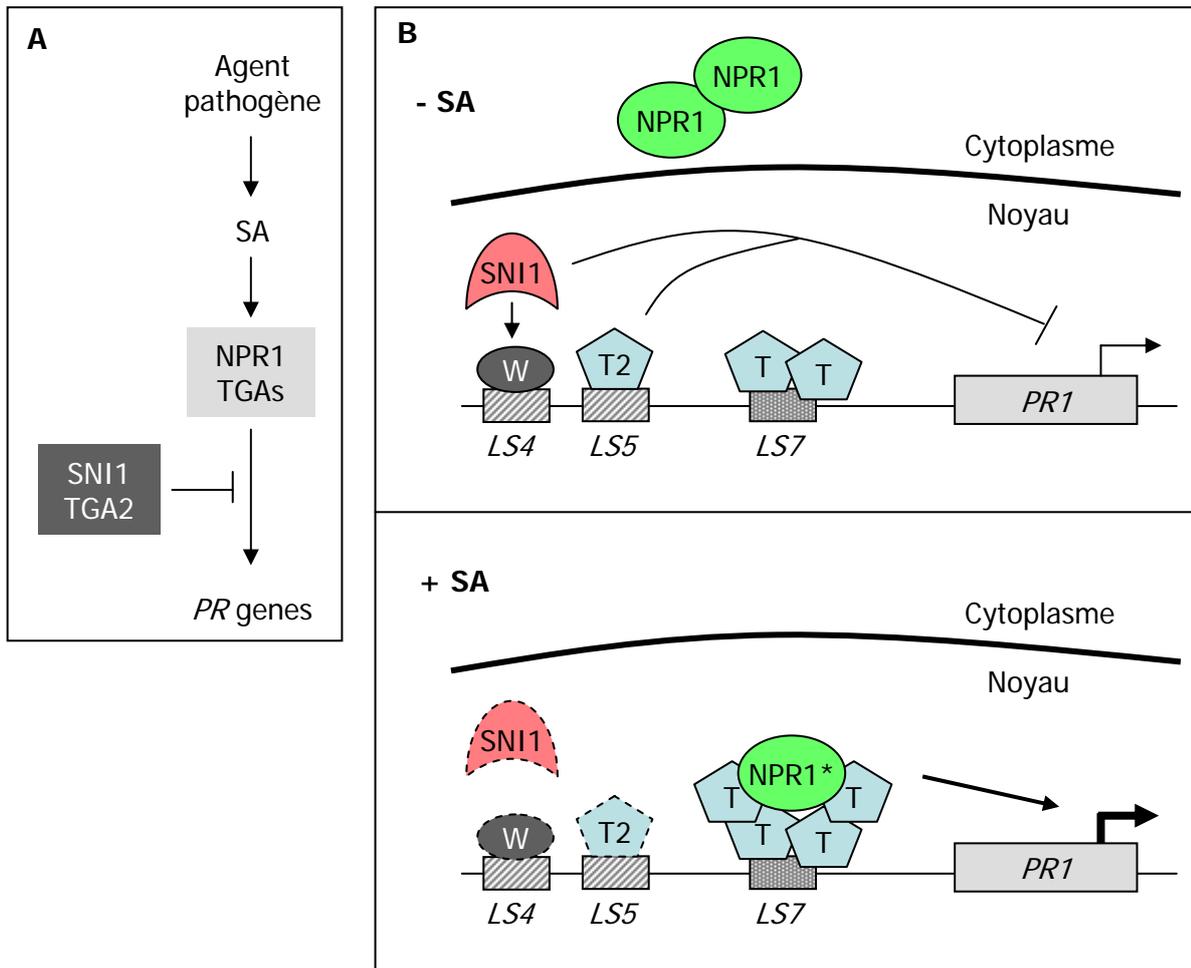


Figure 17. Modèle de régulation de l'expression des gènes *PR* par les TGA (d'après Kesarwani et al., 2007).

(A) Modèle global de régulation des gènes *PR* par les TGA. La perception de l'agent pathogène déclenche une augmentation de la production de SA qui va induire des modifications de NPR1 et des TGA. L'expression des gènes *PR* est alors induite après une levée de la répression exercée par TGA2 et SNI1. **(B)** Modèle de régulation de l'expression de *PR1* montrant le recrutement de différents facteurs en conditions non-induites (-SA) ou induites (+SA). En conditions non-induites, TGA2 et SNI1 répriment l'expression de *PR1* *via* une interaction directe ou indirecte, respectivement, avec des cis-éléments négatifs (*LS4* et *LS5*) du promoteur de *PR1*. Après induction, la répression par TGA2 et SNI1 est levée et la transcription de *PR1* est activée par NPR1 en association avec des TGA (TGA1, TGA3, TGA5 et TGA6).

W, WRKY ; T2, TGA2 ; T, TGA1-6 ; NPR1*, NPR1 monomérique activé.

niveau d'expression basale élevé des gènes *PR*. Ceci suggère qu'au-delà de TGA2, TGA5 et TGA6, d'autres facteurs TGA peuvent être des activateurs transcriptionnels des gènes *PR*. De plus, TGA2, TGA5 et TGA6 pourraient avoir des activités duales. Cette hypothèse est confortée par l'identification d'au moins deux éléments de fixation des TGA dans le promoteur de *PR1*. De façon intéressante, la mutation de ces éléments déclenche des effets opposés sur la transcription de *PR1* (Lebel et al., 1998). Par ailleurs, des résultats récents ont montré que le mutant *tga3-1* présente une sensibilité accrue liée à une expression réduite des gènes *PR* (Kesarwani et al., 2007). Enfin, une nouvelle fonction de répresseur de l'expression des gènes *PR* a été proposée pour TGA2, *via* son interaction avec SNI1 (Suppressor of NPR1 Inducible1) (Kesarwani et al., 2007). Toutes ces données sont résumées dans la figure 17.

Au sein de la famille des FT TGA, la combinaison des différents membres est cruciale et permet la régulation SA-dépendante de gènes de défense, tels *PR1*.

II.3 Les cascades d'activation de facteurs de transcription permettant la réponse à l'ET

L'ET est une hormone qui participe à la régulation de nombreux processus développementaux. De plus, l'ET est un médiateur clé de la réponse des plantes aux stress biotiques ou abiotiques (voir Introduction I.2.4.3).

Une combinaison d'analyses génétiques et moléculaires a permis de montrer qu'une **cascade transcriptionnelle** est impliquée dans la régulation des gènes de réponse à l'ET (Figure 18) (Alonso and Stepanova, 2004; Broekaert et al., 2006). Dans cette cascade, **EIN3** (Ethylene Insensitive), un régulateur positif de la voie de transduction de l'ET, agit en aval de **EIN2**. En effet, EIN2 transmet le signal à la famille de FT EIN3 et déclenche *via* les FT **ERF**, une cascade transcriptionnelle impliquée dans la régulation de gènes de réponse à l'ET (Guo and Ecker, 2004). La transduction du signal ET arrive jusqu'au noyau *via* une dérégulation de EIN2 par CTR1, ce qui conduit à l'activation des FT *EIN3* et *EIN3-like* (EIL) (Chao et al., 1997). Chez *Arabidopsis*, il existe 6 membres de la famille EIN3 (*EIN3* et *EIL1-5*), parmi lesquels *EIN3* et *EIL1* sont les plus proches et les plus importants pour la perception de l'ET (Alonso et al., 2003).

Des études biochimiques et génétiques chez *Arabidopsis* ont permis d'identifier le FT ERF1 comme une cible immédiate du FT EIN3 (Solano et al., 1998). De façon intéressante, la surexpression d'ERF1 permet de réverser le phénotype des mutants *ein2* et *ein3*, ce qui place ERF1 en aval de EIN3. **ERF1** appartient à la famille ERF (Ethylene Response Factors), également appelés EREBP (Ethylene Responsive Element Binding Proteins). Les ERF ont été identifiés chez différentes espèces végétales comme des protéines capables de se fixer à une boîte GCC, présente dans de nombreux gènes inductibles par l'ET, comme les gènes *PR* par exemple (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Zhou et al., 1997). Les ERF interagissent avec la boîte GCC *via* un domaine homologue à celui de la protéine APETALA2 (AP2) d'*Arabidopsis* (Gutterson and Reuber, 2004). La plupart des protéines ERF identifiées fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels (Fujimoto et al., 2000; Onate-Sanchez and Singh, 2002). Cependant, une seconde classe de protéine ERF agit comme des répresseurs transcriptionnels et contiennent un domaine EAR (ERF-associated Amphiphilic Repression)

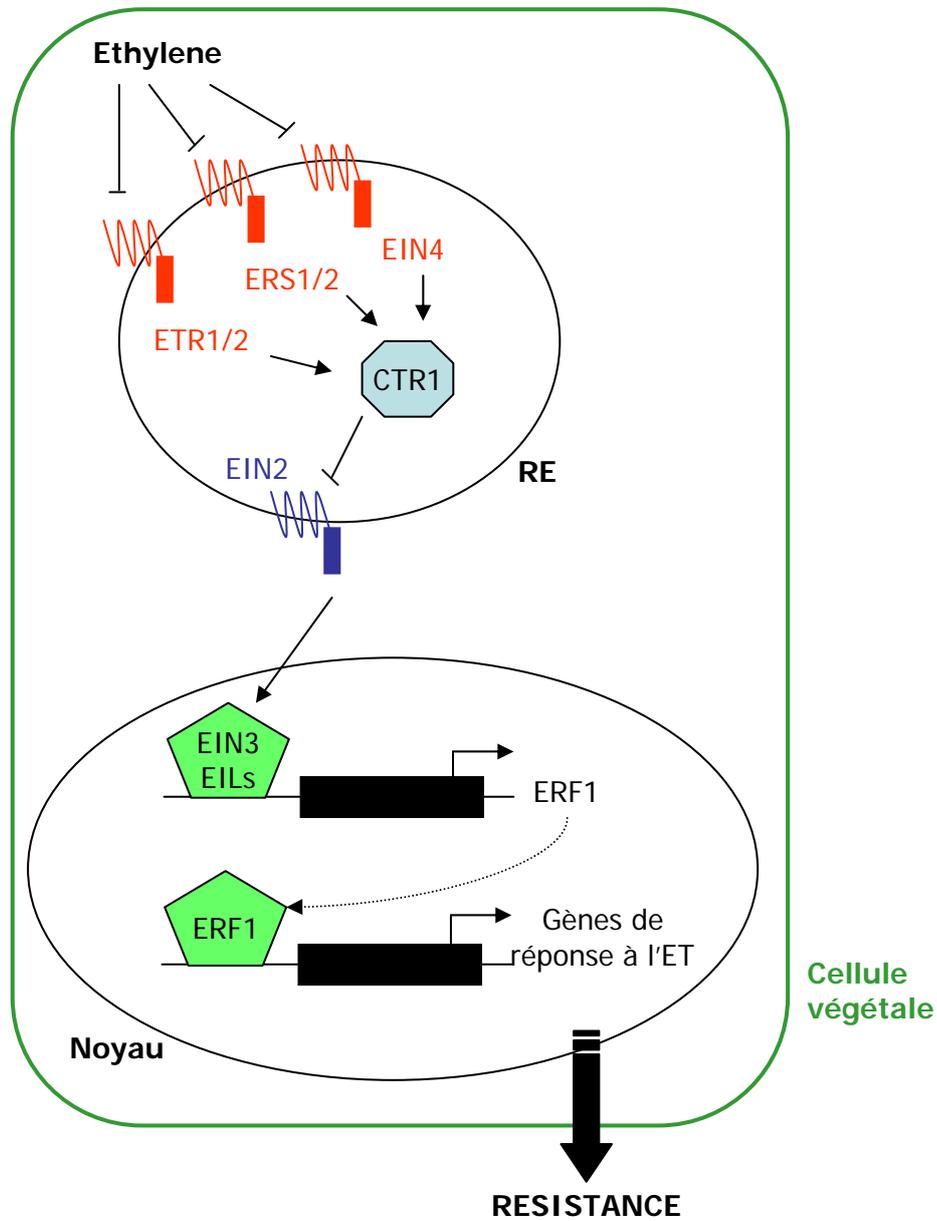


Figure 18. Représentation schématique simplifiée des voies de signalisation en aval de l'ET (d'après Broekaert et al., 2006 et Alonso and Stepanova, 2004).

Chez *Arabidopsis*, l'ET est perçu par une famille de récepteurs localisés dans la membrane du RE, ce qui résulte en une inactivation de ces récepteurs. Ils interagissent ensuite avec une kinase, CTR1, qui est alors inactivée. Ceci provoque la dérégulation de EIN2 qui transmet un signal positif à EIN3/EILs. EIN3 n'est alors plus dégradé par le protéasome et la protéine s'accumule dans le noyau où elle induit l'expression de plusieurs FT, parmi lesquels ERF1. Ces FT vont dans un deuxième temps activer d'autres gènes répondant à l'ET, et activer ainsi la résistance.

(Ohta et al., 2001). Récemment, il a été montré que la surexpression d'ERF4 confère un phénotype d'insensibilité à l'ET et de répression de l'expression des gènes à boîte GCC codant une chitinase et une β -glucanase (Yang et al., 2005). De façon surprenante, la surexpression d'*ERF2* ou *ERF4* conduit à des phénotypes de résistance opposés face à l'agent pathogène nécrotrophe *Fusarium oxysporum* (McGrath et al., 2005). Enfin, dix membres de la famille ERF sont induits à la fois par un traitement au méthyl-JA et par l'infection par un agent pathogène, confirmant ainsi le rôle de ces FT dans la régulation des mécanismes de défense *via* les voies de signalisation JA- et ET-dépendantes.

Les actions spécifiques des différents FT ERF, pouvant activer ou réprimer certains gènes de défense, fournissent certainement un système de régulation précis dépendant du type de stress biotique perçu (Broekaert et al., 2006).

II.4 Les facteurs de transcription de type MYB

« MYB » est un acronyme du mot « MYeloBlastome », désignant un virus responsable de la leucémie chez le Poulet. Le premier gène MYB identifié est l'oncogène *v-myb*, issu du virus du Myeloblastome *avi*aire, et intégré dans le génome du poulet (Klempnauer et al., 1982). La protéine virale v-MYB est impliquée dans la transformation cancéreuse des cellules hématopoïétiques *via* une dérégulation de gènes importants pour le développement cellulaire (Introna et al., 1994).

II.4.1 Caractéristiques et classification des MYB chez les plantes

Chez les plantes, le premier gène MYB, *MYB1*, a été identifié chez le Maïs. Il est impliqué dans la biosynthèse d'anthocyanines (Paz-Ares et al., 1987). Le nombre élevé de facteurs MYB chez les plantes, en comparaison avec les animaux, indique leur importance dans le contrôle des **processus biologiques spécifiques des plantes**.

Une des caractéristiques des FT MYB est de posséder un domaine de fixation à l'ADN, le **domaine MYB**, qui est conservé au sein des MYB identifiés chez les animaux, les végétaux et les levures (Lipsick, 1996). Ce domaine consiste en une à trois répétitions imparfaites, nommées R1, R2 et R3. Chaque répétition est constituée de 50 à 53 acides aminés et code 3 hélices α , dont les 2 dernières forment une structure hélice-tour-hélice qui s'intercale avec l'ADN. De plus, chaque répétition contient des résidus tryptophane, régulièrement espacés, qui forment un « cœur tryptophane » à l'intérieur de la structure tridimensionnelle hélice-tour-hélice (Weston and Bishop, 1989). Ceci stabilise la structure du domaine de fixation à l'ADN.

Etant donné que les protéines MYB possèdent peu de similarités de séquence en dehors du domaine MYB, elles ont été classifiées en fonction du **nombre de répétitions** contenues dans ce domaine MYB. Trois groupes majeurs ont ainsi été formés :

- Les **MYB-R1R2R3**. Il existe seulement 5 gènes de ce type chez Arabidopsis (Stracke et al., 2001). Une filiation directe entre les gènes *AtMYB-R1R2R3* et *c-Myb* est suggérée par la présence d'introns conservés dans les motifs R1 et R3 (Kranz et al., 2000). De plus, ces FT reconnaîtraient les mêmes séquences consensus et possèdent des fonctions similaires dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

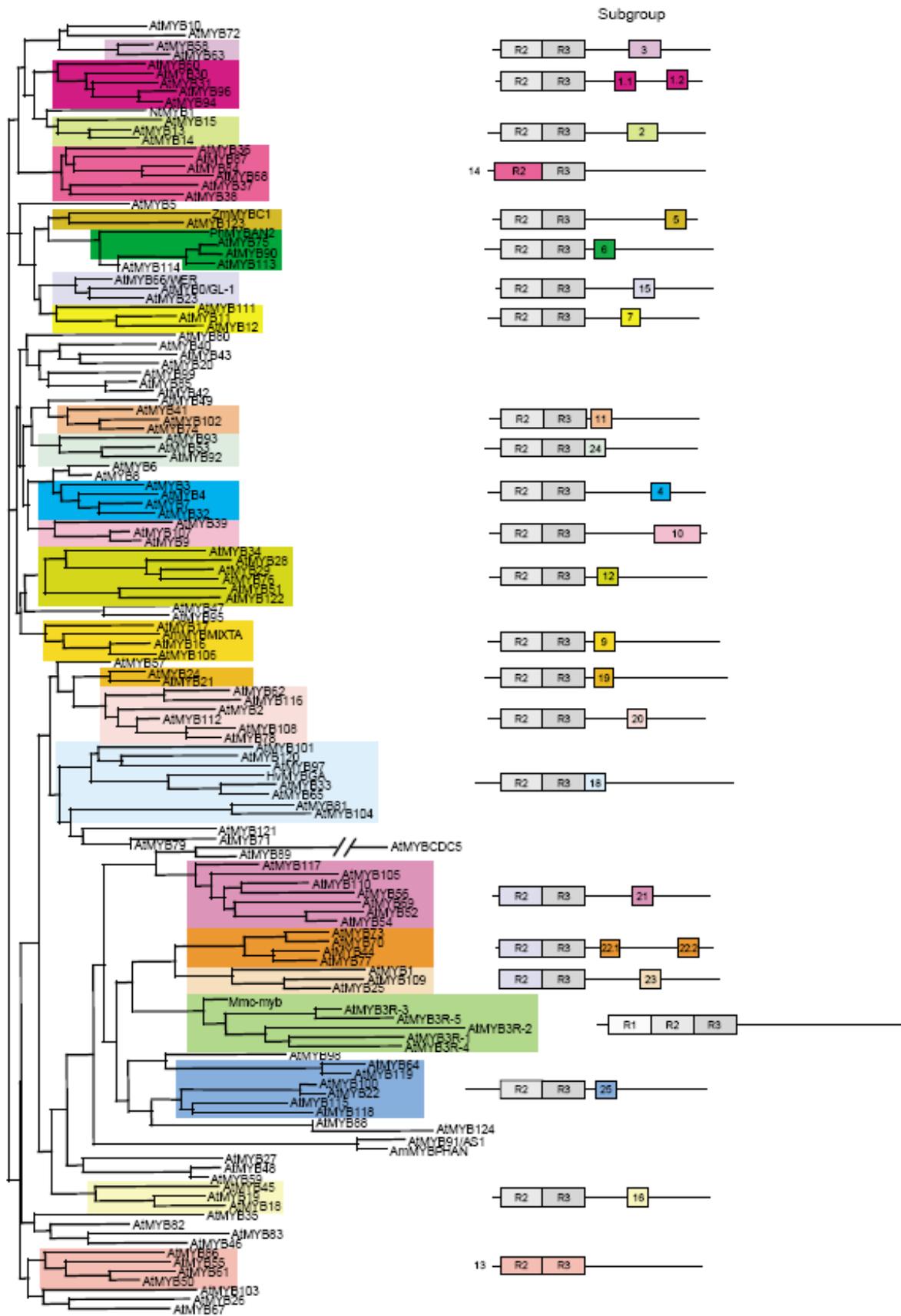


Figure 19. Relations phylogénétiques entre les MYB à 2 ou 3 répétitions chez Arabidopsis (Stracke et al., 2001).

Les facteurs MYB R2R3 et 3R d'Arabidopsis ainsi que des MYB « repères » d'autres espèces sont présentés. X, tout acide aminé.

➤ Les **MYB-R2R3**. Avec ses 126 membres, le groupe des MYB-R2R3 représente le plus grand groupe chez *Arabidopsis* et est divisé en 24 sous-groupes (Stracke et al., 2001) (Figure 19). Ils possèdent 2 répétitions imparfaites qui leur permettent de se lier au sillon majeur de l'ADN, *via* la 3^{ème} hélice de chaque répétition. Leurs fonctions biologiques, sur la base des données fragmentaires disponibles, sont spécifiques des plantes, comme la régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires ou la réponse aux phytohormones.

➤ Les **MYB-R1** et les **MYB atypiques**. Ils possèdent une seule répétition du domaine MYB ou plusieurs répétitions d'un domaine MYB atypique. Ces R1-MYB ou MYB atypiques sont au nombre de 67 chez *Arabidopsis*. Ainsi, on peut citer l'exemple d'AtMYB4R-1 qui possède 4 répétitions MYB du type R2R3 (Stracke et al., 2001).

Les facteurs MYB possèdent également d'autres domaines caractéristiques. En effet, un **domaine acide de trans-activation**, homologue au domaine présent chez c-MYB, a été identifié (Weston and Bishop, 1989). La plupart des MYB ont été reportés comme des régulateurs positifs de la transcription. On peut citer l'exemple d'AtMYB33 et AtMYB65 qui sont impliqués dans le développement de l'anthere (Millar and Gubler, 2005). De plus, des expériences ont montré que la fixation des protéines MYB sur une séquence *cis* spécifique pouvait activer la transcription d'un gène rapporteur (Solano et al., 1995; Ballesteros et al., 2001; Ito et al., 2001a). Cependant, certains MYB agissent comme des répresseurs de la transcription. C'est le cas d'AtMYB4, qui réprime l'expression du gène codant l'enzyme cinnamate-4-hydrolase (Jin et al., 2000), et d'AtMYB32 qui réprime le gène *COMT* chez *Arabidopsis* (Preston et al., 2004). A ce jour, tous les répresseurs identifiés appartiennent au sous-groupe 4 des MYB-R2R3 (Du et al., 2009). La balance entre les activateurs et les répresseurs permet certainement de fournir une grande flexibilité dans le contrôle de la transcription (Jin et al., 2000).

Enfin, les MYB-R2R3 possèdent des **motifs d'acides aminés conservés** dans la partie C-terminale. En effet, quelques courts éléments de séquence (5 à 20 acides aminés) sont communs à plusieurs MYB-R2R3. Ces motifs spécifiques ont été utilisés pour établir une classification de ces **MYB-R2R3 en 24 sous-groupes** (Kranz et al., 1998; Stracke et al., 2001) (Figure 19). Ces motifs pourraient constituer des domaines activateurs ou contribuer à l'attribution d'une fonction particulière à des sous-groupes de gènes (Stracke et al., 2001).

II.4.2 Les MYB végétaux : des FT multifonctions

II.4.2.1 Séquences cibles et fixation à l'ADN

Les facteurs MYB végétaux ont été classés en fonction des motifs d'ADN potentiellement reconnus par leur domaine de fixation à l'ADN (Romero et al., 1998). Ces études d'affinité de liaison des protéines MYB avec des séquences nucléotidiques s'effectuent principalement par le biais d'expériences de type « gel retard » ou de précipitation de l'ADN. Trois familles ont ainsi été établies : les membres de la famille A se lient sur un **MBS de type I** (MYB binding site) (CNGTTR), les membres de la famille B reconnaissent les **MBS de type I et II** (Type II : GTTWGTTTR) et les membres de la famille C fixent le **MBS de type IIG** (GKTWGGTR) (N=A/T/C/G, K=G/T, R=A/G, W=A/T) (Romero et al., 1998). Cette approche phylogénétique permet de regrouper et de classer les gènes *MYB* entre différentes

espèces sur la base des homologies entre les éléments *cis* régulateurs fixés. Les MYB ont la particularité de pouvoir reconnaître différents sites de fixation. Ainsi, les MYB qui se fixent à un site de type MBSI se fixeront également sur les sites de type MBSII, qui constituent la séquence reconnue par la majorité des MYB-R2R3 (Romero et al., 1998).

II.4.2.2 Rôles biologiques des facteurs MYB

L'utilisation de mutants d'*Arabidopsis* a permis d'identifier le rôle biologique d'une partie seulement des protéines MYB. En effet, le caractère régulateur des protéines MYB fait que la perte d'expression de certaines d'entre elles conduit à des conditions physiologiques létales pour la plante. Cependant, les études de caractérisation fonctionnelle chez *Arabidopsis* permettent d'avoir une vision générale des processus biologiques régulés par les MYB (Du et al., 2009). Les membres de la famille **MYB-R2R3** sont impliqués dans de nombreux processus biologiques :

- **Le contrôle de la morphologie cellulaire.** Chez *Arabidopsis*, la formation des trichomes est un modèle bien caractérisé pour étudier la différenciation cellulaire. Plusieurs MYB sont impliqués dans la régulation de ce processus comme *AtMYB0* et *AtMYB23* (Kirik et al., 2005). D'autres MYB sont impliqués dans le développement de l'épiderme racinaire : *WEREWOLF* (*Wer*) et *CAPRICE* (*CPC*) (Lee and Schiefelbein, 2002). Il a été montré que le contrôle de la différenciation des cellules épidermiques chez *Arabidopsis* faisait intervenir des interactions entre une protéine WD40, des protéines bHLH et des facteurs MYB (Ramsay and Glover, 2005) (voir Introduction III.1).
- **Les réponses aux stress environnementaux.**
 - Concernant les **stress abiotiques**, les MYB-R2R3 sont impliqués dans les voies de transduction de la réponse à la sécheresse, au froid, ou à la lumière. Par exemple, l'expression d'*AtMYB68* est modulée par la température et des plantes mutantes *myb68* ne sont plus capables de se développer en conditions de forte chaleur (Feng et al., 2004). Par ailleurs, *AtMYB41* est impliqué dans la réponse au stress osmotique (Lippold et al., 2009).
 - Les MYB-R2R3 sont également impliqués dans la régulation des **stress biotiques** (Martin and Paz-Ares, 1997). En effet, chez *Arabidopsis*, *AtMYB30* est impliqué dans la régulation de la HR (Daniel et al., 1999) (Voir Introduction IV.1). Le gène *AtMYB96* est induit chez des plantes d'*Arabidopsis*, d'écotype La-er, surexprimant le gène *P6* du virus de la mosaïque du chou-fleur qui cause la maladie chez cet écotpe (Geri et al., 1999) (Voir Résultats IV). *NtMYB2* est induit par la blessure et par des éliciteurs fongiques, et *NtMYB1* est induit par le TMV et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Sugimoto et al., 2000). Chez le Riz, *OsJAMYB* est induit par le champignon *Pyricularia*, ainsi que dans les feuilles de certains mutants lésions-spontanées (Lee et al., 2001). Une insertion d'un ADN-T dans le gène codant le facteur MYB *BOS1* provoque une sensibilité accrue après infection par des agents pathogènes biotrophes ou nécrotrophes (Mengiste, 2003). De plus, plusieurs gènes codant des facteurs MYB sont surexprimés après une infection par *Pseudomonas syringae* (Kranz et al., 1998; Stracke et al., 2001).

- **Réponse aux phytohormones.** Les MYB-R2R3 sont impliqués dans les voies de transduction du SA (Raffaele et al., 2006), de l'ABA (Abe et al., 2003), des gibbérellines (Cheng et al., 2009a) et du JA (Mandaokar and Browse, 2009). Ainsi, *AtMYB2* est induit lors d'un stress hydrique et après induction de l'ABA (Abe et al., 2003). Par ailleurs, MYB108 et MYB24 agissent en aval de MYB21 dans une cascade transcriptionnelle qui active la maturation des étamines en réponse au JA (Mandaokar and Browse, 2009).
- **Voie de biosynthèse des métabolites secondaires.** De nombreux MYB-R2R3 sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Borevitz et al., 2000), des flavonoïdes (Mehrtens et al., 2005) ou de la lignine (Gomez-Maldonado et al., 2004). Récemment, il a été montré que MYB58 et MYB63 sont des activateurs de la biosynthèse de lignine chez *Arabidopsis* (Zhou et al., 2009).

De nombreux facteurs de transcription sont donc impliqués dans le contrôle des réponses de défense. Pour assurer leur fonction, leur activité doit être finement régulée. Voyons maintenant les mécanismes mis en jeu lors de la régulation de l'activité d'un type de FT, les facteurs de transcription de type MYB.

III. Régulation de l'activité des facteurs de transcription MYB

L'activité des FT est constamment soumise à une régulation fine afin de permettre une activation rapide et précise de leurs gènes cibles. La régulation de l'activité globale des FT s'effectue généralement *via* des modifications de leur niveau d'expression, *via* une dégradation protéique, ou *via* une séquestration en dehors du noyau. Cette régulation peut s'effectuer par le biais d'interaction avec des protéines activatrices ou inhibitrices, ou par la mise en place de modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles qui affectent de façon variable l'activité du FT ciblé.

III.1 Les interactions protéine-protéine impliquant des FT MYB

L'activité des FT MYB est régulée par la formation de complexes avec d'autres protéines. Ainsi, chez les animaux, un nombre important de protéines a été identifié comme pouvant interagir avec c-Myb, plus précisément avec son domaine de liaison à l'ADN (Ness, 1999). Ces interacteurs sont de 3 types :

- Des facteurs de transcription, comme C/EBPb qui, avec c-Myb, induisent l'expression du gène *mim1* (Semsey et al., 2005).
- Des co-activateurs de la transcription, comme p100. Ce co-activateur interagit avec le facteur de transcription général TFIIE, et assure le repliement de c-Myb (Ness, 1999).
- Des inhibiteurs des facteurs MYB qui capturent les MYB dans des complexes où ils sont inactifs (Joaquin and Watson, 2003).

Chez les plantes, l'exemple le mieux étudié d'interaction entre des facteurs MYB et des protéines régulatrices est celui des protéines impliquées dans le contrôle de la différenciation des cellules épidermiques chez *Arabidopsis*. La coopération entre des facteurs de transcription **MYB**, **bHLH** et **WD40** est en effet indispensable à la régulation de ce processus (Ramsay and Glover, 2005; Zhao et al., 2008). La protéine TTG1, facteur de transcription de type WD40, fournit une architecture propice aux interactions entre un

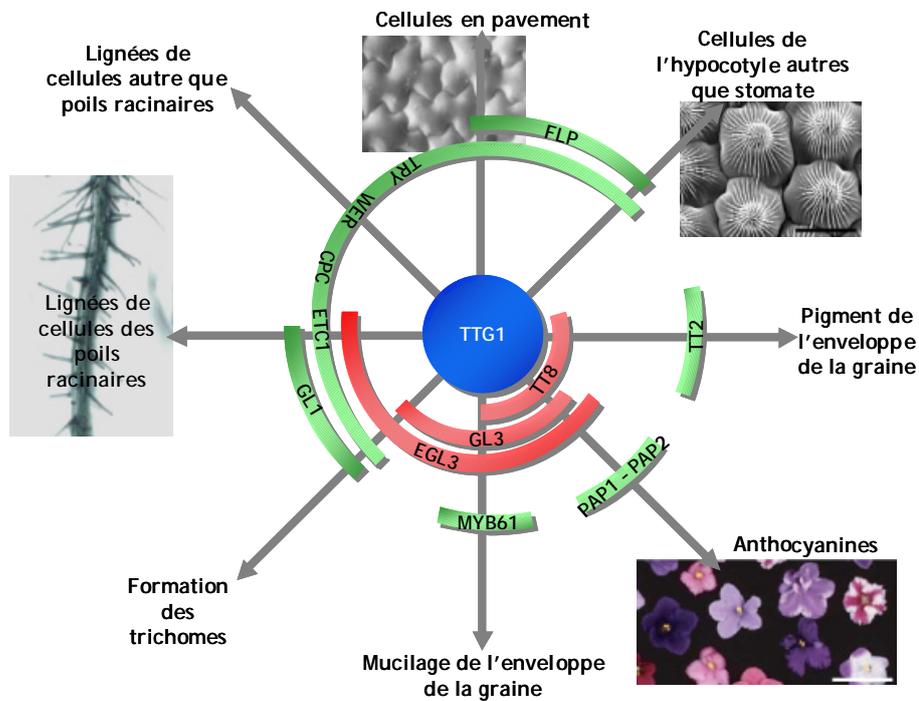


Figure 20. Les protéines MYB, bHLH et WD40 identifiées comme impliquées dans le contrôle de la différenciation des cellules épidermiques chez *Arabidopsis* (Extrait de Raffaële, Thèse, 2006).

TTG1 (protéine WD40, cercle bleu) est impliquée dans tous les programmes de différenciation des cellules épidermiques, de concert avec les protéines bHLH (en rouge) GL3, EGL3 et TT8. A leur tour, ces bHLH interagissent avec des MYB-R2R3 (en vert) qui sont spécifiques d'une forme de différenciation, ou avec une protéine MYB-R1 pour former un complexe de transcription inactif.

facteur MYB et un bHLH. Dans un premier temps, un bHLH (EGL3, GL3 ou TT8) se lie à TTG1 puis une protéine MYB spécifique d'une voie de différenciation cellulaire vient s'associer et déterminer le destin de la cellule (Figure 20). Les MYB-R1 tels que TRY, CPC et ETC1, qui ne possèdent pas de domaine d'activation de la transcription, empêchent la formation de certains complexes MYB-bHLH-WD40 fonctionnels en entrant en compétition avec les MYB-R2R3 pour la liaison avec le facteur bHLH (Ramsay and Glover, 2005).

Les interactions entre **MYB et bHLH** semblent être un phénomène conservé, au sein des règnes végétaux, pour la régulation des voies de biosynthèse des métabolites secondaires. Ainsi, chez le Pétunia, la protéine MYB PhAN2 interagit avec les protéines bHLH PhJAF13 et PhAN1 pour réguler la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Aharoni et al., 2001). Chez Arabidopsis, plusieurs étapes de la biosynthèse des flavonoïdes sont contrôlées par des actions combinées de protéines MYB et bHLH (Quattrocchio et al., 1999). Il a été montré récemment que la mutation du gène *AtMYBL2* qui code un R3-MYB provoque une induction de l'expression des gènes *DFR* et *TT8*, conduisant à une accumulation d'anthocyanes (Matsui et al., 2008). *AtMYBL2* interagit avec TT8, et ce complexe supprime alors l'expression de *TT8* et *DFR*. *AtMYBL2* agit donc comme répresseur transcriptionnel et régule négativement la biosynthèse des anthocyanines chez Arabidopsis.

La formation de complexes contenant **LHY et CCA1**, deux protéines MYB de type R1, participe à la régulation du rythme circadien en bloquant la transcription d'autres gènes (Daniel et al., 2004). La traduction de LHY et de CCA1 est activée par la lumière, les protéines s'accumulent et vont encombrer le promoteur du gène *TOC1* dont l'expression chute. Or *TOC1* active l'expression de *LHY* et *CCA1*, et l'encombrement de son promoteur provoque donc une diminution du niveau d'expression de *LHY* et *CCA1*, libérant finalement le promoteur de *TOC1*. Un nouveau cycle peut alors commencer. De plus, la fixation de CCA1 à l'ADN dépend de son état de phosphorylation par CK2.

Enfin, **AtMYB2**, qui contrôle l'expression de gènes de réponse aux stress salin et hydrique, possède un domaine de liaison à la calmoduline (CBD, CaM Binding Domain). La liaison calcium-dépendante de certains isoformes de CaM au CBD a pu être démontrée et celle-ci augmente l'affinité d'AtMYB2 pour l'ADN. De plus, la surexpression d'une isoforme de CaM active les gènes régulés par AtMYB2 et rend les plantes plus tolérantes au stress salin (Yoo et al., 2005).

Les interactions protéine-protéine impliquant des FT, MYB ou autres, sont un processus largement répandu au sein des règnes végétaux et animaux, qui permet un contrôle de leur activité. Ce contrôle peut également passer par des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles.

III.2 Les modifications moléculaires régulent l'activité des FT MYB

Des modifications **post-transcriptionnelles** sont capables de réguler l'activité des FT. En effet, on peut citer l'exemple de MYB33 et MYB101 qui sont des cibles de microARN, conduisant à la dégradation spécifique de leurs transcrits (Reyes and Chua, 2007). Lorsqu'on mute la séquence de MYB33 ciblée par le microARN, la spécificité tissulaire de l'expression de MYB33 est modifiée, ce qui cause de graves défauts de développement (Millar and Gubler,

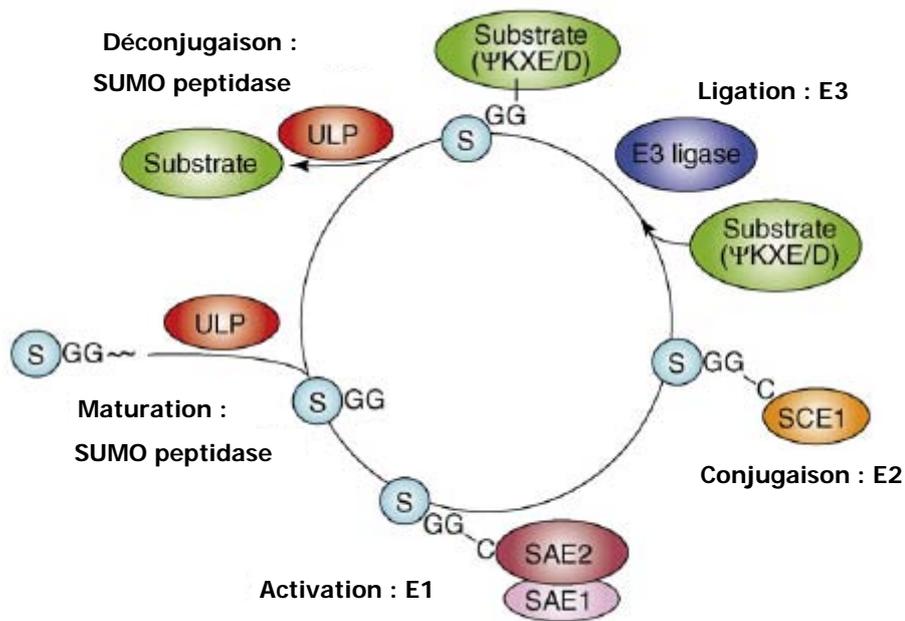


Figure 21. Le cycle du SUMOylation chez les Eucaryotes (d'après Miura et al., 2007).

Le peptide SUMO (S) subit une maturation après traduction, *via* un clivage par une SUMO peptidase (ULP). L'étape d'activation consiste à former un lien thioester ATP-dépendant entre SUMO et l'enzyme d'activation hétérodimérique E1 (SAE1 et SAE2). Puis l'étape de conjugaison permet de générer un lien thioester entre la forme activée de SUMO et une enzyme de conjugaison E2 (SCE1). Enfin l'étape de ligation consiste à attacher SUMO sur un résidu lysine appartenant à une séquence consensus (Ψ KXE/D; Ψ , résidu hydrophobe; X, tout acide aminé; E/D, glutamate ou aspartate) du substrat. Cette dernière étape requiert la présence d'une E3 ligase *in vivo*. La déconjugaison peut ensuite s'effectuer par des SUMO peptidases.

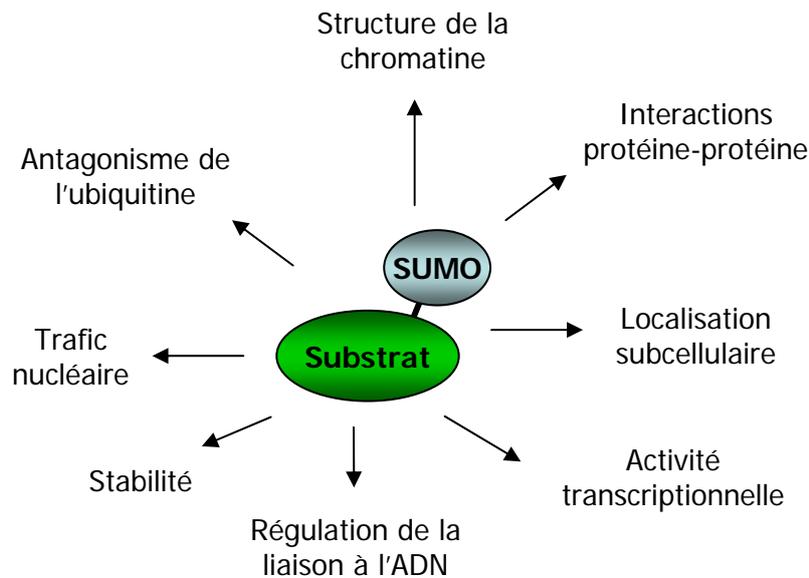


Figure 22. Quelques processus régulés par la SUMOylation (d'après Verger et al., 2002).

2005). La restriction de l'expression de MYB33 par un microARN est donc nécessaire au bon développement de la plante.

Les modifications **post-traductionnelles** (MPT) permettent aux cellules de répondre rapidement et spécifiquement à différents stimuli, en évitant une synthèse protéique *de novo* qui serait longue et consommatrice d'énergie. L'activité des FT est finement modulée par des MPT qui affectent leur stabilité, leur localisation, leur interaction avec les protéines ou l'ADN. Ainsi, la présence de différentes isoformes d'un même FT, portant différentes MPT, pourrait être nécessaire aux FT impliqués dans plusieurs processus biologiques. Les différentes isoformes pourraient avoir une affinité ou une spécificité de liaison à l'ADN distinctes, ainsi que différents partenaires protéiques (Benayoun and Veitia, 2009).

Les principales MPT pouvant affecter l'activité des FT MYB seront décrites ci-après.

III.2.1 La phosphorylation peut réguler l'affinité des MYB pour l'ADN

La phosphorylation des protéines est un phénomène très conservé pour la régulation des fonctions protéiques, retrouvée chez les procaryotes et Eucaryotes. La phosphorylation d'une protéine peut avoir des **conséquences diverses** : modification de son activité ou de sa localisation subcellulaire, signal de dégradation, effets sur les complexes protéiques (Peck, 2006).

Chez les animaux, de nombreuses modifications post-traductionnelles régulent l'activité des facteurs MYB. Ainsi, la phosphorylation de **B-MYB** le libère de son complexe inhibiteur, puis son acétylation augmente son activité transcriptionnelle, lui permettant alors d'activer la prolifération cellulaire (Joaquin and Watson, 2003). Par ailleurs, la phosphorylation de **c-Myb** induit son ubiquitination par un complexe SCF et sa dégradation par le protéasome (Kanei-Ishii et al., 2008).

Les FT MYB contiennent plusieurs sérines ou thréonines, en particulier dans leur partie C-terminal, qui pourraient être des substrats de kinases. Comme nous l'avons vu précédemment, la fixation à l'ADN du MYB **CCA1** d'*Arabidopsis* dépend de son état de phosphorylation par CK2 (Daniel et al., 2004). De plus, la phosphorylation régule négativement l'affinité de MYB340 pour l'ADN, chez *Antirrhinum* (Moyano et al., 1996).

III.2.2 La SUMOylation régule l'activité des FT MYB

La SUMOylation est un attachement covalent et réversible du peptide SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) à un résidu lysine. Cette modification apparaît à la suite d'une cascade réactionnelle faisant intervenir une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une enzyme de ligation (E3) (Figure 21) (Miura et al., 2007a). La SUMOylation est présente chez tous les Eucaryotes et elle agirait en masquant et/ou en ajoutant des surfaces d'interaction, ou en induisant des changements conformationnels qui altèrent les interactions. Ainsi, les **conséquences de la SUMOylation** sont très diverses : modification de la localisation subcellulaire, de l'activité enzymatique ou de la stabilité (Figure 22) (Verger et al., 2003). La SUMOylation des FT diminue en général leur activité transcriptionnelle, mais il existe des exemples où cette MPT augmente l'activité transcriptionnelle de FT (Goodson et al., 2001; Miura et al., 2007b).

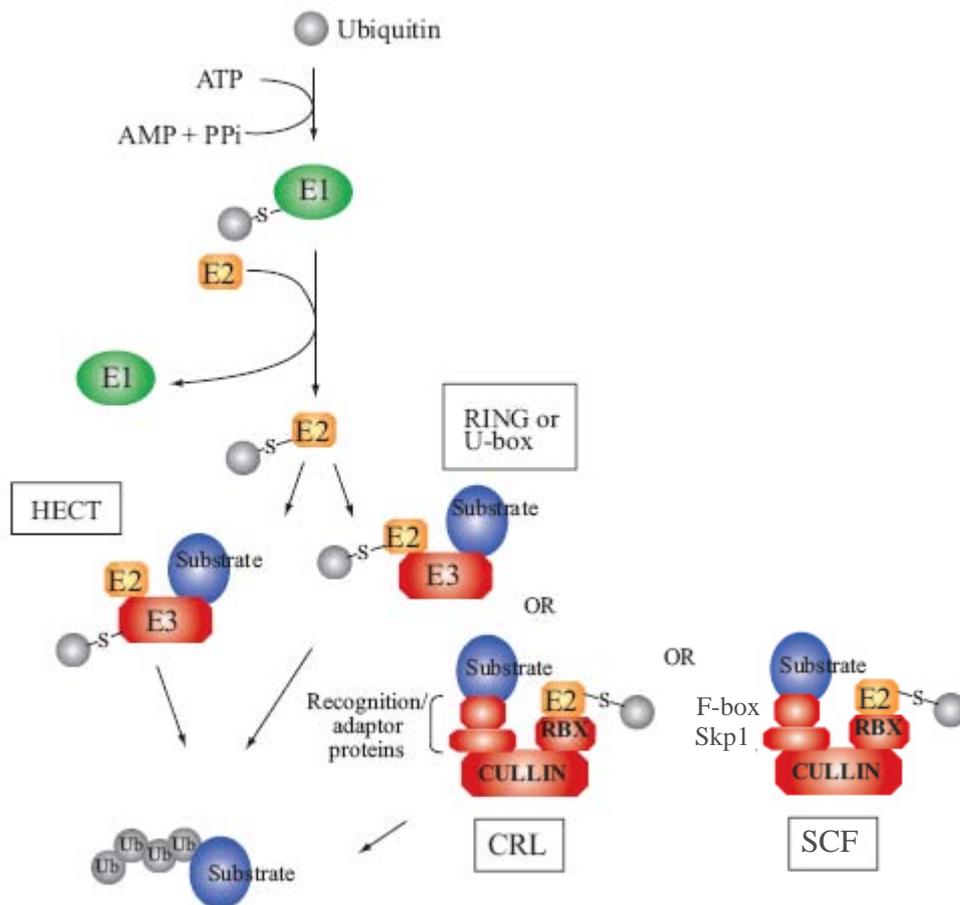


Figure 23. Le processus d'ubiquitination chez les plantes (d'après Dreher and Callis, 2007).

Le monomère d'ubiquitine (Ub) est activé, de façon ATP-dépendante, par une enzyme E1. L'Ub est alors transférée à une enzyme de conjugaison (E2). Les E3 ligases contenant un domaine HECT forment un lien thioester avec l'Ub avant de la transférer au substrat (partie gauche de la figure). A l'inverse, les E3 ligases contenant un domaine RING ou U-Box facilitent le transfert direct de l'Ub de l'enzyme E2 vers le substrat (partie droite de la figure). Dans le cas des complexes CRL (Cullin RING Ligase) et SCF (Skp1, Cullin, F-box-type ligase), la E2 se fixe à la protéine RBX contenant un domaine RING, elle-même liée au substrat *via* différentes protéines adaptatrices, dont une protéine Cullin.

Chez les animaux, **c-Myb** est SUMOylé au niveau de son domaine inhibiteur, ce qui empêche la formation de complexes activateurs (Verger et al., 2003). De plus, le domaine EVES de c-Myb est capable d'interagir avec la répétition R3 de son domaine de liaison à l'ADN (Ness, 1999). c-Myb est alors replié dans une conformation qui l'empêche de se lier à l'ADN.

Chez les végétaux, les exemples de protéines SUMOylées sont assez limités, mais cette MPT a pu être impliquée dans la modulation de l'activité des FT lors de différentes réponses de la plante : stress thermique, défense, signalisation à l'ABA, carences en phosphate, contrôle de la floraison, tolérance au froid (Lee et al., 2007; Miura et al., 2007b). Chez les MYB, on peut citer l'exemple de **PHR1**, impliqué dans la tolérance aux carences en phosphates, qui est cible de SUMOylation par la SUMO ligase AtSIZ1 (Miura et al., 2005). Cependant, le rôle de cette SUMOylation dans la régulation de l'activité de PHR1 est encore inconnu.

III.2.3 L'ubiquitination peut provoquer la dégradation des FT MYB

L'ubiquitination d'un substrat, consistant en la fixation d'un monomère d'ubiquitine (Ub) sur celui-ci, fait intervenir des enzymes d'activation (E1), de conjugaison (E2) et de ligation (E3) (Figure 23) (Dreher and Callis, 2007). Différents types d'E3 ligases existent chez les plantes, en fonction du mécanisme utilisé pour transférer l'Ub au substrat. Ainsi, les E3 ligases contenant un domaine HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus) forment un lien thioester covalent avec l'Ub, avant de la transférer au substrat (Figure 23). A l'inverse, les autres classes d'E3 ligases ne forment pas de lien covalent avec l'Ub, mais interagissent de façon non-covalente avec une E2 qui porte l'Ub. Parmi ces E3 ligases, on peut citer celles contenant un domaine U-Box ou un domaine RING (Really Interesting New Gene) (Haglund and Dikic, 2005). Les E3 ligases contenant un domaine RING peuvent agir comme membre d'un complexe de type SCF (Skp1, Cullin, E-box-type ligase) ou CRL (Cullin RING Ligase) où elles sont impliquées dans l'interaction avec la E2 (Gagne et al., 2002; Craig et al., 2009). A l'inverse, certaines E3 ligases à domaine RING agissent de façon indépendante et sont alors impliquées dans l'interaction avec la E2 et le substrat (Zhang et al., 2005) (Figure 23).

La fixation d'ubiquitine sur des protéines cibles est un mécanisme clé pour réguler l'abondance, la localisation et l'activité des protéines chez les Eucaryotes. L'attachement covalent d'une chaîne d'ubiquitine (K48), contenant au moins 4 monomères d'ubiquitine, sur une lysine de la protéine cible conduit fréquemment à sa reconnaissance et dégradation par le protéasome 26S (Glickman and Ciechanover, 2002). Cette poly-ubiquitination, conduisant à la protéolyse, est souvent déclenchée par des phénomènes environnementaux et permet de réguler l'abondance de régulateurs cellulaires clé.

A l'inverse du domaine animal, il existe un nombre très faible de FT MYB végétaux chez qui l'ubiquitination a pu être démontrée. On peut citer l'exemple de **LAF1**, qui est un FT MYB impliqué dans la signalisation *via* le phytochrome A. LAF1 est ubiquitiné par COP1, une E3 ligase de type RING, ce qui conduit à la dégradation lumière-dépendante de LAF1 par le protéasome (Seo, 2003).

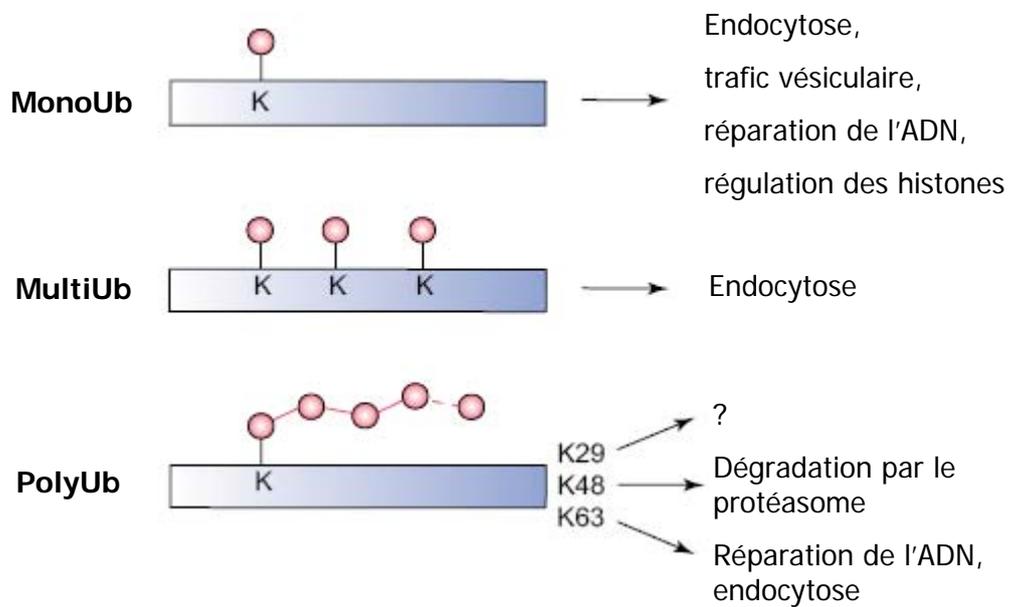


Figure 24. Différentes formes de modification des protéines par l'ubiquitine (Haglund et al., 2003).

La monoubiquitination (MonoUb) résulte de l'attachement d'une seule molécule d'ubiquitine (rond rose) à un résidu lysine (K), alors que la multiubiquitination (MultiUb) résulte de l'attachement de plusieurs molécules d'ubiquitine sur différents résidus lysine. Quant à la polyubiquitination, elle est obtenue par l'attachement d'une chaîne d'Ub qui peut-être assemblée, entre autres, *via* les lysines K29, K48 ou K63 de l'Ub. Les conséquences possibles de ces modifications sont indiquées.

L'ubiquitination peut également avoir des effets sur la localisation subcellulaire des protéines cibles. En effet, l'attachement d'un monomère d'ubiquitine (mono-ubiquitination), de deux ubiquitines (di-ubiquitination) (Hicke, 2001), ou d'une chaîne d'ubiquitine non canonique (K63), est impliqué dans le trafic cellulaire des protéines (Aguilar and Wendland, 2003). Les **différents types d'ubiquitination** sont également impliqués dans la régulation d'autres fonctions biologiques présentées dans la Figure 24 (Haglund et al., 2003).

De nombreux FT requièrent une ubiquitination pour être activés puis dégradés par le protéasome (Conaway et al., 2002). Cette modification joue donc un rôle important dans la fonction des **domaines d'activation de la transcription** (TAD). Par ailleurs, de nombreux FT ont une durée de vie courte et sont régulés par la voie classique Ub/protéasome. De façon intéressante, il a été observé que la demi-vie de certains FT modèles est inversement corrélée avec l'activité de leur TAD (Molinari et al., 1999), suggérant que les FT sont ubiquitinés et dégradés par le protéasome préférentiellement lorsqu'ils sont fixés à l'ADN. Certains TAD acides joueraient un rôle de **domaine de déstabilisation** (Salghetti et al., 2001). Ce lien étroit entre l'activation des TAD et la dégradation des FT pourrait fournir un mécanisme de régulation efficace pour atténuer les signaux de transcription. Cependant, ce mécanisme de régulation n'a pas encore été décrit chez les FT MYB à ce jour.

Les différentes combinaisons de MPT portées par les facteurs MYB permettent donc de réguler de façon précise leur activité, en fonction des variations des conditions environnementales ou développementales auxquelles ils sont soumis.

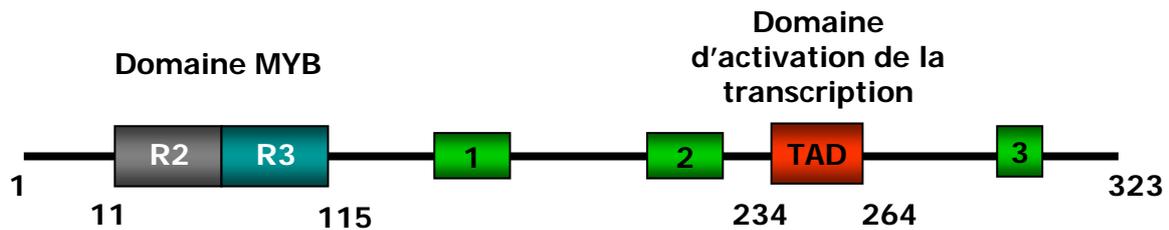


Figure 25. Représentation schématique de la séquence protéique d'AtMYB30

En gris et bleu : répétitions R2 et R3, respectivement, du domaine MYB responsable de la liaison à l'ADN; en vert : domaines conservés chez les membres du sous-groupe 2 des FT MYB-R2R3; en rouge : domaine d'activation de la transcription (TAD, Trans-Activation Domain).

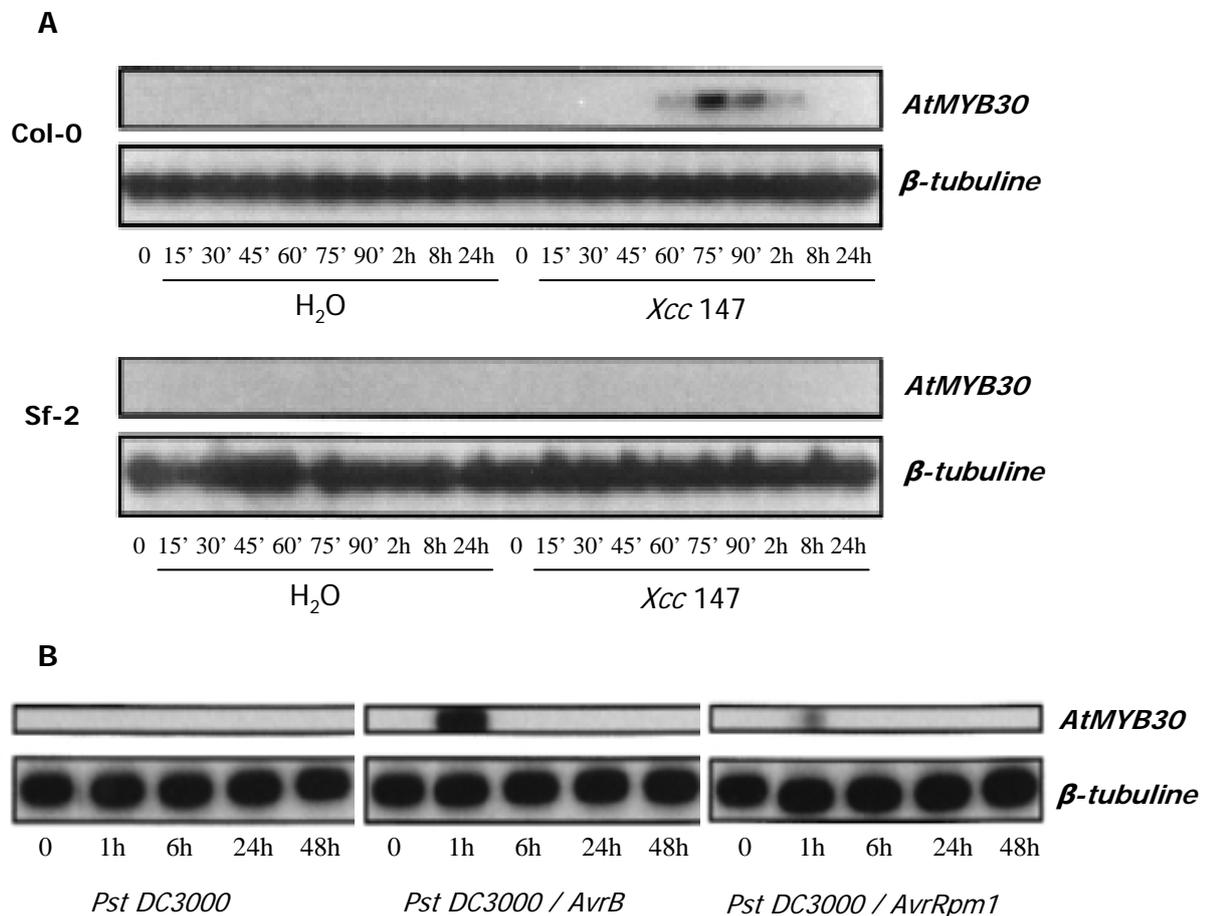


Figure 26. Analyse par RT-PCR de l'expression d'AtMYB30 en réponse à des bactéries phytopathogènes (Daniel et al., 1999).

(A) Expression d'AtMYB30 dans l'écotype résistant Col-0 (ligne du haut) et dans l'écotype sensible Sf-2 (ligne du bas) en réponse à une inoculation avec de l'eau ou avec la souche avirulente 147 d'*Xcc*.

(B) Expression d'AtMYB30 en réponse à l'inoculation par une souche de *Pst* virulente (DC3000) ou avirulente (DC3000 / *AvrB* ou DC3000 / *AvrRpm1*).

IV. Résultats antérieurs et projet de thèse

IV.1 AtMYB30, un régulateur positif de l'initiation de la HR

Cette partie expose les données disponibles sur AtMYB30, objet de cette étude, à mon arrivée dans l'équipe. Quelques résultats obtenus plus récemment sur les cibles d'AtMYB30 seront également présentés.

IV.1.1 Identification d'AtMYB30

Une approche moléculaire a été menée dans le but d'identifier des gènes impliqués précocement dans la mise en place de la HR chez Arabidopsis (Lacomme and Roby, 1999). Pour cela, des suspensions de cellules d'Arabidopsis ont d'abord été traitées au cycloheximide afin de bloquer la synthèse protéique. Ces cellules ont ensuite été inoculées avec une souche avirulente 147 d'*Xcc* (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). D'autres cellules ont été inoculées avec une souche d'*Xcc* non pathogène (souche 8B2 déletée du cluster *hrp*). Un crible différentiel a permis d'identifier 27 clones d'ADNc spécifiquement exprimés en conditions de HR et nommés **Athsr** (*Arabidopsis thaliana hypersensitivity related*). Ils correspondent à 7 familles de gènes différentes (Tableau 3), dont l'une, **Athsr1**, ne comprend qu'un seul gène. Le gène *Athsr1* est un FT de type MYB, renommé **AtMYB30** pour se conformer à la nomenclature internationale.

L'ADNc d'AtMYB30 comporte 1310 pb et l'ORF prédite, de 969 pb, code une protéine de 323 résidus et d'un poids moléculaire prédit de 36 kDa. AtMYB30 est un FT de type **MYB-R2R3** (voir Introduction II.4), membre du sous-groupe 2. Par conséquent, il possède un domaine MYB impliqué dans la liaison à l'ADN, un domaine d'activation de la transcription et 3 domaines qui sont conservés au sein des membres du sous-groupe 2 (Figure 25).

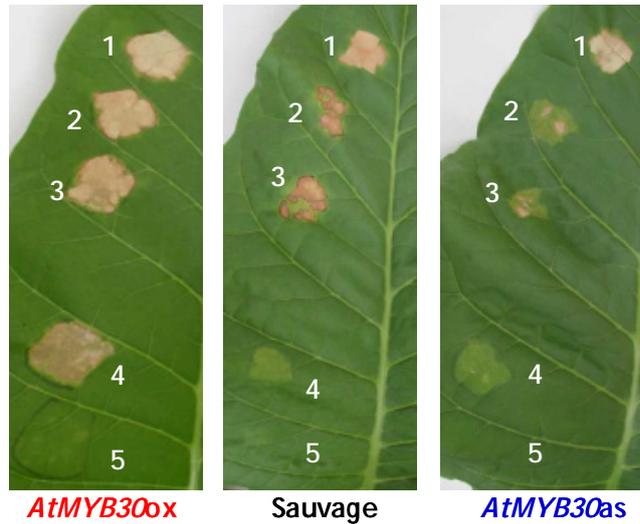
IV.1.2 Profil d'expression et étude de la fonction d'AtMYB30 par transgénèse

IV.1.2.1 AtMYB30 est impliqué dans l'initiation de la HR

AtMYB30 a été identifié sur la base d'une expression différentielle dans des cellules infectées soit par une souche avirulente, soit par une souche non pathogène de *Xcc*. Cette **expression spécifique des conditions de HR** a pu être vérifiée sur plantes entières (Daniel et al., 1999). En effet, aucune expression d'*AtMYB30* n'a pu être détectée par RT-PCR dans une interaction compatible entre un écotype sensible d'Arabidopsis et la souche 147 d'*Xcc*. A l'inverse, l'expression d'*AtMYB30* est détectée lors d'une interaction incompatible entre un écotype résistant d'Arabidopsis et la souche 147 d'*Xcc* (Figure 26A). Cette expression est transitoire et précoce car le transcrit d'*AtMYB30* n'est détectable qu'entre 1 et 2 heures post-inoculation (hpi) alors que les premiers symptômes de HR apparaissent vers 24 hpi. Ce profil d'expression est également observé après une inoculation par *Pst*, où seules des souches avirulentes permettent une détection d'*AtMYB30* (Figure 26B).

Afin de tester le rôle d'*AtMYB30* dans l'initiation et la propagation de la mort cellulaire, son expression a été étudiée dans des mutants affectés dans ces processus

A 6 jours après inoculation avec *Ralstonia solanacearum*



B

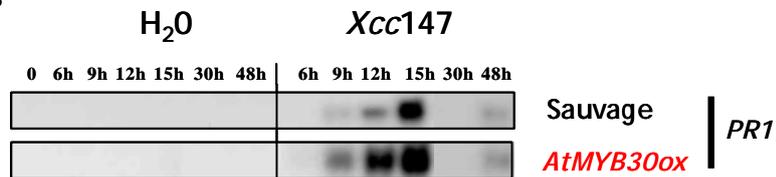


Figure 27. Phénotype des lignées transgéniques *AtMYB30ox* et *AtMYB30as* de Tabac et/ou d'Arabidopsis (Vaillau et al., 2002).

(A) Lignées transgéniques de Tabac inoculées par la souche avirulente GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* à 5.10^7 UFC/mL (1), 10^7 UFC/mL (2) et 5.10^6 UFC/mL (3) la souche virulente K60 à 5.10^7 UFC/mL (4) et par de l'eau (5). **(B)** Etude de l'expression du gène marqueur de défense *PR1*, par Northern Blot, après inoculation de plantes d'Arabidopsis par *Xcc147* à 10^8 UFC/mL.

(Daniel et al., 1999). Chez les mutants « lésions spontanées » d'initiation *Isd4* (Lesion Simulating Disease) et *Isd5*, une expression constitutive d'*AtMYB30* est détectée. A l'inverse, aucune expression n'est détectée chez des mutants supprimeurs de ces mutations. Ceci indique que l'expression constitutive d'*AtMYB30* chez *Isd4* et *Isd5* est en lien étroit avec leur phénotype de mort cellulaire. Par ailleurs, le mutant de propagation *Isd1* ne présente pas d'expression d'*AtMYB30* détectable par RT-PCR, que ce soit en conditions inductrices ou non des lésions. Toutes ces données suggèrent donc qu'*AtMYB30* est impliqué dans **l'initiation de la mort cellulaire**, plutôt que dans sa propagation.

IV.1.2.2 AtMYB30 est un régulateur positif de la HR

La fonction d'*AtMYB30* a été étudiée par **transgénèse chez le Tabac et chez Arabidopsis** (Vailleau, 2002; Vailleau et al., 2002). Les constructions utilisées contiennent un promoteur constitutif 35S du CaMV suivi de l'ADNc d'*AtMYB30* en orientation sens (plantes *AtMYB30ox*) ou antisens (plantes *AtMYB30as*). Le phénotype de ces lignées a été étudié (Figure 27), et les principales conséquences de la surexpression d'*AtMYB30* sur l'établissement de la HR sont les suivantes. Tout d'abord, les symptômes de HR apparaissent plus rapidement et sont plus intenses en réponse à des souches avirulentes de bactéries pathogènes (*Ralstonia* sur le Tabac ; *Xcc* et *Pst* sur Arabidopsis) (Figure 27A). Ceci est corrélé à une augmentation et une accélération de la mort cellulaire, à une expression plus précoce et plus forte du gène de défense *PR1* (Figure 27C), et à une limitation de la croissance des bactéries avirulentes dans ces plantes, indiquant une résistance accrue. D'autre part, une réaction de type HR est observée en réponse à des souches virulentes de *Ralstonia*, *Xcc* et *Pst* alors que des symptômes de maladie sont observés chez les plantes sauvages (Figure 27A). La croissance des bactéries virulentes dans ces plantes est limitée, indiquant une résistance accrue. Par ailleurs, la HR obtenue en réponse aux champignons pathogènes du genre *Cercospora* et aux oomycètes du genre *Phytophthora*, chez les plantes de Tabac *AtMYB30ox*, est plus rapide et aboutit à une limitation de la zone infectée (Figure 27B). Enfin, il a été montré chez le Tabac que la HR induit la production d'oxylipines et que leur synthèse est accrue chez les plantes *AtMYB30ox* (Vailleau et al., 2002).

Les plantes *AtMYB30as* d'Arabidopsis et de Tabac ont montré une HR retardée et diminuée en réponse à des agents pathogènes avirulents, des symptômes de maladie plus marqués en réponse à des agents pathogènes virulents, un taux de mort cellulaire plus faible que les plantes sauvages, et une croissance bactérienne *in planta* plus élevée.

Toutes ces données montrent bien qu'*AtMYB30* est un **régulateur positif de la HR et de la résistance**.

IV.1.3 Les cibles d'AtMYB30 au cours de la HR appartiennent au métabolisme des lipides

Des gènes cibles putatifs d'*AtMYB30* ont été identifiés par analyse transcriptomique sur une puce Affymetrix génome complet (Raffaele et al., 2008). Les profils d'expression de ces gènes, au cours d'une inoculation avec une souche avirulente de *Xcc*, ont été comparés entre les différentes lignées transgéniques d'Arabidopsis (*AtMYB30ox* ou *AtMYB30as*) et le sauvage. 18 gènes ont ainsi été identifiés comme cibles putatives d'*AtMYB30*. De façon

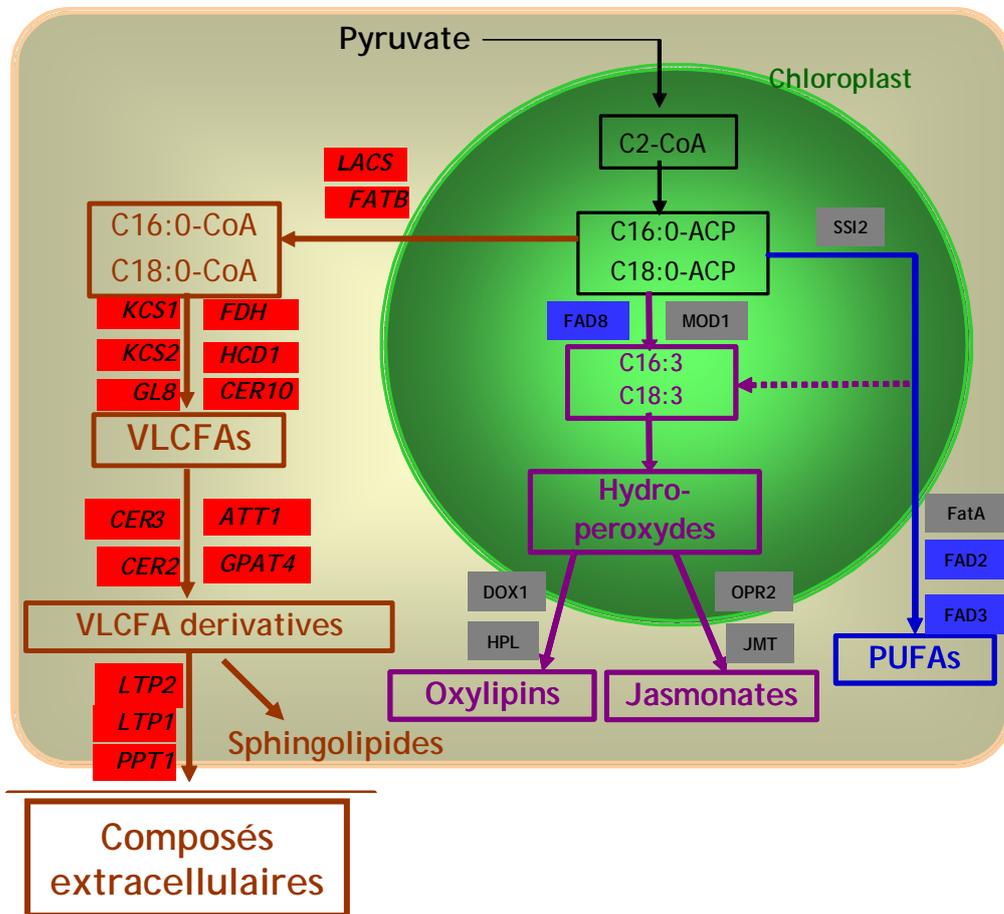


Figure 28. Représentation schématique des voies du métabolisme des lipides régulées par AtMYB30 au cours d'une interaction incompatible (d'après Raffaële et al., 2008).

Les trois voies principales mènent à la biosynthèse des PUFAs (PolyUnsaturated Fatty Acids) (en bleu), des oxylipines et jasmonates (en violet) ou des composés extracellulaires et sphingolipides (en marron). Les éléments régulés positivement par AtMYB30 sont encadrés en rouge (gènes du complexe acyl-CoA élongase, gènes impliqués dans l'accumulation des VLCFA et de leurs dérivés). Les éléments en gris ne sont pas significativement affectés par AtMYB30 durant les étapes précoces de l'interaction incompatible. Enfin, les éléments en bleu sont régulés négativement par AtMYB30 (gènes codant des AG désaturases).

intéressante, 14 d'entre eux possèdent une fonction relative au métabolisme des lipides, et sont répartis entre la **voie de biosynthèse des VLCFA** (V_{ery} L_{ong} C_{hain} F_{atty} A_{cid}) **et des cires**. Les VLCFA peuvent être utilisés pour la production de messagers lipidiques tels les sphingolipides, ou pour la production de composés extra-cellulaires comme les cires. Ces 14 gènes ont été validés par Q-RT-PCR dans 5 expériences indépendantes utilisant les lignées *AtMYB30ox*, *AtMYB30as* et *AtMYB30ko* dans 2 fonds génétiques différents (*Wassilewskija-4* (*Ws-4*) et *Columbia-0* (*Col-0*)) et inoculées avec 2 souches bactériennes avirulentes (*Xcc147* et *PstDC3000/avrRpm1*). Dans toutes ces expériences, ces gènes sont induits précocement chez le sauvage, surexprimés chez *AtMYB30ox* et régulés négativement dans les lignées *AtMYB30ko* ou *AtMYB30as*. Ce profil d'expression transitoire, et modulé par la dérégulation d'*AtMYB30*, suggère que ces gènes seraient des cibles d'*AtMYB30* (Figure 28).

Afin de tester si *AtMYB30* est capable d'activer l'expression de gènes cibles, des essais d'expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* ont été réalisés. Ces essais sont basés sur la co-expression de constructions contenant le promoteur d'un gène cible putatif fusionné à deux gènes rapporteurs (*GUS* et *GFP*) et *AtMYB30* sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Deux versions tronquées d'*AtMYB30* (déléte de son domaine d'activation de la transcription ou de son domaine MYB) ont également été utilisées comme contrôles négatifs de ces expériences. L'ensemble de ces analyses montrent qu'*AtMYB30* est un activateur potentiel d'un certain nombre de gènes impliqués dans les **premières étapes de biosynthèse des VLCFA** (Raffaele et al., 2008).

AtMYB30 contrôlant l'activation de gènes associés à la biosynthèse des VLCFA, impliqués dans la production des sphingolipides et des cires, la composition en cires et en sphingolipides des lignées dérégulées dans l'expression d'*AtMYB30* a été étudiée (Raffaele et al., 2008). La dérégulation d'*AtMYB30* ne semble pas changer de façon majeure la composition, la quantité et la qualité des **cires épicuticulaires**. Une analyse de la composition en acides gras dans les différentes lignées transgéniques d'*Arabidopsis* (*AtMYB30ox*, *AtMYB30as* et *AtMYB30ko*), en condition d'infection ou non, ne permet pas de détecter de changement significatif dans la **composition en VLCFA**. Cependant, en utilisant une méthode d'extraction des sphingolipides, une augmentation de la **teneur en VLCFA de la fraction sphingolipidique** a pu être mise en évidence dans les lignées *AtMYB30ox*, en comparaison avec les lignées sauvage et *AtMYB30ko*. De plus, cet effet est amplifié au cours d'une interaction incompatible. Ceci suggère qu'*AtMYB30* activerait la biosynthèse des VLCFA afin de générer un signal lipidique menant à la HR.

Par ailleurs, afin d'étudier si d'autres voies de biosynthèse des lipides pouvaient être affectées par *AtMYB30*, des croisements entre la lignée *AtMYB30ox* et des mutants affectés au début des trois voies représentées sur la figure 28 ont été effectués. Seule la mutation du gène codant l'acyl-ACP thioesterase *fatB*, responsable de l'export des acides gras C16 et C18 du chloroplaste au réticulum endoplasmique, est capable d'abolir le phénotype de la lignée *AtMYB30ox*. Cette analyse génétique montre donc que le phénotype d'accélération de la HR, conféré par la surexpression d'*AtMYB30*, est dépendant de la présence des acides gras essentiels à la biosynthèse des VLCFA.

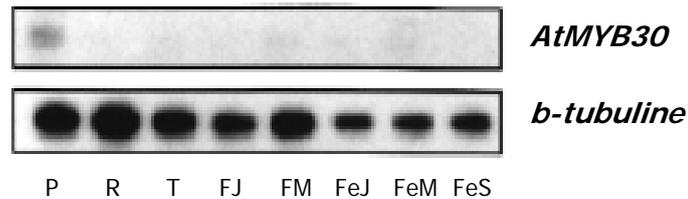


Figure 29. Analyse par RT-PCR de l'expression d'*AtMYB30* chez *Arabidopsis*, dans différents organes, et au cours du développement (d'après Daniel et al., 1999).

L'expression d'*AtMYB30* a été mesurée dans des plantules de 2 semaines (P), racines (R), tiges (T), fleurs jeunes (FJ), fleurs matures (FM), feuilles jeunes (FeJ), feuilles matures (FeM), et feuilles sénescents (FeS).

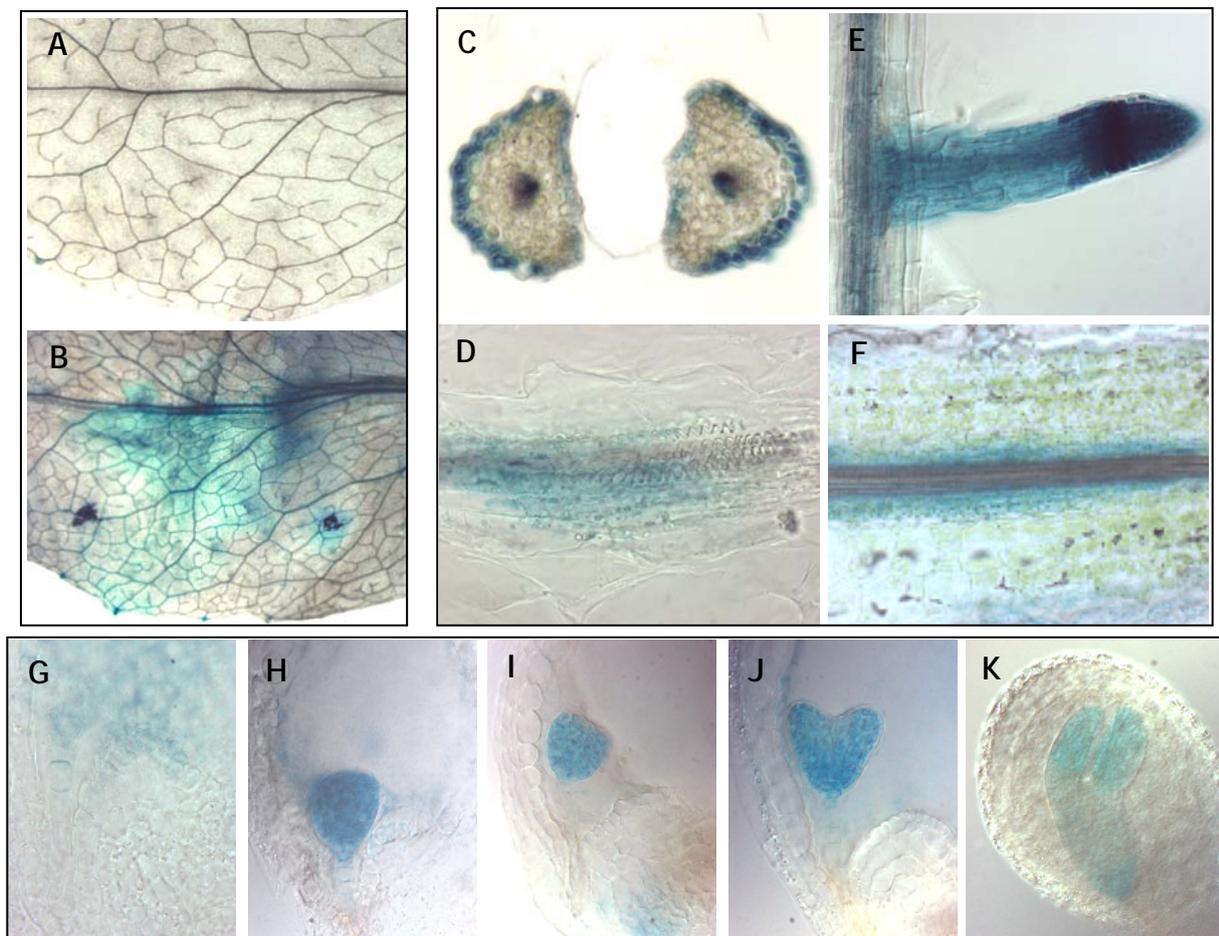


Figure 30. Etude de l'expression d'*AtMYB30* chez des plantes d'*Arabidopsis* exprimant la construction *pAtMYB30::GUS* (Photos : M.C. Auriac)

L'activation d'*AtMYB30* au cours de la HR est bien visible : aucune activité n'est détectée dans des feuilles inoculées par la souche non virulente *hrp- Xcc8B2* (A) et une activité apparaît 6 heures après inoculation par la souche avirulente *Xcc147* (B). Ces lignées *pAtMYB30::GUS* ont mis en évidence une expression d'*AtMYB30* à proximité des vaisseaux de xylème visible au niveau des cellules du collet (C,D,F) ainsi qu'au niveau de l'apex des poils racinaires (E). L'expression de *pMYB30::GUS* est aussi détectée au cours des PCD associées à l'embryogenèse (grossissement x40) : on ne note aucune expression au stade 2 cellules (G) mais dès les premières étapes du stade globulaire (H) l'activité GUS est détectable. Elle reste clairement localisée dans l'embryon à la fin du stade globulaire (I), au stade coeur (J) et à partir du stade torpille (K) cette activité commence à décroître.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent qu'**AtMYB30 régule de façon spécifique et très rapide, la voie de biosynthèse des VLCFA**. L'élucidation du rôle de cette voie dans la régulation de la HR, et plus particulièrement l'identification d'un signal lipidique putatif produit par l'action d'AtMYB30 et régulant la HR est actuellement en cours dans l'équipe.

IV.1.4 AtMYB30 est impliqué dans la régulation de processus développementaux

Au niveau développemental, les plantes *AtMYB30ox* de Tabac ne présentent pas de phénotype différent du sauvage, au cours du développement jusqu'au stade floraison. Cependant, ces plantes montrent une floraison et une sénescence foliaire retardée, alors que ces processus sont accélérés chez les lignées *AtMYB30as*. Les lignées transgéniques d'*Arabidopsis* montrent également une altération de ces processus développementaux. Ceci suggère donc un rôle d'*AtMYB30* dans la **floraison et la sénescence foliaire** mais ce rôle a été peu étudié à ce jour.

Par ailleurs, au cours du développement chez *Arabidopsis*, le transcrit d'*AtMYB30* n'est détectable, par RT-PCR, que dans des **plantules âgées de 2 semaines**, et non aux autres stades de développement (Daniel et al., 1999) (Figure 29). Ce résultat suggère qu'*AtMYB30* possède un rôle développemental à ce stade.

De plus, la coloration histochimique de plantes transgéniques exprimant la construction *pAtMYB30::GUS* a confirmé l'induction de l'expression d'*AtMYB30* au cours de la HR mais ont également mis en évidence son possible rôle dans **l'embryogenèse** et dans la **formation des éléments trachéaires** (Auriac MC, Balagué C, Roby D, données non publiées) (Figure 30). Par ailleurs, des données montrent que les VLCFA seraient importants pour le processus d'embryogénèse (Rossak et al., 2001; Dietrich et al., 2005). *AtMYB30* pourrait donc être impliqué, *via* l'activation de la voie de biosynthèse des VLCFA, dans la régulation de l'embryogénèse puis dans l'activation des réponses de défense, chez les plantes adultes.

Par ailleurs, *AtMYB30* a été récemment impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes liés à la voie de signalisation en **réponse aux brassinostéroïdes (BR)** (Li et al., 2009). Les BR sont des molécules impliqués dans divers processus biologiques chez les plantes : différenciation vasculaire, sénescence ou réponses aux stress. Le FT BES1 régule des centaines de gènes impliqués dans les voies de transduction des BR. Des expériences de type Microarray et CHIP ont montré qu'*AtMYB30* (i) est induit après un traitement aux BR et (ii) est une cible directe de BES1 (Li et al., 2009). *AtMYB30* activerait alors plusieurs gènes BR-dépendants. De plus, *AtMYB30* et BES1 interagissent *in vivo*. Ces résultats établissent donc un nouveau mécanisme par lequel *AtMYB30*, une cible directe de BES1, agit pour amplifier le signal BR en aidant BES1 à activer ses cibles.

IV.1.5 Recherche des partenaires protéiques d'AtMYB30

Les interactions protéine-protéine régulent fréquemment l'activité des facteurs de transcription (voir Introduction III.1). Il parut donc intéressant de rechercher les partenaires protéiques d'AtMYB30 afin d'obtenir des informations sur son fonctionnement.

Un **crible double-hybride chez la Levure** a été mené par X. Daniel au sein de notre équipe, afin d'identifier des interacteurs putatifs d'AtMYB30 (Froidure et al., 2010, submitted). Pour cela, une banque d'ADNc à partir d'ARN exprimés en conditions de HR a été criblée avec la protéine de fusion « appât » AtMYB30 Δ AD fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Le domaine d'activation d'AtMYB30 a été supprimé car celui-ci active les gènes rapporteurs du système double-hybride. Le matériel utilisé pour générer la banque d'ADNc correspond à des échantillons de plantes d'Arabidopsis, écotype Ws, inoculées par la souche avirulente 147 de *Xcc* (Vailleau, 2002). Le FT AtMYB123, impliqué dans la biosynthèse des flavonoïdes (Nesi et al., 2001), a été utilisé comme contrôle de spécificité dans cette expérience.

A l'issue du crible, les ADNc codant des protéines qui interagissent spécifiquement avec AtMYB30 Δ AD ont été séquencés. Parmi les **17 protéines interagissant spécifiquement avec AtMYB30**, deux protéines candidates ont été sélectionnées pour une étude approfondie, selon les critères suivants : (i) la force de l'interaction entre les protéines candidates et AtMYB30 Δ AD dans les tests double-hybride, (ii) le profil d'expression des gènes correspondants lors de l'inoculation d'Arabidopsis, écotype sauvage, par la souche avirulente 147 de *Xcc* (disponibles grâce aux données microarrays générées au sein de l'équipe), (iii) la disponibilité de lignées Arabidopsis mutantes T-DNA pour les gènes correspondants, et (iv) la fonction putative du gène.

Ces critères de choix ont mené à la sélection des **quelques protéines candidates** et notamment : une protéine de type RING possédant une **fonction putative d'E3 ubiquitine ligase** (At5g18650) et une **phospholipase A2** sécrétée (At2g06925).

IV.2 Projet de thèse

Dans le but d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action d'AtMYB30, l'identification de ses partenaires protéiques a été entreprise. A mon arrivée au laboratoire, l'objectif de ma thèse était de caractériser les partenaires protéiques d'AtMYB30 identifiés précédemment dans l'équipe, mais également d'en identifier de nouveaux. Pour cela, deux approches ont été mises en place :

- Une **approche avec *a priori*** ayant pour but de confirmer et caractériser l'interaction entre AtMYB30 et les deux candidats sélectionnés à l'issue du crible double-hybride (Introduction IV.1.5) : une protéine de type RING avec une fonction d'E3 ligase putative (At5g18650), appelée **MIP1** (AtMYB30 Interacting Protein 1), et une phospholipase appelée **AtsPLA₂- α** (At2g06925). Il s'agissait donc de :
 - Valider *in planta* les interactions mises en évidence chez la levure
 - Etudier l'effet de MIP1 et AtsPLA₂- α sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30
 - Etudier le phénotype des mutants *mip1* et *Atspla₂- α* lors d'une interaction avec un agent pathogène

- Comprendre le rôle de MIP1 et *AtSPLA₂-α* dans la régulation de la HR *via* AtMYB30

D'autre part, l'étude d'une éventuelle interaction entre AtMYB30 et **AtMYB96**, un autre FT MYB impliqué également dans la régulation de la HR, faisait partie de mon projet de thèse.

➤ Une **approche protéomique sans *a priori*** visant à identifier de nouveaux interacteurs d'AtMYB30. Pour cela, AtMYB30 est produit *in planta*, puis purifié par immunoprécipitation. L'objectif est d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche sur les partenaires d'AtMYB30.

Résultats

(A)



(B)

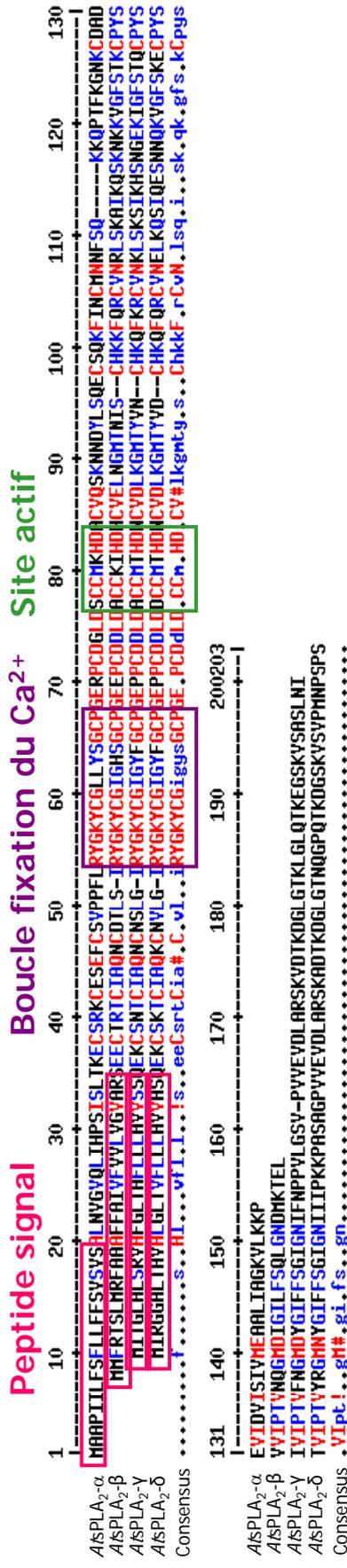


Figure 31. Relations entre les 4 isoformes de PLA₂ sécrétées d'Arabidopsis.

(A) Relations phylogénétiques (Ryu, 2004). (B) Alignement de séquences protéiques montrant les différents domaines clés : peptide signal, boucle de fixation au calcium et site actif.

I. *At*PLA₂- α régule négativement la HR et la défense *via* son interaction avec AtMYB30

I.1 Introduction

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du mode d'action et des mécanismes de régulation de l'activité d'AtMYB30, une recherche sans *a priori* de ses partenaires protéiques a été menée. Pour cela, un crible double-hybride chez la levure a été réalisé, en utilisant des cDNA correspondant à des ARN exprimés au cours de la réponse hypersensible (voir Introduction IV.1.5).

*At*PLA₂- α est une phospholipase A₂ sécrétée d'Arabidopsis identifiée comme un partenaire putatif d'AtMYB30, lors de ce crible double-hybride chez la levure. Chez Arabidopsis, il existe 4 isoformes de PLA₂ sécrétées : *At*PLA₂- α , *At*PLA₂- β , *At*PLA₂- γ and *At*PLA₂- δ (Bahn et al., 2003; Lee et al., 2005). Leurs relations phylogénétiques et un alignement de leurs séquences nucléotidiques sont présentés dans la figure 31.

A ce jour, l'interaction entre un FT MYB et une phospholipase n'avait jamais été décrite chez les plantes. Or chez les animaux, il existe un exemple d'une phospholipase cytosolique qui est relocalisée vers le noyau en présence du facteur de transcription B-MYB (Tashiro et al., 2004). L'interaction entre ces deux protéines, au sein du noyau, diminue l'activité transcriptionnelle de B-MYB. Il parut donc intéressant d'étudier l'interaction entre *At*PLA₂- α et AtMYB30. Pour cela, l'interaction entre AtMYB30 et *At*PLA₂- α a d'abord été validée *in planta*. Puis les conséquences de cette interaction sur l'activité transcriptionnelle et le rôle de régulateur positif de la HR, joué par AtMYB30, ont été étudiés.

Les résultats présentés dans la suite de ce chapitre montrent une relocalisation d'*At*PLA₂- α vers le noyau, spécifiquement en présence d'AtMYB30, et valident son interaction avec AtMYB30 dans le noyau des cellules végétales. *At*PLA₂- α exerce un contrôle négatif de l'activité d'AtMYB30, au niveau spatial et temporel, permettant ainsi de contribuer à l'atténuation des réponses de défense. Ceci constitue, à ce jour, le premier exemple d'interaction entre un FT de type MYB et une phospholipase chez les plantes.

I.2 Article soumis (PNAS)

***AtsPLA₂-α* régule négativement la HR et la défense *via* son interaction avec AtMYB30**

Solène Froidure^a, Xavier Daniel^{a,b}, Joanne Canonne^a, Alain Jauneau^c, Christian Brière^d, Dominique Roby^a and Susana Rivas^{a,1}

^aLaboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France

^bPresent adress : UBAYA, University of Surabaya, Fakultas Teknobiologi, Raya Kalirungkut, Surabaya 60293, Indonesia

^cInstitut Fédératif de Recherche 40, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, F-31320 Castanet-Tolosan, France

^dSurfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux, Université de Toulouse, UMR CNRS-Université Paul Sabatier 5546, F31320 Castanet-Tolosan, France

Résumé

La réponse hypersensible (HR), caractérisée par une mort cellulaire rapide des cellules localisées au niveau du site d'infection, est l'une des réponses de défense des plantes face aux agents pathogènes les plus efficaces. Le facteur de transcription AtMYB30 a été précédemment identifié comme un régulateur positif de la HR et de la résistance lors d'interactions entre *Arabidopsis* et des agents pathogènes bactériens. Nous montrons ici qu'AtMYB30 et la phospholipase sécrétée *AtsPLA₂-α* interagissent *in vivo*, après relocalisation de celle-ci des vésicules cytoplasmiques vers le noyau, spécifiquement en présence d'AtMYB30. Cette interaction protéique conduit à la répression de l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 ainsi qu'à une régulation négative de la HR. De plus, un mutant *Atspla₂-α* d'*Arabidopsis* est plus résistant à une inoculation bactérienne, alors que la surexpression d'*AtsPLA₂-α* conduit à une diminution de la résistance, confirmant qu'*AtsPLA₂-α* est un régulateur négatif des réponses de défense médiées par AtMYB30. Ces données soulignent l'importance de la dynamique cellulaire, en particulier la translocation des protéines vers le noyau, pour la régulation génétique associée à la défense chez les plantes.

***AtsPLA₂-α* represses *Arabidopsis* hypersensitive cell death and defence *via* its interaction with the transcription factor AtMYB30**

Solène Froidure^a, Xavier Daniel^{a,b}, Joanne Canonne^a, Alain Jauneau^c, Christian Brière^d, Dominique Roby^a and Susana Rivas^{a,1}

^aLaboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France

^bPresent adress : UBAYA, University of Surabaya, Fakultas Teknobiologi, Raya Kalirungkut, Surabaya 60293, Indonesia

^cInstitut Fédératif de Recherche 40, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, F- 31320 Castanet-Tolosan, France

^dSurfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux, Université de Toulouse, UMR CNRS-Université Paul Sabatier 5546, F31320 Castanet-Tolosan, France

¹Corresponding author: susana.rivas@toulouse.inra.fr; Fax: +33 5 61285061

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES (Plant Biology)

Keywords: *Arabidopsis*, AtMYB30, *AtsPLA₂-α*, hypersensitive response, plant defence

ABSTRACT

The Hypersensitive Response (HR), characterized by a rapid and localized cell death at the inoculation site, is one of the most efficient resistance reactions to pathogen attack in plants. The transcription factor AtMYB30 was previously identified as a positive regulator of the HR and resistance responses during interactions between Arabidopsis and bacteria. Here we show that AtMYB30 and the secreted phospholipase *AtsPLA₂-α* physically interact *in vivo*, following the AtMYB30-mediated specific relocalization of *AtsPLA₂-α* from cytoplasmic vesicles to the plant cell nucleus. This protein interaction leads to repression of the AtMYB30 transcriptional activity and negative regulation of plant HR. Moreover, *Atspla₂-α* mutant plants are more resistant to bacterial inoculation whereas *AtsPLA₂-α* overexpression leads to decreased resistance, confirming that *AtsPLA₂-α* is a negative regulator of AtMYB30-mediated defence. These data underline the importance of cellular dynamics, and particularly protein translocation to the nucleus, for defence-associated gene regulation in plants.

INTRODUCTION

During evolution plants have developed sophisticated mechanisms to recognize attacking organisms and to translate this perception into an adaptive response, thereby limiting spread of the pathogen within the plant. Plant defence reactions include programmed cell death (Hypersensitive Response, HR), modifications of cell walls as well as the production of reactive oxygen species and antimicrobial proteins. The HR, rapidly induced in plant cells directly in contact with the pathogen, is thought to play an essential role in pathogen confinement and consequently in disease resistance (1).

Transcriptional reprogramming is a crucial step of plant defence in response to pathogen recognition, involving major changes in gene expression. Several families of transcription factors (TFs), including TGA-bZIP, ERF, MYB, WRKY and WRKY families, have been implicated in defence gene regulation in response to pathogen infection, pathogen-derived elicitors and signalling molecules (2). Plant MYB proteins are involved in the control of plant specific processes, including secondary metabolism, cell fate and development, as well as in plant responses to a variety of environmental stimuli and in mediating hormone actions (3, 4).

The *MYB* gene *AtMYB30* was isolated on the basis of its early, transient and specific expression in *Arabidopsis* after inoculation with avirulent bacteria (5). Plants overexpressing *AtMYB30* show accelerated and stronger HR in response to avirulent pathogens, together with increased resistance and accumulation of HR molecular markers. These and other results identified *AtMYB30* as a positive regulator of the signalling pathway controlling the establishment of cell death in response to pathogen attack (6). Putative *AtMYB30* target genes are involved in the lipid biosynthesis pathway that leads to the production of very long chain fatty acids (VLCFAs), suggesting a role of this pathway in the control of the HR and plant defence responses (7).

Phospholipase A₂s (PLA₂s) hydrolyze membrane glycerophospholipids to yield lysophospholipids and free fatty acids in response to hormones and external stimuli. In animals, PLA₂ enzymes and their enzymatic products are involved in diverse cellular responses, including bioactive lipid production, inflammation, host defence and signal transduction (8). Evidence that phospholipid-derived molecules act as second messengers in plant signalling is also accumulating (9). Plant PLA₂s activities have been implicated in plant growth, development, stress responses and defence signalling (10,11). In *Arabidopsis*, the secretory PLA₂ family (*AtsPLAs*) consists of four isoforms denoted *AtsPLA₂-α*, *AtsPLA₂-β*, *AtsPLA₂-γ* and *AtsPLA₂-δ* (10). Plant sPLA₂s contain N-terminal signal peptides and are of

low molecular weight (13-18 kDa) after secretion. sPLA₂s have a highly conserved Ca²⁺-binding loop and an active site motif with a conserved His/Asp dyad (12).

TFs interact with a variety of proteins that act as regulatory molecules to modulate transcriptional activity in both plant and animal cells. Here we set out to identify proteins that interact with AtMYB30 using a yeast two-hybrid (Y2H) screen. We describe the identification of *AtsPLA₂-α* and its AtMYB30-mediated specific relocalization from cytoplasmic vesicles to the cell nucleus, where both proteins physically interact. Our results establish *AtsPLA₂-α* as a negative regulator of AtMYB30-mediated plant defence responses.

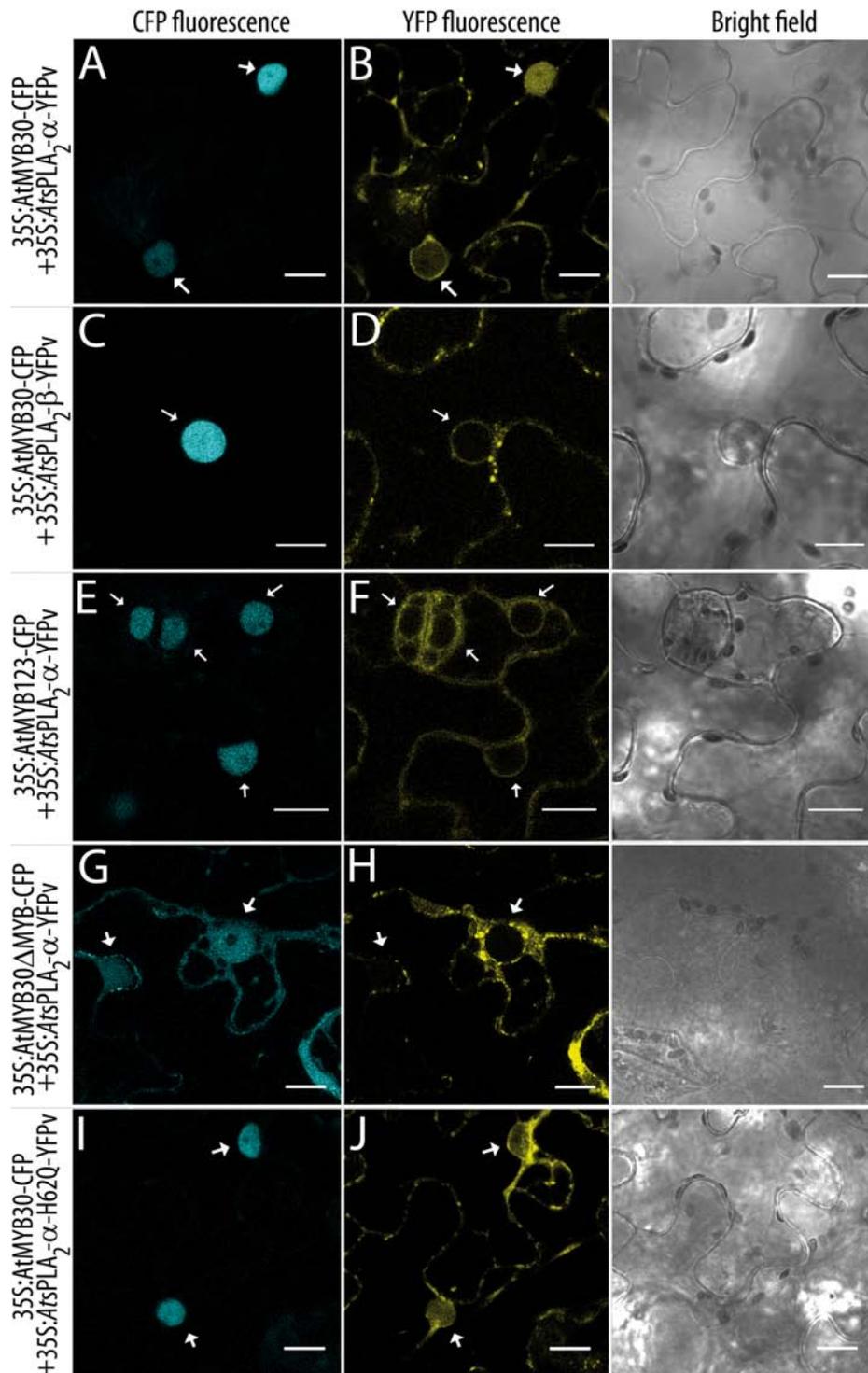


Fig.1. *AtsPLA2-α* is specifically targeted to the nucleus by AtMYB30. Confocal images of epidermal cells of *N. benthamiana* leaves expressing the indicated constructs 36 hpi. White arrows indicate cell nuclei. Bright field images are shown on the right. Bars = 15 μ m.

RESULTS

Identification of *AtsPLA₂-α*. To identify AtMYB30 interacting proteins, AtMYB30 was used as bait to screen a Y2H Arabidopsis cDNA library generated from mRNAs isolated from leaf tissue after bacterial inoculation. Different prey cDNA clones were identified. Here we describe the identification of a partial cDNA clone encoding the last 119 amino acid residues of the secretory phospholipase A₂-alpha (*AtsPLA₂-α*; At2g06925). Fig.S1 shows the specificity of the interaction between *AtsPLA₂-α* and AtMYB30 in yeast.

***AtsPLA₂-α* is relocalized to the cell nucleus in the presence of AtMYB30.** *Agrobacterium*-mediated transient expression of a *35S:AtMYB30-CFP* fusion in leaf epidermal cells of Arabidopsis seedlings, revealed a nuclear localization of AtMYB30 (Fig.S2A). As expected for a secreted phospholipase, a *35S:AtsPLA₂-α-YFPv* fusion was found to be located intracellularly in cytoplasmic vesicles and around the nucleus, early after agroinfiltration (Fig.S2C). At later time points, YFP fluorescence was detected outside the cells, indicating that *AtsPLA₂-α* had been secreted (Fig.S2E). Although individual proteins were detected after transformation, the efficiency of single cell co-transformation with both AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* was not high enough to allow colocalization studies. Therefore, transient protein expression was undertaken in *Nicotiana benthamiana*. Both AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* presented identical subcellular localization in *N. benthamiana* and Arabidopsis both 36 and 48 hpi (Fig.S2), validating our strategy to use *N. benthamiana* as a heterologous system.

When *AtsPLA₂-α* was co-expressed with AtMYB30, *AtsPLA₂-α* was partially relocalized to the cell nucleus (20% of nuclei; Fig.1A,B). The three other Arabidopsis proteins of the *AtsPLA₂* family, *AtsPLA₂-β*, *AtsPLA₂-γ* and *AtsPLA₂-δ*, which present the same subcellular localization and expression level that *AtsPLA₂-α*, were not relocalized to the nucleus in the presence of AtMYB30 (Fig.1C,D; Fig.S3). In addition, no relocalization of *AtsPLA₂-α* was detected after co-expression with the unrelated MYB TF AtMYB123 (13; Fig.1E,F). Expression of an AtMYB30 version lacking its MYB domain (AtMYB30ΔMYB), which is not exclusively localized in the nucleus but ubiquitously distributed throughout the cell, is not sufficient to induce the nuclear targeting of *AtsPLA₂-α* (Fig.1G,H), indicating that the MYB domain in AtMYB30 is necessary for *AtsPLA₂-α* nuclear relocalization. In addition, *AtsPLA₂-α* nuclear targeting is independent of its enzymatic activity since the inactive catalytic mutant *AtsPLA₂-α-H62Q* (12) is also relocalized to the nucleus in the presence of AtMYB30 (Fig.1I,J). Finally, expression of full length proteins fused to YFPv was confirmed

Table 1. FLIM measurements showing that AtMYB30 physically interacts with *AtsPLA₂-α* in the nucleus of *N. benthamiana* epidermal cells.

Donor	Acceptor	Lifetime ^(a)	SD ^(b)	N ^(c)	E ^(d)	p-value ^(e)
AtMYB30-CFP	-	2,306	0,030	60	-	-
AtMYB30-CFP	<i>AtsPLA₂-α</i> -YFPv	2,067	0,024	46	10,4	4.0 x 10 ⁻⁸
AtMYB30-CFP	<i>AtsPLA₂-α</i> -H62Q-YFPv	2,053	0,031	20	10,9	2.1 x 10 ⁻⁵
AtMYB30-CFP	AtMYB123-YFPv	2.278	0.041	31	-	0.58
AtMYB30ΔMYB-CFP	-	2.345	0.064	30	-	-
AtMYB30ΔMYB-CFP	<i>AtsPLA₂-α</i> -YFPv	2.323*	0.071	20	-	0.82

^aMean lifetime in nano seconds

^bStandard deviation

^cTotal number of measured nuclei

^dFRET efficiency percentage ($E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$) was calculated by comparing the lifetime of the donor in the presence of the acceptor (τ_{DA}) with its lifetime in the absence of the acceptor (τ_D).

^ep-value of the difference between the donor lifetimes in the presence and in the absence of the acceptor (t-test)

*Values were measured in areas outside the nucleus where *AtsPLA₂-α*-YFPv and AtMYB30ΔMYB colocalize.

by Western Blot in all cases (Fig.S4), showing that nuclear detection of YFP fluorescence is due to nuclear relocalization of *AtsPLA₂-α* and not to passive diffusion of truncated YFPv.

Biochemical validation of the AtMYB30-mediated relocalization of *AtsPLA₂-α* was obtained by purifying nuclei from cells expressing the different constructs. AtMYB30 was only detected in nuclear fractions whereas HA-tagged *AtsPLA₂s* were consistently found in the supernatant fraction, from which nuclei had been removed (Fig.5SA). We next tested the specificity of the weak signal observed in nuclear fractions only when coexpressing AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* or *AtsPLA₂-α-H62Q* (Fig.5SA). After anti-HA immunoprecipitation of purified nuclear fractions, *AtsPLA₂-α* and *AtsPLA₂-α-H62Q*, but not *AtsPLA₂-β*, *AtsPLA₂-γ* or *AtsPLA₂-δ*, were detected when expressed with AtMYB30 but not AtMYB123 (Fig.5SB). Moreover, AtMYB30 was specifically detected in the same fractions.

Our data demonstrate the specificity of AtMYB30-mediated *AtsPLA₂-α* nuclear targeting and strongly suggest that *AtsPLA₂-α* is able to interact with AtMYB30 in the nucleus.

***AtsPLA₂-α* physically interacts with AtMYB30 in the cell nucleus.** The physical interaction between *AtsPLA₂-α* and AtMYB30 in the nucleus was further tested using a quantitative non-invasive FLIM approach to monitor the Förster resonance energy transfer (FRET) between the CFP (donor) and YFPv (acceptor) molecules fused to AtMYB30 and *AtsPLA₂-α*, respectively. If the two proteins interact, the transfer of energy from the CFP to the YFP decreases the fluorescence lifetime of the CFP fluorophore. A significant reduction of the average CFP lifetime was measured in nuclei coexpressing AtMYB30-CFP and *AtsPLA₂-α*-YFPv, or the inactive mutant *AtsPLA₂-α-H62Q*-YFPv, as compared to nuclei expressing AtMYB30-CFP alone (Table 1). These data show that *AtsPLA₂-α* interacts with AtMYB30 in the nucleus and that this protein interaction does not depend on the enzymatic activity of *AtsPLA₂-α*, in agreement with data obtained in yeast (Fig.S1B). When AtMYB30-CFP was coexpressed with the nuclear TF AtMYB123-YFPv, no protein interaction could be detected, as shown by an average CFP lifetime that is not significantly different from that of AtMYB30-CFP alone, confirming that reduction of AtMYB30-CFP lifetime in the presence of *AtsPLA₂-α*-YFPv is not due to non-specific transfer of energy between the two fluorophores. Although *AtsPLA₂-α* is not relocalized to the nucleus by AtMYB30ΔMYB, both proteins colocalize in the cytoplasm (Fig.1G,H). However, no physical interaction between the two proteins was detected in the cytoplasm, as shown by an average CFP lifetime similar to that of the CFP alone (Table 1), indicating that the MYB domain of AtMYB30 is

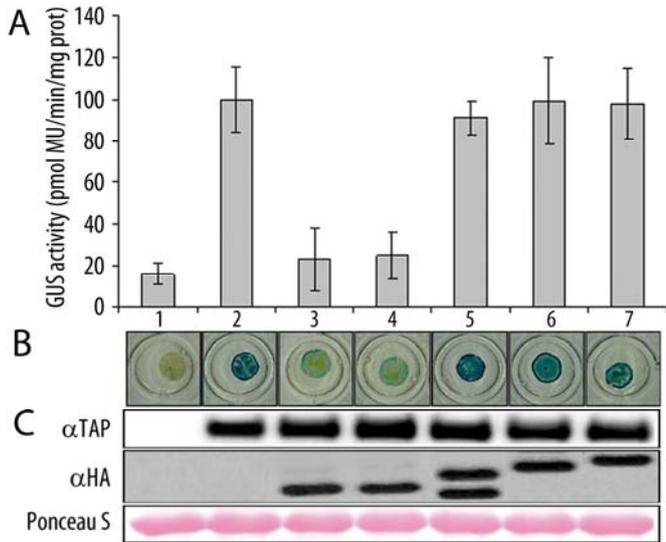


Fig.2. *AtsPLA₂-α* represses *AtMYB30* transcriptional activity. Transient transactivation of the *KCS1p* by *AtMYB30* in *N. benthamiana* leaves. 1, *KCS1p*:GUS reporter alone or with: 2, *AtMYB30*-TAP; 3, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-α*-HA; 4, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-α*-H62Q-HA; 5, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-β*-HA; 6, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-γ*-HA; 7, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-δ*-HA. Fluorimetric (A) and histochemical (B) GUS assays in leaf discs 36 hpi. Mean and SEM values are calculated from 8 independent experiments (2-4 replicates/experiment). MU, methylumbelliferone. (C) Western Blot showing expression of *AtMYB30*-TAP and HA-tagged *AtsPLA₂* constructs. Ponceau S staining confirms equal loading.

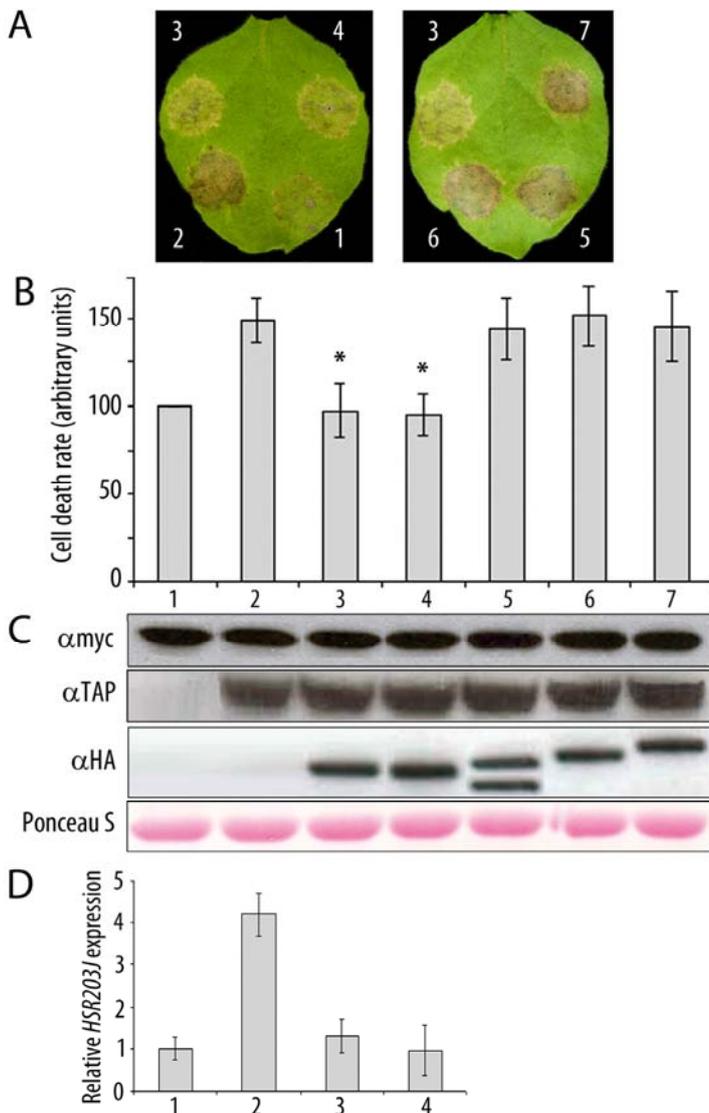


Fig.3. *AtsPLA₂-a* negatively regulates HR development. 1, *AvrRpt2*-myc alone or with: 2, *AtMYB30*-TAP; 3, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-α*-HA; 4, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-α*-H62Q-HA; 5, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-β*-HA; 6, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-γ*-HA; 7, *AtMYB30*-TAP+*AtsPLA₂-δ*-HA. (A) HR development for each combination 3 dpi. (B) Cell death quantification by measuring the uptake of Evans blue 48 hpi. Values are related to that of *AvrRpt2*-myc, which is set at 100%. Mean and SEM values are calculated from 4 independent experiments (3 replicates/experiment). Statistical significance according to a Student's t test P value < 10⁻⁷ is indicated by stars. (C) Western Blot showing expression of *AvrRpt2*-myc, *AtMYB30*-TAP and HA-tagged *AtsPLA₂* constructs. Ponceau S staining of the membrane confirms equal loading. (D) *HSR203J* transcript levels determined by Q-RT-PCR 48 hpi. Expression values are normalized using the expression level of *β-tubulin 4* and related to the value of *HSR203J* expression in leaves expressing *AvrRpt2*-myc, which is set at 1. Mean and SEM values are calculated from 3 independent experiments (3-5 replicates/experiment).

necessary for the interaction with *AtsPLA₂-α*. Finally, no evidence of protein interaction between AtMYB30-CFP and *AtPLA₂-β*-YFPv, *AtPLA₂-γ*-YFPv or *AtPLA₂-δ*-YFPv could be obtained, in agreement with the observation that neither of these proteins was relocalized to the nucleus in the presence of AtMYB30 (Fig.1C,D; Fig.S3). Together, these data provide strong evidence of a specific physical interaction between AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* *in planta*, independently of the enzymatic activity of *AtsPLA₂-α*.

***AtPLA₂-α* negatively regulates AtMYB30 transcriptional activity and HR control in *N. benthamiana*.** *KCS1* (β-keto acyl-CoA synthase), involved in the biosynthesis of VLCFAs (14), was previously proposed as one of the target genes of AtMYB30 (7). We next tested the effect of *AtsPLA₂-α* on AtMYB30-mediated transcriptional activation of the *KCS1* promoter (*KCS1p*) fused to a *GUS* reporter gene. As previously reported, overexpression of AtMYB30 induced *KCS1p* transcriptional activation (Fig.2A,B). Interestingly, when co-expressed with *AtsPLA₂-α*, or the catalytic mutant *AtsPLA₂-α*-H62Q, AtMYB30-mediated transcriptional activation of *KCS1p* was significantly reduced (Fig.2A,B), indicating that the observed effect does not depend on *AtsPLA₂-α* enzymatic activity. In contrast, no effect on *KCS1p* activation was observed when the other *AtsPLA₂* isoforms were coexpressed with AtMYB30, underlining the specific effect of *AtsPLA₂-α* in the control of AtMYB30 transcriptional activity. Western Blot confirmed equal protein expression (Fig.2C).

As previously shown in Arabidopsis and tobacco plants overexpressing AtMYB30 (6), AtMYB30-TAP overexpression in *N. benthamiana* accelerates and enhances the HR induced by the expression of the *Pseudomonas* effector AvrRpt2 (15; Fig.3A), showing that AtMYB30 retains its function as positive regulator of the HR in *N. benthamiana*. Co-expression of *AtsPLA₂-α*, or *AtsPLA₂-α*-H62Q, with AtMYB30 has a negative effect on the development of the AvrRpt2-triggered HR, whereas the other *AtsPLA₂s* do not affect HR progress, demonstrating that the negative effect of *AtsPLA₂-α* on HR development is specific and independent of its enzymatic activity (Fig.3A). These results were confirmed by quantification of the uptake of Evans blue in leaf disk assays. In the presence of AvrRpt2, the accumulation of Evans blue was significantly lower in leaves co-expressing AtMYB30 and *AtsPLA₂-α*, or *AtsPLA₂-α*-H62Q, but not *AtsPLA₂-β*, *AtsPLA₂-γ* or *AtsPLA₂-δ*, as compared to leaves where AtMYB30 was expressed alone (Fig.3B). Western Blot confirmed expression of all proteins (Fig.3C). Finally, accumulation of *HSR203J* transcript, a well known marker of HR cell death in tobacco (16), was significantly higher in *N. benthamiana* leaves coexpressing

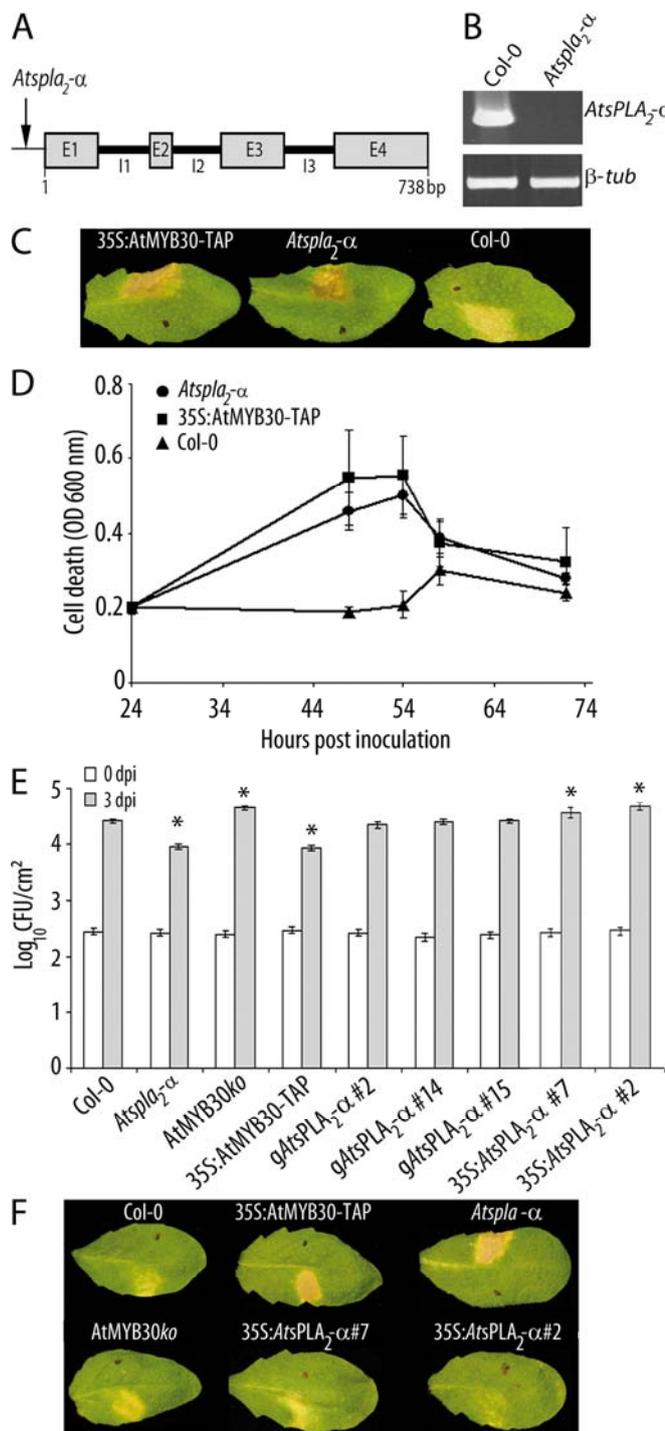


Fig.4. Altered *AtsPLA₂-a* expression modifies Arabidopsis HR and resistance to bacteria. (A)

Representation of *AtsPLA₂-a* genomic organization. Exons (E1-E4) are represented with grey boxes and introns (I1-I3) are shown as black thick lines. The arrow indicates the insertion site of the T-DNA in the *Atspla₂-a* mutant. (B) RT-PCR analysis of *AtsPLA₂-a* transcript accumulation in wild type Col-0 and *Atspla₂-a* mutant Arabidopsis leaves. *β-tubulin 4* was used as an internal control for equal cDNA loading. (C, F) Symptoms developed by the indicated Arabidopsis lines 64 (C) or 50 (F) hpi with *Pst AvrRpm1* at 2×10^6 cfu/ml. 1 cm² area of the half leaf opposite to the black dot was infiltrated. Pictures are representative of three independent experiments in which 5 plants of each line were infiltrated. (D) Quantification of cell death by measuring the uptake of Evans blue in the indicated lines, after inoculation with *Pst AvrRpm1* as indicated in (C). Mean and SEM values are calculated from 5 replicates of one representative experiment out of three. (E) Growth of *Pst AvrRpm1* in the indicated Arabidopsis lines 0 (white bars) and 3 dpi (grey bars) with a bacterial suspension of 5×10^5 cfu/ml. Mean bacterial densities are calculated from 3 independent experiments (6 individual plants/experiment).

*, statistical significant difference using Multiple Factor ANOVA (p-value < 0.05).

AvrRpt2 and AtMYB30, compared to those expressing AvrRpt2 (Fig.3D). However, the AtMYB30-mediated overaccumulation of *HSR203J* was lost when *AtsPLA₂-α*, or *AtsPLA₂-α-H62Q*, were coexpressed with AtMYB30 (Fig.3D), providing molecular confirmation of the negative role played by *AtsPLA₂-α* on the AtMYB30-mediated HR in *N. benthamiana*.

***AtPLA₂-α* negatively regulates AtMYB30 HR and defence responses in Arabidopsis.**

Genetic characterization of four candidate mutant lines of the SALK collection (<http://signal.salk.edu/>) allowed us to identify one homozygous *Atspla₂-α* knockout line (SALK_099415) containing a T-DNA insertion at position -43 of the predicted open reading frame that completely abolished *AtsPLA₂-α* expression (Fig.4A,B).

We first tested HR development in *Atspla₂-α* mutant plants after inoculation with the bacterial strain *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 carrying the avirulence gene *AvrRpm1* (*Pst AvrRpm1*). In these assays, we used a bacterial inoculum of 2×10^6 cfu/ml, to delay the timing of HR appearance and the magnitude of the response and allow clearer visualization of differential HR symptoms. In these conditions, and consistent with the results obtained in *N. benthamiana*, mutant *Atspla₂-α* and 35S:AtMYB30-TAP plants overexpressing AtMYB30 showed earlier and stronger HR development compared to Col-0, which showed chlorosis symptoms, 64 hpi (Fig.4C). This phenotype was quantified by measuring the uptake of Evans blue in leaf disk assays. The Evans blue coloration peaked earlier and reached higher values in the *Atspla₂-α* and 35S:AtMYB30-TAP lines than in Col-0 (Fig.4D), confirming the role of *AtsPLA₂-α* as a negative regulator of cell death development in Arabidopsis. In addition, mutant *Atspla₂-α* and 35S:AtMYB30-TAP lines, but not an AtMYB30*ko* mutant (17), were more resistant to inoculation with *Pst AvrRpm1*, as shown by reduced *in planta* bacterial growth compared to Col-0 plants (Fig.4E). Also, the *Atspla₂-α* mutation conferred increased resistance to inoculation with the additional bacterial strain *Pst AvrRps4* (Fig.S6).

Genetic complementation of the *Atspla₂-α* mutant was performed using a 4589 bp genomic sequence from Col-0 containing the complete *AtsPLA₂-α* open reading frame driven by 3248 bp of the native 5' regulatory sequence and 603 bp of the 3' terminator sequence (*gAtsPLA₂-α*). Three independent homozygous *gAtsPLA₂-α* complemented T2 lines displayed *AtsPLA₂-α* gene expression and bacterial growth rates similar to those of wild type plants after inoculation with *Pst AvrRpm1* (Fig.S7; Fig.4E), showing that increased resistance in *Atspla₂-α* plants is causally related to loss of function of *AtsPLA₂-α*.

To obtain additional confirmation of the negative role played by *AtsPLA₂-α* on

AtMYB30-mediated response, Arabidopsis transgenic plants overexpressing a *35S:AtsPLA₂- α -HA* construct were generated. Expression of *AtsPLA₂- α* was monitored by RT-PCR and Western Blot in two T3 homozygous independent lines (Fig.S7). To better discriminate the phenotypes shown by the different lines, plant inoculation was performed using *Pst AvrRpm1* with a bacterial density of 2×10^6 cfu/ml and symptom development was examined 50 hpi. As shown before, *Atspla₂- α* and *35S:AtMYB30-TAP* plants developed stronger HR as compared to Col-0, whereas *35S:AtsPLA₂- α -HA* plants exhibited chlorosis symptoms similar to those developed by *AtMYB30ko* plants (Fig.4F). Consistent with this observation, *35S:AtsPLA₂- α -HA*, and *AtMYB30ko*, plants were more susceptible to inoculation with *Pst AvrRpm1*, as shown by increased *in planta* bacterial growth compared to wild-type plants (Fig.4E).

Together, our results demonstrate that *AtsPLA₂- α* acts as a negative regulator of Arabidopsis HR and resistance.

DISCUSSION

***AtsPLA₂-α*, a new protein partner for a plant transcription factor, with a novel function as a regulator of plant defence.** Physical or functional interactions between cytoplasmic PLA₂s (cPLA₂) and proteins involved in transcriptional regulation have been previously suggested in animal cells (18,19). In contrast, besides the more classic examples of plant MYB TFs interacting with bHLH and WD40 repeat proteins to regulate secondary metabolism and epidermal cell fate identity (20), our work shows the first documented interaction between a phospholipase and a MYB protein.

Cellular functions of the four Arabidopsis sPLA₂s are poorly characterized, although *AtsPLA₂-β* has been implicated in the control of cell elongation and shoot gravitropism (21). The amino acid sequence, enzymatic properties and expression pattern of *AtsPLA₂-α* are distinguishable from those of the other three *AtsPLA₂* isoforms, suggesting that it may play a distinct role that differs from that of the other *AtsPLA₂*s (22). Here we show that the Arabidopsis TF AtMYB30 partially modifies the targeting of *AtsPLA₂-α* from cytoplasmic vesicles to the nucleus, where both proteins interact. The observation that (i) AtMYB30 is not able to interact with the other three isoforms of the *AtsPLA₂* subfamily, which are expressed in the same cellular compartment and at similar levels than *AtsPLA₂-α*, and (ii) *AtsPLA₂-α*, does not interact with the unrelated nuclear MYB TF AtMYB123, strongly suggest that the detected interaction between AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* is specific and not related to protein overexpression. Interestingly, our results are reminiscent of those obtained for a cytosolic animal PLA₂ protein, which is relocalized to the nucleus upon interaction with the B-MYB TF, where it inhibits B-MYB-dependent target gene expression (19). Moreover, the authors postulated that cPLA₂ would play a role in the inhibition of proliferation and cell death in the nucleus. Consistent with this hypothesis, we show that downregulation of AtMYB30 transcriptional activity by *AtsPLA₂-α* correlates with the inhibition of the plant hypersensitive cell death. The resemblance between both processes represents an example of the still poorly documented conservation of the mechanisms controlling cell death in plants and animals.

Participation of sPLA₂s in host defence, either as major antibacterial factors or as biologically active molecules modulating immune or inflammatory responses, has been previously documented in animal cells (23,24). Experimental evidence of the involvement of sPLA₂s in plant defence is, in contrast, more limited. Similar to the eicosanoid pathway in animals, the plant octadecanoid pathway leads to the production of oxylipins and jasmonic acid, which play important roles in cell death and plant defence signalling against pathogens

and herbivores (25,26). Elicitor-induced PLA activity has been reported in a variety of plant-pathogen interactions (27,28). These and other studies suggest that PLA activity is involved in the plant response to pathogen elicitors, but the nature of its involvement remains unclear.

To our knowledge, this is the first report of direct involvement of a sPLA₂ in the regulation of cell death and plant resistance responses. Based on our data, we propose that *AtsPLA₂-α* may control AtMYB30-mediated response through the physical interaction between the two proteins rather than through a lipid signal produced by *AtsPLA₂-α*. In agreement with this assumption, new functions have been attributed to sPLA₂s that do not require enzymatic activity in animal cells. For example, it has been reported that sPLA₂s may serve as high affinity ligands for cell surface receptors (29) or be able to bind proteoglycans with high affinity due to their overall positive charge (30). Although our knowledge of the cellular functions of plant PLAs is limited, our work suggests that, similar to animal PLAs, their functions may extend beyond those related to their catalytic activities.

Nuclear translocation of *AtsPLA₂-α* as another example of protein trafficking towards the nucleus for defence-associated gene regulation. Accumulating evidence indicates that spatial restriction of defence regulators by the nuclear envelope and stimulus-induced nuclear translocation constitute an important level of defence-associated gene regulation in plants. Some R proteins, defence regulators and essential components of the Arabidopsis immune response traffic between the cytoplasm and the nucleus, as part of a key process in plant innate immunity that provides a possible framework for defence signal trafficking between the two compartments (31,32). Finally, cytoplasmic retention of inactive TFs or transcriptional regulators, and their activation and signal-dependent translocation into the nucleus, allows plants to rapidly connect signal perception at the cell surface, and cytoplasmic signal transduction, to defence gene activation in a stimulus-dependent manner (33).

At least one chloroplastic and two endomembrane proteins have been previously reported as being relocalized to the nucleus. NRIP1, a tobacco rhodanase sulfurtransferase that normally localizes to the stroma of chloroplasts, is recruited to the cytoplasm and nucleus by the Tobacco Mosaic Virus p50 effector in a process that, similar to *AtsPLA₂-α*, is independent of the enzymatic activity of NRIP1 and important for plant cell death and defence responses (34). The *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 induces nuclear targeting of the cysteine protease RESPONSIVE TO DEHYDRATATION19 (RD19), otherwise localized to mobile vacuole-associated vesicles and destined to the lytic vacuole (35). The tomato LeCp vacuolar protease acts as a nuclear TF, following treatment with the EIX elicitor (36). Although, as in

our case, details of the molecular mechanism behind the nuclear relocalization of these proteins remain unknown, these are important findings that strengthen the biological significance of our data. It has been proposed that EIX and PopP2 might trigger a vacuole membrane collapse leading to the respective release of LeCp and RD19 from vacuole-associated compartments into the cytoplasm, where they may become available for SUMOylation, thereby allowing their nuclear targeting. Similarly, AtMYB30 might release *AtsPLA₂-α* from vesicle-associated compartments to the nucleus *via* an unknown mechanism that may (or may not) involve a SUMOylation process. Intriguingly, the SUMOplot program (<http://www.abgent.com/tools/sumoplot>) predicts two lysine residues in *AtsPLA₂-α* (K81, K146) with high probability of being SUMOylated. The export of *AtsPLA₂-α* may be similar to the release of pro-cell death signals from the mitochondria, such as cytochrome c, during the initial steps of apoptosis in animal cells (37). Binding of AtMYB30 to *AtsPLA₂-α* may mask an *AtsPLA₂-α* vesicle targeting signal or AtMYB30 may indirectly disrupt global vesicle sorting affecting *AtsPLA₂-α* translocation. Alternatively, we cannot rule out that AtMYB30 may intercept *AtsPLA₂-α* on its way to the extracellular space *via* retrograde transport from the endomembrane system, which has some continuity with the nuclear envelope.

***AtsPLA₂-α* regulates HR development *via* temporal and spatial control of AtMYB30 activity.** Plant resistance to disease is a costly response, intimately connected to general plant developmental processes, which reduces the fitness of the host in the absence of disease (38). Mutants with constitutively active defence responses, or with HR lesion-mimic phenotypes, often show stunted growth and low fertility. Therefore, defence responses need to be tightly regulated to be, not only efficient but also, beneficial to the plant. Fig.S8 shows a temporal and spatial analysis of *AtsPLA₂-α* and *AtMYB30* expression. Induction of *AtMYB30* expression is specifically located in the inoculated zone 4 hpi, whereas *AtsPLA₂-α* expression peaks 6 hpi in the area immediately neighbouring the inoculated zone. In contrast, no modification of *AtMYB30* or *AtsPLA₂-α* expression was observed in the adjacent or inoculated zone, respectively. A model that illustrates the complementary character of the expression pattern of *AtsPLA₂-α* and *AtMYB30* is presented in Fig.S8D. In this model, *AtsPLA₂-α* low expression level in the inoculated zone allows only weak repression of the activity of AtMYB30. In contrast, in the leaf area immediately neighbouring the inoculated zone, *AtsPLA₂-α* acts as an efficient negative regulator of AtMYB30 action, by sequestering

AtMYB30 and preventing it from activating its targets. According to this model, it is tempting to speculate that the complementary character of *AtsPLA₂-α* and *AtMYB30* expression, together with the negative control exerted by *AtsPLA₂-α* on AtMYB30 activity, provide an efficient mechanism to restrict HR development to the inoculated zone, thereby preventing spreading of cell death throughout the leaf. However, *Atspla₂-α* mutant plants do not show spreading HR after pathogen challenge, showing that the negative regulation exerted by *AtsPLA₂-α* on AtMYB30 action is not the only factor controlling HR restriction to the inoculated zone. We thus propose that *AtsPLA₂-α* represents an additional element contributing to the negative regulation of defence as part of the necessary to the fine-tuning of plant responses to pathogen attack to avoid deleterious effects to the host.

MATERIALS AND METHODS

Y2H Screening. An *Arabidopsis thaliana* Gal4 Y2H cDNA prey library (MatchMaker; Clontech) was generated from mRNA isolated from leaves of 4-week-old Ws-4 plants infiltrated with the *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 147 strain (7). An AtMYB30 version deleted from its C-terminal activation domain (amino acids 1 to 234) was used as bait for screening 2×10^6 independent transformants exhibiting His auxotrophy on selective plates.

Constructs. Primers used in this study are shown Table S1. Details of cloning procedures are provided as Supporting Information.

Plant and Bacterial Materials. Arabidopsis lines used in this study were in the Columbia background and grown in Jiffy pots under controlled conditions (17). The AtMYB30*ko* line was described before (17). *Agrobacterium*-mediated transient expression in *N. benthamiana* leaves and Arabidopsis seedlings was performed as described (7,39). Plant inoculation with *Pst AvrRpm1* or *Pst AvrRps4* and *in planta* bacterial growth analysis was performed as described (17). Data were submitted to a statistical analysis using Statgraphics Centurion XV.II Professional Software (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Normality of residues was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. The effect of the genotype was tested by Multiple Factor ANOVA ($p < 0.05$).

RNA Extraction and Q-RT-PCR Analysis. Q-RT-PCR was performed according to (7). Primers used for Q-RT-PCR are described in Table S1. Relative expression was calculated as the ΔC_p between each gene and the average of internal controls [*SAND* family (At2g28390) and *β -tubulin 4* (At5g44340)].

Protein Gel Blot Analysis. Protein extracts were prepared as described (7). Nuclear fractionation was performed according to (32). For detection of TAP-, YFP-, myc- and HA-tagged proteins, blots were respectively incubated with rabbit PAP soluble complex (SIGMA), mouse monoclonal anti-GFP IgG₁ K (clones 7.1 and 13.1; Roche), mouse monoclonal anti-c-myc (clone 9E10; Roche) and rat monoclonal anti-HA (clone EF10; Roche) antibodies, linked to horseradish peroxidase, at a final dilution of 1:5,000. Anti-Hsc70 (plant ER, BIP) mouse monoclonal antibodies (1D9; Stressgen) were used at 1: 2,000.

Fluorescence Microscopy and FLIM Analysis. CFP and YFPv fluorescence in *N. benthamiana* leaves was analyzed with a confocal laser scanning microscope as described (35). FLIM assays were performed as described (35). Statistical comparisons between control (donor alone) and assay (donor+acceptor) lifetime values were performed using Student t-test.

Fluorimetric GUS Assays. GUS activity was measured 36 hpi using the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide as described (7). After protein extraction, 1 μ g of total protein was used in replicates to measure enzymatic activities of individual samples.

Quantification of cell death. Cell death was quantified by monitoring the uptake of Evans blue (0.25%) by leaf discs from *N. benthamiana* leaves 48 hpi, following a described protocol (17). For Arabidopsis assays, 5 leaf discs (5 mm diameter) from each infiltrated plant were harvested at the indicated times points after infiltration of *Pst AvrRpm1* at 2.10^6 cfu/mL.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Céline Remblière for help with plant transformation and Laurent Deslandes for helpful discussions. S.F. and J.C. were respectively funded by a grant from the CNRS (Bourse Docteur-Ingénieur) and the French Ministry of National Education and Research. X.D. was funded by VILMORIN & Cie and Biogemma.

REFERENCES

1. Mur LA, et al. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59: 501-20.
2. Eulgem T (2005) Regulation of the Arabidopsis defence transcriptome. *Trends in Plant Science* 10: 71-77.
3. Martin C, Paz-Ares J (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* 13: 67-73.
4. Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-56.
5. Daniel X, Lacomme C, Morel JB, Roby D (1999) A novel myb oncogene homologue in Arabidopsis thaliana related to hypersensitive cell death. *Plant J* 20: 57-66.
6. Vaillau F, et al. (2002) A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10179-10184.
7. Raffaele S, et al. (2008) A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20: 752-767.
8. Six DA, Dennis EA (2000) The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488: 1-19.
9. Munnik T, Testerink C (2009) Plant phospholipid: "in a nutshell". *J. Lipid Res.* 50: S260-S265.
10. Ryu SB (2004) Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science* 9: 229-235.
11. Wang X (2004) Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7: 329-336.
12. Mansfeld J, Gebauer S, Dathe K, Ulbrich-Hofmann R (2006) Secretory phospholipase A2 from Arabidopsis thaliana: insights into the three-dimensional structure and the amino acids involved in catalysis. *Biochemistry* 45: 5687-94.
13. Nesi N, et al. (2001) The Arabidopsis TT2 Gene Encodes an R2R3 MYB Domain Protein That Acts as a Key Determinant for Proanthocyanidin Accumulation in Developing Seed. *The Plant Cell* 13: 2099-2114.
14. Pruitt RE, et al. (2000) FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1311-1316.
15. Mudgett MB, Staskawicz BJ (1999) Characterization of the Pseudomonas syringae pv. tomato AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* 32: 927-41.
16. Pontier D, et al. (2001) Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene HSR203J, a molecular marker of the hypersensitive response. *The Plant Journal* 26: 495-507.
17. Raffaele S, Rivas S, Roby D (2006) An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett* 580: 3498-504.
18. Pawliczak R, et al. (2002) 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 33153-63.
19. Tashiro S, et al. (2004) B-Myb-dependent regulation of c-Myc expression by cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 279: 17715-22.
20. Ramsay NA, Glover BJ (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 10: 63-70.

21. Lee HY, et al. (2003) Secretory low molecular weight phospholipase A2 plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 1990-2002.
22. Ryu SB, Lee HY, Doelling JH, Palta JP (2005) Characterization of a cDNA encoding Arabidopsis secretory phospholipase A2-alpha, an enzyme that generates bioactive lysophospholipids and free fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1736: 144-51.
23. Gronroos JO, et al. (2005) Roles of group IIA phospholipase A2 and complement in killing of bacteria by acute phase serum. *Scand J Immunol* 62: 413-9.
24. Triggiani M, Granata F, Frattini A, Marone G (2006) Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1289-300.
25. Blee E (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* 7: 315-22.
26. Katsir L, Chung HS, Koo AJ, Howe GA (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol* 11: 428-35.
27. Chandra S, Heinsteinst PF, Low PS (1996) Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiol* 110: 979-986.
28. Gobel C, et al. (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem* 276: 6267-73.
29. Boyanovsky BB, Webb NR (2009) Biology of secretory phospholipase A2. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 61-72.
30. Rosengren B, et al. (2006) Secretory phospholipase A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1579-85.
31. Liu J, Coaker G (2008) Nuclear trafficking during plant innate immunity. *Molecular Plant* 1: 411-422.
32. Feys BJ, et al. (2005) Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell* 17: 2601-13.
33. Dong X (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7: 547-52.
34. Caplan JL, et al. (2008) Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* 132: 449-62.
35. Bernoux M, et al. (2008) RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the Ralstonia solanacearum PopP2 effector. *Plant Cell* 20: 2252-64.
36. Matarasso N, Schuster S, Avni A (2005) A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. *Plant Cell* 17: 1205-16.
37. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757: 639-47.
38. Heil M (2002) Ecological costs of induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 5: 345-50.
39. Marion J, et al. (2008) Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J* 56: 169-79.

SUPPORTING INFORMATION

Cloning procedures.

For the yeast two-hybrid assays, GAL4-BD-AtMYB30, GAL4-BD-AtMYB30 Δ AD, GAL4-BD-AtMYB30-AD and GAL4-BD-AtMYB123 Δ AD fusions were obtained after amplification of the *AtMYB30* gene with primers AtMYB30-EcoRI-S and AtMYB30-XhoI-AS, AtMYB30-EcoRI-S and AtMYB30 Δ AD-XhoI-AS, and AtMYB30AD-EcoRI-S, AtMYB30AD-XhoI-AS and AtMYB123-EcoRI-S and AtMYB123 Δ AD-XhoI-AS, respectively, followed by ligation into pGBKT7 vector after EcoRI and XhoI digestion.

AtMYB123 entry clone was obtained after amplification of the *AtMYB123* gene with primers AttB1-AtMYB123-AscI and AttB2-AtMYB123-PmeI, followed by ligation into pK207 (kind gift from L. Deslandes) after AscI and PmeI digestion.

Other plasmids used in this study were constructed by Gateway technology (GW; Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. PCR products flanked by the attB sites were recombined into the pDONR 207 vector (Invitrogen) via a BP reaction to create the corresponding entry clones with attL sites. Inserts cloned into the entry clones (pENTR) were subsequently recombined into the destination vectors via an LR reaction to create the expression constructs.

AtMYB30 and AtMYB30 Δ MYB were amplified using primers AttB1-MYB30 and AttB2-MYB30, and AttB1-MYB30 Δ MYB and AttB2-MYB30 Δ MYB, respectively.

Col-0 genomic DNA was used as a template for the amplification of the *AtsPLA₂- α* gene (*gAtsPLA₂- α* , a 4589 bp fragment extending 3248 bp before the start codon and 603 bp after the stop codon), using primers AttB1-*gPLA₂- α* and AttB2-*gPLA₂- α* . pENTR-*gPLA₂- α* was recombined with the pAM-PAT-GW destination vector (Bernoux et al., 2008) to generate the pAM-PAT-*gPLA₂- α* binary plasmid.

The full-length *AtsPLA₂- α* , *AtsPLA₂- β* , *AtsPLA₂- γ* and *AtsPLA₂- δ* cDNA clones were amplified, using primers AttB1-*PLA₂- α* and AttB2-*PLA₂- α* , AttB1-*PLA₂- β* and AttB2-*PLA₂- β* , AttB1-*PLA₂- γ* and AttB2-*PLA₂- γ* and AttB1-*PLA₂- δ* and AttB2-*PLA₂- δ* , respectively, from first-strand cDNAs synthesized from 1.5 μ g of total RNA (Col-0; 1-week-old seedlings) using oligo(dT) primer and Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France).

The inactive catalytic mutant version of *AtsPLA₂- α* , *AtsPLA₂- α -H62Q* was engineered using chimeric PCR. Two PCR products were produced with primers AttB1-*PLA₂- α* and *PLA₂- α -*

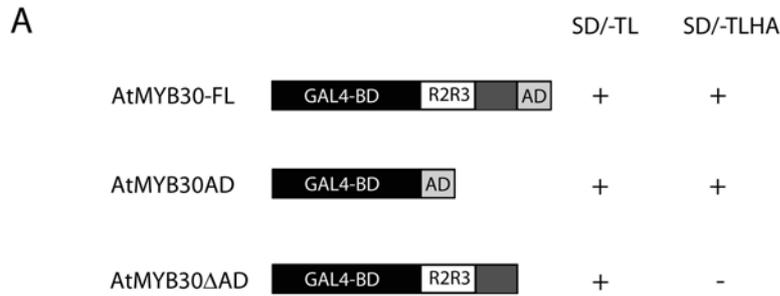
H62Q-AS, and PLA₂- α -H62Q-S and AttB2-PLA₂- α , using pENTR-*AtsPLA*₂- α as a template. These two products were used in an overlapping PCR with primers AttB1-PLA₂- α and AttB2-PLA₂- α .

The AttB1-*AtsPLA*₂- α -AttB2, AttB1-*AtsPLA*₂- α -H62Q-AttB2, AttB1-*AtsPLA*₂- β -AttB2, AttB1-*AtsPLA*₂- γ -AttB2 and AttB1-*AtsPLA*₂- δ -AttB2 PCR products were recombined into the pDONR 207 vector (Invitrogen) via a BP reaction to produce the pENTR-*AtsPLA*₂- α , pENTR-*AtsPLA*₂- α -H62Q, pENTR-*AtsPLA*₂- β , pENTR-*AtsPLA*₂- γ and pENTR-*AtsPLA*₂- δ constructs.

AD- *AtsPLA*₂- α , AD- *AtsPLA*₂- α -H62Q and AD- *AtsPLA*₂- β clones for Y2H assays were generated from recombination of the corresponding pENTR constructs with the pGAD-AD-GTW vector, kindly provided by Laurent Deslandes.

HA-, CFP- and YFPv (YFP_{venus})-tagged proteins were generated from recombination of the corresponding pENTR constructs with the pBin19-35S-GW-3HA, pBin19-35S-GW-CFP and pBin19-35S-GW-YFPv destination vectors, respectively (YFPv for YFP_{venus}, an enhanced form of the YFP; (Nagai et al., 2002)).

The *KCS1p*:GUS and 35S:AtMYB30-TAP constructs were described previously (Raffaele et al., 2008).



B

	SD/-TL	SD/-TLHA	
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ³⁰⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ²¹⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ¹⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ³⁰⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ²¹⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ¹⁻¹⁴⁸
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ β ²⁹⁻¹⁴⁷
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ β ¹⁻¹⁴⁷
BD-AtMYB123ΔAD	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ²¹⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ³⁰⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ²¹⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α ¹⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ³⁰⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ²¹⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ α-H62Q ¹⁻¹⁴⁸
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ β ²⁹⁻¹⁴⁷
BD-p53	●	●	AD-AtsPLA ₂ β ¹⁻¹⁴⁷
BD-AtMYB30ΔAD	●	●	AD-T-antigen
BD-AtMYB123ΔAD	●	●	AD-T-antigen
BD-p53	●	●	AD-T-antigen
BD-laminC	●	●	AD-T-antigen

Fig. S1. Specific interaction between AtMYB30 and *AtsPLA₂-α* in yeast (A) AtMYB30 putative transcriptional trans-activation domain is functional in yeast. To identify AtMYB30 interacting proteins, an AtMYB30 version deleted from its C-terminal potential transcriptional activation domain was used as bait to screen the generate yeast two-hybrid Arabidopsis cDNA library. The choice of the bait was due to the fact that the presence of

AtMYB30 activation domain (AtMYB30AD) led to autoactivation of yeast reporter genes. AtMYB30-FL (top), AtMYB30AD (middle) and AtMYB30 Δ AD (bottom) were used as N-terminal fusions to the DNA binding domain of the GAL4 protein (GAL4-BD) to transform the AH109 yeast strain. Yeast grow on non-selective (SD/-TL) and high stringency medium (SD/-TLHA), three days after transformation, is indicated. **(B)** Yeast two-hybrid assay of the interaction between AtMYB30 and *AtsPLA*₂- α . Yeasts are shown after growth for 5 days on low stringency (left; SD/-TL) or high stringency medium (right; SD/-TLHA). *AtsPLA*₂- α ³⁰⁻¹⁴⁸: *AtsPLA*₂- α clone identified in the yeast two-hybrid screen; *AtsPLA*₂- α ²¹⁻¹⁴⁸: *AtsPLA*₂- α after cleavage of its signal peptide; *AtsPLA*₂- α ¹⁻¹⁴⁸: non-cleaved *AtsPLA*₂- α ; *AtsPLA*₂- α -H62Q: inactive catalytic mutant version of *AtsPLA*₂- α (Mansfeld et al., 2006); *AtsPLA*₂- β ²⁹⁻¹⁴⁷: *AtsPLA*₂- β after cleavage of its signal peptide; *AtsPLA*₂- β ¹⁻¹⁴⁷: non-cleaved *AtsPLA*₂- β . BD-p53, BD-laminC and AD-T-antigen are controls provided by Clontech. BD: GAL4 DNA-binding domain; AD: GAL4 activation domain.

Coexpression of full length *AtsPLA*₂- α (*AtsPLA*₂- α ¹⁻¹⁴⁸) and AtMYB30 Δ AD did not result in yeast growth on selective medium. The lack of interaction between the two proteins in yeast is probably due to the presence of an HA tag at the N-terminus of *AtsPLA*₂- α , which blocks cleavage of its signal peptide. Indeed, *AtsPLA*₂- α deleted from its signal peptide (*AtsPLA*₂- α ²¹⁻¹⁴⁸) was able to interact with AtMYB30 Δ AD in yeast. In a control experiment, yeast cells expressing both *AtsPLA*₂- α and the non-related MYB transcription factor AtMYB123 Δ AD (Nesi et al., 2001) were not able to grow on selective medium. Furthermore, no protein interaction could be detected when yeasts were cotransformed with AtMYB30 Δ AD and the closest *AtsPLA*₂- α ortholog, *AtsPLA*₂- β , containing or not its signal peptide. Taken together, these data demonstrate the specificity of the interaction between *AtsPLA*₂- α and AtMYB30 in yeast.

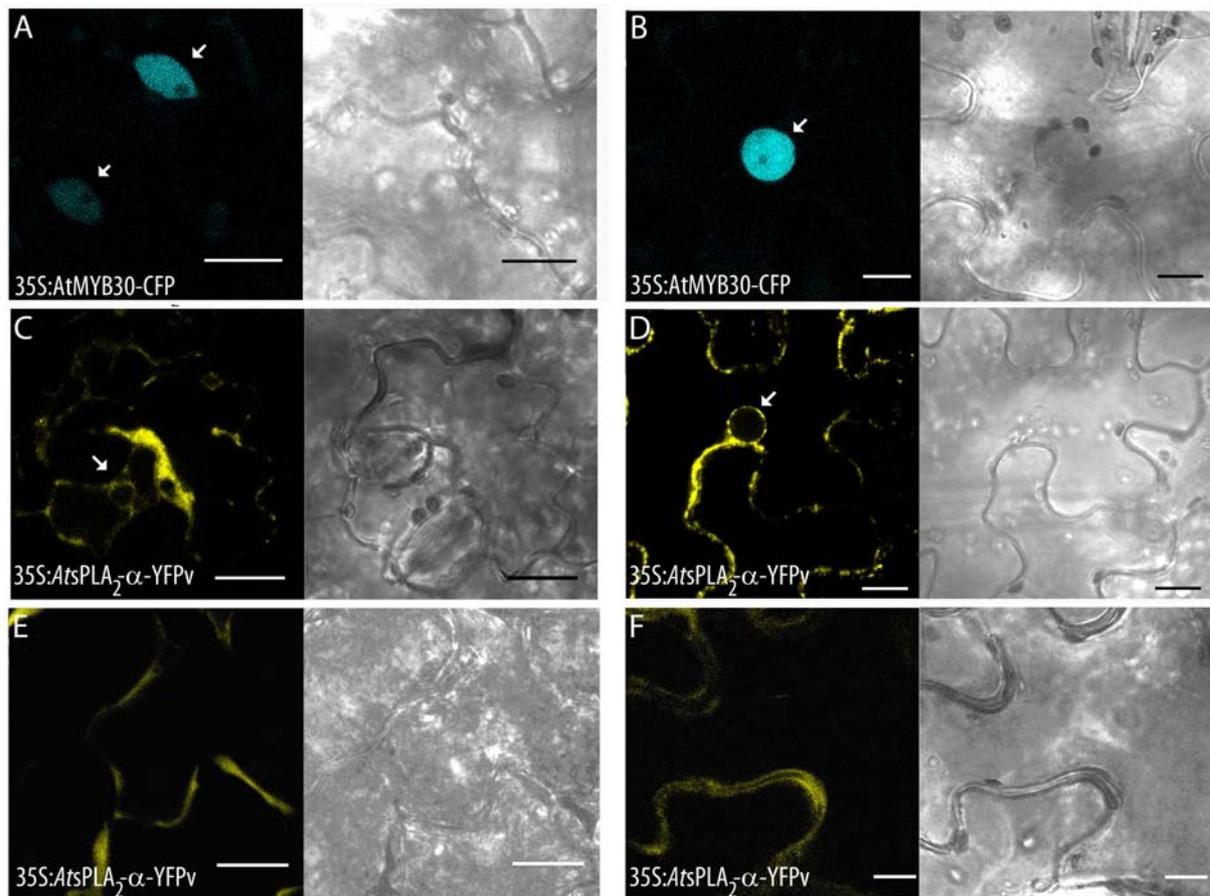


Fig. S2. Subcellular localization of AtMYB30-CFP and AtsPLA₂-α-YFPv. Confocal images of epidermal cells of *Arabidopsis* seedlings (A,C,E) and *N. benthamiana* leaves (B,D,F). Pictures were taken 36 (A,B,C,D) or 48 (E,F) hours after *Agrobacterium*-mediated transient expression of the indicated constructs. White arrows indicate cell nuclei. Bright field images are shown on the right. Bars = 15 μm.

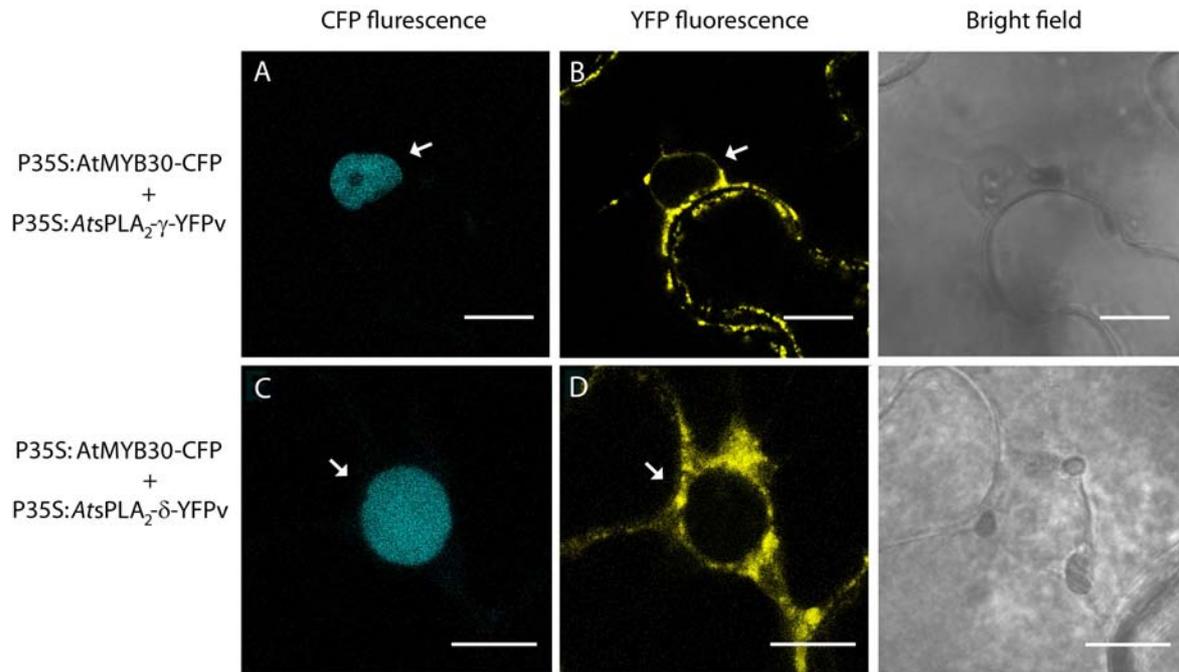


Fig. S3. *AtsPLA₂-γ* and *AtsPLA₂-δ* do not relocate to the nucleus in the presence of **AtMYB30**. Confocal images of epidermal cells 36 hours after *Agrobacterium*-mediated transient coexpression of 35S:AtMYB30-CFP with 35S:*AtsPLA₂-γ*-YFPv [(**A**) and (**B**)] or 35S:*AtsPLA₂-δ*-YFPv [(**C**) and (**D**)]. Arrows indicate cell nuclei. Bright field images are shown on the right. Bars = 15 μm.

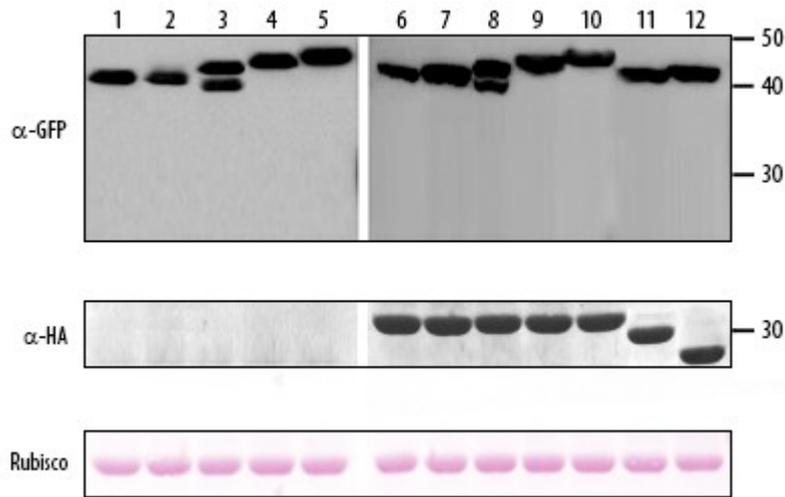


Fig. S4. Detection of full length YFPv-tagged *AtsPLA*₂ proteins. The following constructs were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves: 35S:*AtsPLA*₂-α-YFPv (1), 35S:*AtsPLA*₂-α-H62Q-YFPv (2), 35S:*AtsPLA*₂-β-YFPv (3), 35S:*AtsPLA*₂-γ-YFPv (4), 35S:*AtsPLA*₂-δ-YFPv (5), 35S:*AtsPLA*₂-α-YFPv and 35S:AtMYB30-HA (6), 35S:*AtsPLA*₂-α-H62Q-YFPv and 35S:AtMYB30-HA (7), 35S:*AtsPLA*₂-β-YFPv and 35S:AtMYB30-HA (8), 35S:*AtsPLA*₂-γ-YFPv and 35S:AtMYB30-HA (9), 35S:*AtsPLA*₂-δ-YFPv and 35S:AtMYB30-HA (10), 35S:*AtsPLA*₂-α-YFPv and AtMYB123-HA (11), 35S:*AtsPLA*₂-α-YFPv and AtMYB30ΔMYB-HA (12). Western blot analysis shows expression of YFPv-tagged *AtsPLA*₂s (top) and HA-tagged AtMYB30 proteins constructs (middle). Two bands were detected in lanes 3 and 8, which correspond respectively to the expected size of the uncleaved and cleaved version of *AtsPLA*₂-β (before and after cleavage of the signal peptide), whereas for the other *AtsPLA*₂ isoforms, the size of the detected band corresponds to the cleaved version. Ponceau S staining of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) for confirmation of equal loading in each lane is also shown (bottom). Molecular weight markers in kilodaltons are indicated on the right.

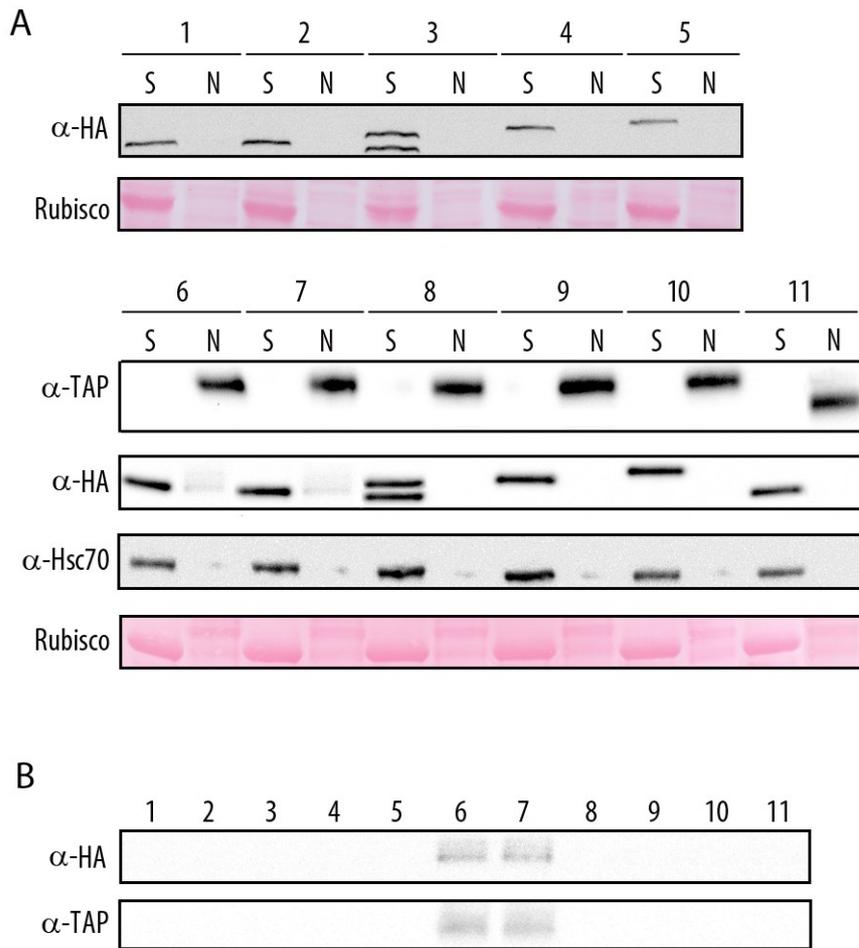


Fig. S5. *AtsPLA₂-α* is specifically targeted to the nucleus by AtMYB30. The following construct combinations were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves: 35S:*AtsPLA₂-α*-HA (1), 35S:*AtsPLA₂-α*-H62Q-HA (2), 35S:*AtsPLA₂-β*-HA (3), 35S:*AtsPLA₂-γ*-HA (4), and 35S:*AtsPLA₂-δ*-HA (5), 35S:AtMYB30-TAP and 35S:*AtsPLA₂-α*-HA (6), 35S:AtMYB30-TAP and 35S:*AtsPLA₂-α*-H62Q-HA (7), 35S:AtMYB30-TAP and 35S:*AtsPLA₂-β*-HA (8), 35S:AtMYB30-TAP and 35S:*AtsPLA₂-γ*-HA (9), 35S:AtMYB30-TAP and 35S:*AtsPLA₂-δ*-HA (10), 35S:AtMYB123-TAP and 35S:*AtsPLA₂-α*-HA (11). **(A)** Western blot analysis shows expression of HA-tagged *AtsPLA₂* constructs and TAP-tagged AtMYB30 or AtMYB123 proteins, after nuclei purification. An anti-Hsc70 (BIP) antibody was used as an ER marker to test the purity of isolated nuclei. Ponceau S staining of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) for confirmation of equal loading in each lane is also shown (bottom). N, nuclear protein extracts; S, total protein extracts depleted from nuclei. **(B)** Nuclear proteins were subjected to immunoprecipitation with an anti-HA antibody and the presence of the different HA-tagged *AtsPLA₂* proteins (top) and TAP-tagged AtMYB proteins (bottom) tested by Western blot.

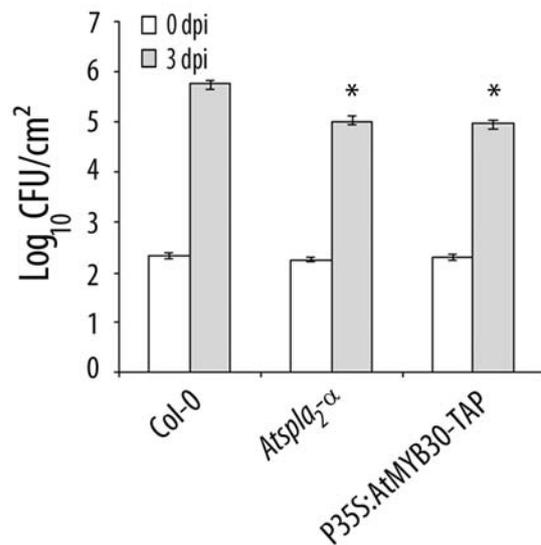


Fig. S6. *Atspla2-α* mutant Arabidopsis plants show increased resistance in response to inoculation with *Pst* DC3000 (*AvrRps4*). Growth of *Pst* DC3000 (*AvrRps4*) in wild-type Col-0, *Atspla2-α* mutant and 35S:AtMYB30-TAP Arabidopsis plants. Inoculation was performed with a bacterial suspension of 2×10^5 cfu/ml, and bacterial growth was measured 0 (white bars) and 3 days (grey bars) after inoculation. Mean bacterial densities were calculated from 2 independent experiments with 6 individual plants in each experiment. Stars represent statistical significant difference using Multiple Factor ANOVA (p-value < 0.05).

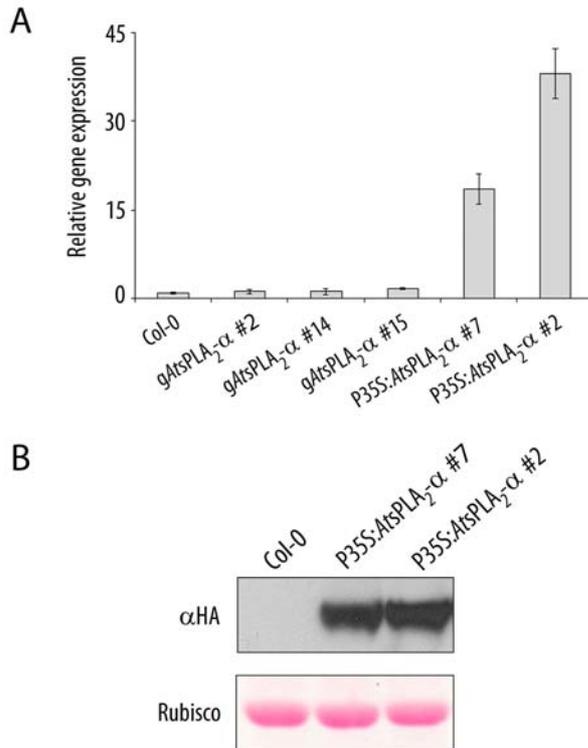


Fig. S7. *AtsPLA₂-α* expression in various Arabidopsis lines. (A) Relative expression of *AtsPLA₂-α* in leaves of wild type Col-0, complemented g*AtsPLA₂-α* and 35S:*AtsPLA₂-α* Arabidopsis lines was determined by Q-RT-PCR. The expression values were normalized using *SAND* family and *β -tubulin 4* genes as internal standards, and related to the value of Col-0, which is set at 1. Mean and SEM values were calculated from 3 individual plants per line. (B) Western blot analysis showing expression of *AtsPLA₂-α*-HA in Arabidopsis transgenic and Col-0 wild type plants. Ponceau S staining of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) for confirmation of equal loading in each lane is shown at the bottom.

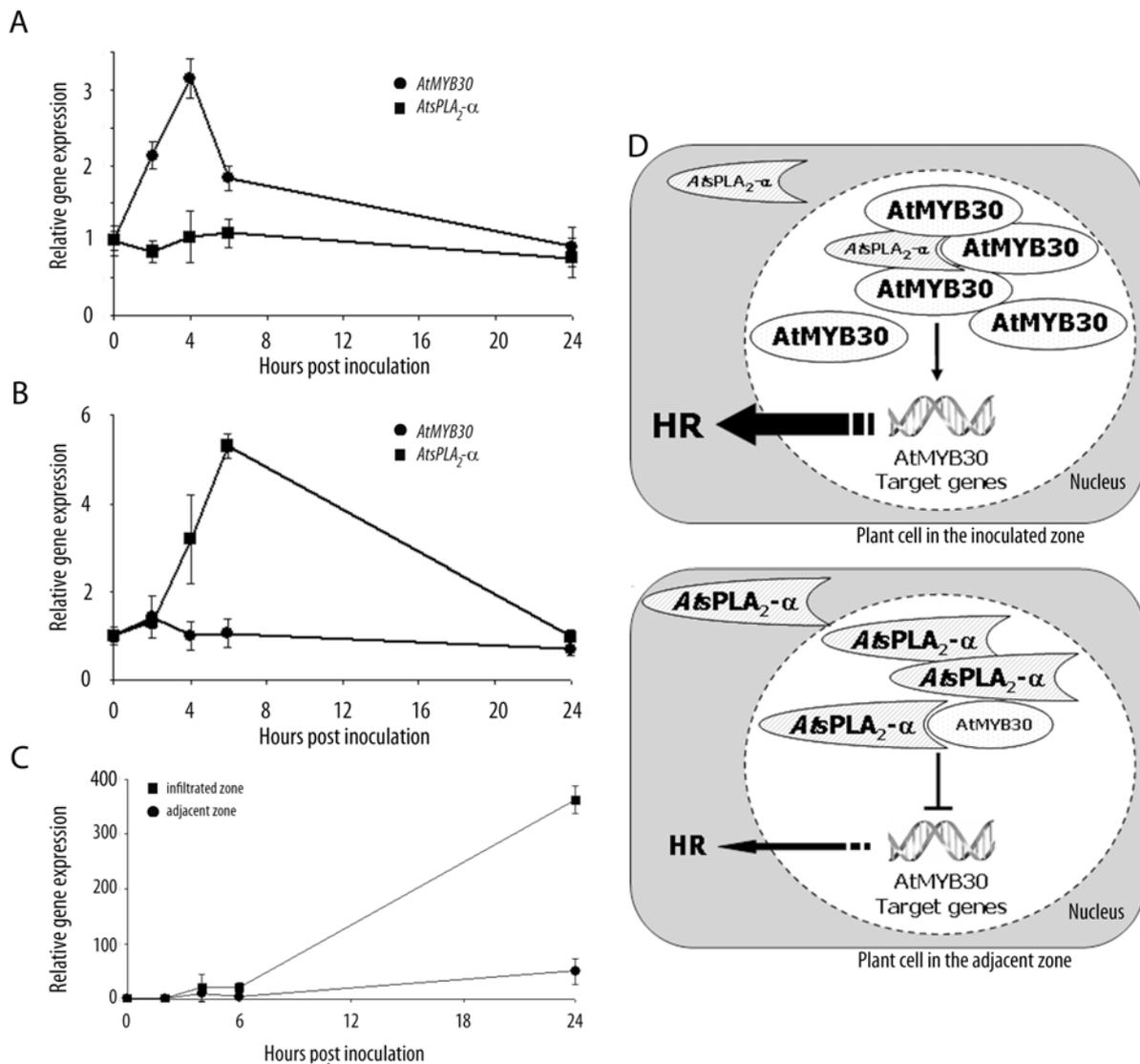


Fig. S8. *AtMYB30* and *AtpsPLA₂-α* gene expression is spatially and temporally regulated. To gain further knowledge on the mode of action of *AtpsPLA₂-α* on the control of the *AtMYB30*-mediated cell death and defence responses, wild type Col-0 plants were inoculated with *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*) (5×10^7 cfu/ml) on a 0.4 cm^2 leaf area. Leaf samples were harvested from areas both inside and immediately neighbouring the infiltrated zone (1 mm around the inoculated zone) at the indicated time points. In the infiltrated zone, which, as expected for a 5×10^7 cfu/ml bacterial inoculum, shows clear HR symptoms 4 hpi, the expression of *AtMYB30* increased 2 hpi and peaked 4 hpi, whereas *AtpsPLA₂-α* expression was not significantly altered. Interestingly, in the area adjacent to the infiltrated zone, no significant induction of *AtMYB30* expression could be detected. In contrast, concomitantly with the increased *AtMYB30* expression in the infiltrated area, *AtpsPLA₂-α* expression in the

adjacent zone increased from 4 hpi, with the highest *AtsPLA₂-α* transcript level observed 6 hpi. As an internal control of the experiment, we monitored the expression level of the *PR1* gene which, as expected for a marker of the plant defence response, increased 24 hpi in the infiltrated area. Together, these data indicate that the complementary character of *AtsPLA₂-α* and *AtMYB30* expression, from both a spatial and a temporal perspective, together with the negative control exerted by *AtsPLA₂-α* on *AtMYB30* activity, provide an efficient molecular mechanism that contributes to the necessary attenuation of the plant defence response.

Relative expression of *AtMYB30* (●) and *AtsPLA₂-α* (■) in the inoculated (A) or in the adjacent (B) zone was determined by Q-RT-PCR. Relative *PR1* gene expression (C) in the infiltrated zone (■) and in the adjacent zone (●) was also determined. The expression values were normalized using *SAND* family and *β-tubulin 4* genes as internal standards, and related to the value of each gene at time 0, which is set at 1. Mean and SEM values were calculated from 3 replicates of one representative experiment out of three. (D) Model for *AtMYB30*-mediated HR development *via* its interaction with *AtsPLA₂-α*. In the cells of the inoculated zone (upper panel), *AtMYB30* expression is rapidly induced after pathogen inoculation. *AtsPLA₂-α* is expressed at basal levels and partially relocalized to the nucleus. However, *AtsPLA₂-α* expression level is not high enough to fully counteract *AtMYB30* activity, which activates its target genes, leading to HR development and pathogen confinement in the inoculated area. In the cells of the adjacent zone (lower panel), *AtsPLA₂-α* expression is induced 6 hpi and the protein is partially relocalized to the cell nucleus, where it interacts with *AtMYB30*, which is expressed at low level. This leads to efficient “sequestration” of *AtMYB30* by *AtsPLA₂-α*, independently of its enzymatic activity. As a result, *AtMYB30* transcriptional activity is down-regulated and the progression of HR in the adjacent zone is blocked. Therefore, the physical interaction between *AtsPLA₂-α* and *AtMYB30* provides an efficient molecular mechanism to restrict the HR development to the inoculated zone.

Table S1. Oligonucleotide Primers Used in This Study

Name	Sequence	Polarity	Comments
MYB30-EcoRI-S	5' gccgaattcatggtgaggcctcc	(+)	Cloning in pGBKT7
MYB30-XhoI-AS	5' gccctcagtcagaagaattagt	(-)	Cloning in pGBKT7
MYB30ΔAD-XhoI-AS	5' gccctcagtcatttgagcttcggcg	(-)	Cloning in pGBKT7
MYB30AD-EcoRI-S	5' gccgaattcatgagactcaaaactccggg	(+)	Cloning in pGBKT7
MYB30AD-XhoI-AS	5' gcc ctcgag tca atgatcaggtgaacaccgcc	(-)	Cloning in pGBKT7
MYB123-EcoRI-S	5' gccgaattcatggaaagagcaactactagtgtg	(+)	Cloning in pGBKT7
MYB123ΔAD-XhoI-AS	5' gccctcagtcacaagaagtgaagtctcggagccaat	(-)	Cloning in pGBKT7
AttB1-MYB30	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatggtgaggcctccttgttg	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-MYB30	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtttaacagaagaattagtgtttcatcca	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-MYB30ΔMYB	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaggcgcgcctatgaacaaagcaatcaagattc	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-MYB30ΔMYB	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtttaacagaagaattagtgtttcatcca	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-MYB123-AscI	5' gccgcgcctatgggaaagagcaactactagtgtg	(+)	Cloning in pK207
AttB2-MYB123-PmeI	5' aaacaacaagtgaaagtctcggagccaatc	(-)	Cloning in pK207
AttB1-gPLA ₂ -α	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttgtgtctgttacaagaatctct	(+)	Cloning in pAM-PAT-GW
AttB2-gPLA ₂ -α	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctccacagttgatattggaa	(-)	Cloning in pAM-PAT-GW
AttB1-PLA ₂ -α	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatggcggctccgatcatac	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-PLA ₂ -α	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgggttcttgaggactttgc	(-)	Cloning in pDONR207
PLA ₂ -α-H62Q-S	5' tgcatgaacaagatgcttgtgtc	(+)	Cloning in pDONR207
PLA ₂ -α-H62Q-AS	5' gacacaagcatctgtttcatgca	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-PLA ₂ -β	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatgatgttgcacttcattga	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-PLA ₂ -β	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctagctctgtttcatatcattac	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-PLA ₂ -γ	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatgatcaccgggcttcttt	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-PLA ₂ -γ	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctataftaaagaagcagagacttt	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-PLA ₂ -δ	5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatgatcgcgggtggtcctt	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-PLA ₂ -δ	5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcagaaggagaagggtcatcg	(-)	Cloning in pDONR207
TDNA-LB	5' ccttttagggtccgattttagtct	(+)	PCR on gDNA
T-PLA ₂ -α-AS	5' acatagagttctaatttccc	(-)	PCR on gDNA
PLA ₂ α-S	5' atggcggctccgatcatac	(+)	PCR on cDNA
PLA ₂ α-AS	5' gggtttcttgaggactttg	(-)	PCR on cDNA
β-tubulin-S1	5' gtcagtgctgtgatattgcacc	(+)	PCR on cDNA
β-tubulin-AS1	5' gctcctcggattcgtaagc	(-)	PCR on cDNA
At2g38390-S	5' aactctatgcagcatttgatccact	(+)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
At2g38390-AS	5' tgattgcatactttatcgccatc	(-)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
β-tubulin4-S	5' ggagctacgcagaacaactaaga	(+)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
β-tubulin4-AS	5' cccacgaggatcatagttgcaactga	(-)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
MYB30-S	5' tcaagagtgatgatgggaaggagt	(+)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
MYB30-AS	5' gtccaccagaatcctcaaaaca	(-)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
AtsPLA ₂ -α-S	5' tgcttgtgtccaatccaaga	(+)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
AtsPLA ₂ -α-AS	5' cctttgaacgtcggttgc	(-)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
HSR203J-S	5' gccatgctgattggtcatgt	(+)	Q-RT-PCR (<i>N. bentli</i>)
HSR203J-AS	5' gagctgtctccgatgaggaat	(-)	Q-RT-PCR (<i>N. bentli</i>)
β-tubulin-Nb-S	5' ggagtttaccgaggctgaaag	(+)	Q-RT-PCR (<i>N. bentli</i>)
β-tubulin-Nb-AS	5' cctcctgagcttctcttcat	(-)	Q-RT-PCR (<i>N. bentli</i>)
PR1-S	5' ggagctacgcagaacaactaaga	(+)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)
PR1-AS	5' cccacgaggatcatagttgcaactga	(-)	Q-RT-PCR (Arabidopsis)

II. MIP1, une E3 ligase putative qui interagit avec AtMYB30 et régule négativement la défense

II.1 Introduction

Le crible double hybride précédemment décrit (voir Introduction IV.1.5), et ayant permis d'identifier *AtSPLA₂-α* comme partenaire d'AtMYB30 (voir Résultats I), a permis d'identifier un autre interacteur putatif d'AtMYB30 : MIP1 (*AtMYB30-Interacting Partner1*). MIP1 possède un domaine de type RING conservé, lui conférant une fonction d'E3 ubiquitine ligase putative. Les E3 ligases déterminent la spécificité de reconnaissance du substrat dans le processus d'ubiquitination.

Dans le but d'obtenir une meilleure compréhension du rôle des modifications post-traductionnelles dans la régulation du fonctionnement d'AtMYB30, il parut intéressant d'étudier les conséquences de cette interaction entre AtMYB30 et MIP1, après l'avoir validée *in planta*. Pour cela, l'effet de la surexpression de MIP1 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 a été étudié. De plus, afin de confirmer que MIP1 est impliqué dans la régulation des voies de résistance médiées par AtMYB30, le phénotype d'un mutant d'*Arabidopsis mip1* a été étudié au cours d'une interaction avec des agents pathogènes bactériens. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent que si AtMYB30 est ubiquitiné *in planta*, cette modification pourrait avoir un rôle de signal de dégradation par le protéasome.

II.2 Projet d'article

MIP1, une E3 ligase putative qui interagit avec AtMYB30 et régule négativement la défense.

Solène Froidure^a, Joanne Canonne^a, Alain Jauneau^b, Christian Brière^c, Xavier Daniel^{a,d}, Dominique Roby^a and Susana Rivas^a

^aLaboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France.

^bInstitut Fédératif de Recherche 40, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, F-31320 Castanet-Tolosan, France.

^cSurfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux, Université de Toulouse, UMR CNRS Université Paul Sabatier 5546, F31320 Castanet-Tolosan, France.

^dPresent adress : Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Institute of Botany, University of Neuchatel, Rue Emile-Argand 11, Case Postale 158, 2009 Neuchatel, Switzerland.

Résumé

AtMYB30, un facteur de transcription MYB-R2R3, a été précédemment identifié comme régulateur positif de la résistance associée à la mort cellulaire hypersensible, après inoculation d'Arabidopsis par des agents pathogènes bactériens. A l'aide d'un crible double hybride chez la Levure, nous avons identifié une putative E3 ubiquitine ligase d'Arabidopsis comme partenaire d'AtMYB30. Cette protéine, nommée MIP1 (AtMYB30-Interacting Protein1), contient un domaine RING, présent chez de nombreuses E3 ligases actives. Les E3 ligases déterminent la spécificité du substrat au cours du processus d'ubiquitination, une modification post-traductionnelle fréquemment associée avec la dégradation des protéines par le protéasome 26S. MIP1, fusionné à la YFP, est exprimé de façon diffuse dans toute la cellule. Nous avons démontré qu'AtMYB30 et MIP1 sont colocalisés et interagissent physiquement dans le noyau des cellules végétales. Cette interaction est accompagnée d'une diminution de l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30. De plus, un mutant d'Arabidopsis *mip1* est plus résistant face à une inoculation par différents agents pathogènes bactériens. Ces données montrent que MIP1 régule négativement les réponses de défense médiées par AtMYB30, et suggèrent que l'ubiquitination d'AtMYB30 pourrait être nécessaire à l'atténuation des réponses de défense.

MIP1, a putative E3 ligase that interacts with the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 and negatively regulates plant defence.

Solène Froidure^a, Joanne Canonne^a, Alain Jauneau^b, Christian Brière^c, Xavier Daniel^{a,d}, Dominique Roby^a and Susana Rivas^a

^a Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France.

^b Institut Fédératif de Recherche 40, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, F-31320 Castanet-Tolosan, France.

^c Surfaces cellulaires et signalisation chez les végétaux, Université de Toulouse, UMR CNRS Université Paul Sabatier 5546, F31320 Castanet-Tolosan, France.

^d Present adress : Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Institute of Botany, University of Neuchatel, Rue Emile-Argand 11, Case Postale 158, 2009 Neuchatel, Switzerland.

ABSTRACT

The R2R3-MYB transcription factor AtMYB30 is a positive regulator of resistance and associated hypersensitive cell death after inoculation of Arabidopsis plants with bacterial pathogens. Here, using a yeast two-hybrid screen, we identified an Arabidopsis putative E3 ubiquitin ligase as an AtMYB30-interacting partner. This protein, which we named MIP1 (AtMYB30-Interacting Protein1), contains a RING domain that is present in numerous plant active E3 ligases. E3 ubiquitin ligases determine the specificity of substrate during ubiquitination, a post-translational modification that is frequently associated to degradation of proteins by the 26S proteasome. MIP1, fused to YFP, is ubiquitously expressed in plant cells. We demonstrate that MIP1 and AtMYB30 co-localize and physically interact in the cell nucleus. This protein interaction is accompanied by downregulation of AtMYB30 transcriptional activity. Furthermore, an Arabidopsis *mip1* mutant is more resistant to inoculation with different bacterial strains. These data imply that MIP1 negatively regulates the plant defense reaction mediated by AtMYB30 and suggest that ubiquitination of AtMYB30 may be necessary to the attenuation of the defence response.

INTRODUCTION

Plants have developed a complex defence network to fight off invading pathogens. The first layer of plant defence involves recognition of PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), defined as invariant epitopes within molecules that are fundamental to pathogen fitness and widely distributed among different microbes. During evolution, some bacterial pathogens acquired effector proteins which disrupt plant defense and promote successful infection. In turn, plants have evolved to gain the ability to recognize directly or indirectly effectors through resistance proteins. This recognition leads to resistance of the plant, which is frequently associated with development of the Hypersensitive Response (HR). The HR is a form of programmed cell death localized at the infection site, which prevents the spread of the pathogen inside the plant (Mur et al., 2008). In most cases, the onset of the HR results in the activation of Systemic Acquired Resistance (SAR), which provides protection to the plant against a wide range of pathogens (Durrant and Dong, 2001).

The molecular mechanisms leading to HR are still largely unknown, but transcriptional regulation of plant genes plays a crucial role in this process. Several studies have shown that the HR is subject to genetic control and several factors necessary for its positive and negative regulation have been identified (Greenberg and Yao, 2004). In particular, members of various transcription factor (TF) families (namely, TGA, ERF, WRKY or MYB) have been reported to be involved in defense gene regulation in Arabidopsis. MYB TFs are found in all Eukaryotes, but this family is particularly well expanded in higher plants, which suggests that they are involved in plant specific processes (Stracke et al., 2001). The members of the MYB family contain a MYB domain, which is highly conserved and plays a role in DNA-binding, and a second domain involved in transcriptional transactivation. In animals, the MYB domain contains three imperfect tandem repeats (R1, R2 and R3), whereas most plant MYB proteins contain only two repeats (R2 and R3). Plant R2R3-MYB TFs play a role in several regulatory pathways, including cell morphology control (Ramsay et al., 2005), responses to phytohormones (Mandaokar and Browse, 2009), biosynthesis of secondary metabolites (Zhou et al., 2009), as well as responses to abiotic (Lippold et al., 2009), and biotic stresses (Martin and Paz-Ares, 1997b; Martin, 1997; Geri et al., 1999; Sugimoto et al., 2000; Lee et al., 2001; Mengiste, 2003).

The 76-amino acid protein ubiquitin (Ub) serves as a reusable tag which directs target proteins for selective turnover through the 26S proteasome. In addition, ubiquitination is also recognized as a signaling module for diverse cellular processes, including DNA repair (Huang

and D'Andrea, 2006), gene transcription (Muratani and Tansey, 2003), protein activation (Skaug et al., 2009), or receptor trafficking (Hicke and Dunn, 2003).

Although ubiquitination is best known for its role in protein degradation through the 26S proteasome, it has also been linked to non-proteasomal functions, such as signaling, endocytosis or histone modification (Schnell and Hicke, 2003). The fate of the modified substrate is determined by the nature of the Ub linkage (Weissman, 2001). Ubiquitination may result in the attachment of a single (monoubiquitination), a few or many ubiquitins (polyubiquitination). Monoubiquitination is required for receptor endocytosis, transcriptional regulation and intracellular sorting (Hicke, 2001; Schnell and Hicke, 2003). The choice of the lysine (K) residue used to form the ubiquitin chain also influences the fate of the ubiquitinated protein (Weissman, 2001). The archetypal polyubiquitin chains linked *via* ubiquitin lysine 48 (UbK48) mainly lead to degradation *via* the proteasome, whereas ubiquitin chains linked *via* UbK63 are involved in several processes including DNA repair, protein activation (Deng et al., 2000; Schnell and Hicke, 2003), endolysosomal degradation (Duncan et al., 2006), ribosomal regulation (Spence et al., 2000), but also proteasomal degradation (Saeki et al., 2009). Ub chain formation using UbK6, 11, 27, 29 and 33 has been shown *in vivo* but their biological significance is still unknown (Peng et al., 2003; Morris and Solomon, 2004; Nishikawa et al., 2004; Pickart and Fushman, 2004).

Ubiquitination requires three distinct enzymatic steps involving Ub-activating (E1), Ub-conjugating (E2) and Ub-ligase (E3) enzymes. In Arabidopsis, 1415 putative E3 Ub-ligases have been identified that, predictably, allow the interaction between E2 enzymes and the target protein by tethering them in close proximity (Mazzucotelli et al., 2006). Putative E3 Ub-ligases have been classified according to the presence of protein domains that determine the mechanism of Ub transfer from the E2 to the substrate (Smalle and Vierstra, 2004). E3 enzymes that contain the HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus) domain are unique because they form a thioester-linked ubiquitin E3 intermediate prior to transfer of Ub to the substrate (Downes et al., 2003). Proteins belonging to the other E3 ligase classes do not covalently link with ubiquitin, but rather non-covalently interact with an E2 protein carrying ubiquitin. Among them, the U-box domain- and RING (Really Interesting New Gene) domain-containing proteins are thought to be structurally and functionally related (Haglund and Dikic, 2005). The RING domain is a cross-braced scaffold that chelates two zinc ions using an octet of Cys and His residues. The U-box exploits electrostatic interactions instead of metal ion chelation to stabilize a RING finger-like structure. The RING/U-box domain forms a docking site for binding the Ub-E2 intermediate during Ub transfer (Barlow

et al., 1994; Borden et al., 1995; Zheng et al., 2000). E3 ligases containing a RING domain (499 representatives in Arabidopsis), can act independently or as part of a multisubunit complex such as SCF (Skp1, Cullin, E-box-type ligase; Craig et al., 2009). In this complex, substrate recognition is provided by the F-box protein (Mazzucotelli et al., 2006), whereas a RING protein binds to the E2 (Gagne et al., 2002). In contrast, some RING domain-containing E3 ligases act independently and are involved in both substrate and E2 binding (Zhang et al., 2005).

We previously identified AtMYB30, an Arabidopsis R2R3 TF, which is expressed early, transiently and specifically during the hypersensitive cell death. Moreover, the use of Arabidopsis mutants showed that *AtMYB30* expression is closely associated with the initiation of the HR rather than with its propagation (Daniel et al., 1999b). Overexpression of *AtMYB30* in both Arabidopsis and tobacco led to acceleration and intensification of HR and defense responses after inoculation with avirulent pathogens, whereas antisense *AtMYB30* Arabidopsis lines showed opposite phenotypes (Vaillau et al., 2002b). These data identify AtMYB30 as a positive regulator of defense and associated cell death responses. A transcriptome analysis, together with additional molecular, genetic and biochemical studies, showed that AtMYB30 putative target genes are involved in the lipid biosynthesis pathway that leads to the production of very long chain fatty acids (VLCFAs) (Raffaele et al., 2008b). Together, these data suggest that VLCFAs may play an important role in the control of the AtMYB30-mediated HR and plant defense reaction.

In order to further our understanding about the mode of action and regulation of AtMYB30, we previously performed a yeast two-hybrid screen to search for AtMYB30 partners and identified a secretory phospholipase A2 (*AtsPLA₂-α*), which is relocalized to the nucleus in the presence of AtMYB30 and exerts negative spatial and temporal control on AtMYB30 transcriptional activity (Froidure et al., 2010, submitted). In the present study, we describe the identification of an additional prey cDNA clone encoding a putative RING E3 ubiquitin ligase protein that we named MIP1 (AtMYB30-Interacting Protein1). We demonstrate that MIP1 physically interacts with AtMYB30 in the plant cell nucleus and is able to repress AtMYB30 transcriptional activity. Moreover, an Arabidopsis *mip1* mutant is more resistant to inoculation with different bacterial strains. These results identify MIP1 as a negative regulator of AtMYB30-mediated plant defense reaction and suggest that ubiquitination of AtMYB30 may be involved in the attenuation of the defense response.

RESULTS

Identification of MIP1

To identify AtMYB30 interacting proteins, an AtMYB30 version deleted from its C-terminal transcriptional activation domain (AtMYB30 Δ AD) was previously used as bait to screen a yeast two-hybrid (Y2H) Arabidopsis cDNA library generated from mRNAs isolated from leaf tissue inoculated with *Xanthomonas campestris* pv *campestris* 147 (Froidure et al., 2010, submitted). Here we describe the identification of a partial cDNA clone encoding amino acid residues 2-stop of the Zinc Finger C3H2C3-type RING finger protein (At5g18650). We named this protein MIP1 (AtMYB30-Interacting Protein 1). Co-expression of full-length MIP1 and AtMYB30 Δ AD resulted in yeast growth on selective medium, whereas yeast cells expressing both MIP1 and the non-related MYB TF AtMYB123 (Nesi et al., 2001b) did not grow (Figure 1). Furthermore, no protein interaction could be detected in yeast coexpressing AtMYB30 Δ AD and a control RING finger protein that we called RING-C (RING-Control) (Zinc Finger, RING/FYVE/PHD-type; At1g61620). Taken together, these data demonstrate the specificity of the interaction between MIP1 and AtMYB30.

RING domains are characterized by the presence of a cysteine-rich domain in which, similar to the zinc finger domain, Cys and/or His residues coordinate two zinc ions (Stone et al., 2005). RING proteins are classified based on the nature of the metal ligand residues present in the RING domain and/or the number of amino acids between them. According to this classification, MIP1 belongs to C3H2C3 canonical RING type, (also called RING-H2), which presents Cys residues at metal ligand positions 1, 2 and 3, His residues at positions 4 and 5, and again Cys residues at positions 6, 7 and 8 (Supplemental Figure 1).

AtMYB30 and MIP1 physically interact in the nucleus of *N. benthamiana* cells

AtMYB30 was previously shown to be localized in the nucleus, both in Arabidopsis and *N. benthamiana* leaves (Froidure et al., 2010, submitted). The subcellular localization of MIP1 in the plant cell was studied by *Agrobacterium*-mediated transient expression of a *P35S:MIP1-YFPv* fusion construct in *N. benthamiana* leaves. MIP1-YFPv shows a homogenous distribution in the cytoplasm and nucleus of the plant cell. Confocal microscopy analysis of *N. benthamiana* leaves transiently co-expressing AtMYB30-CFP and MIP1-YFPv shows that both proteins co-localize in the nucleus (Figure 2), consistent with a possible interaction between the two proteins.

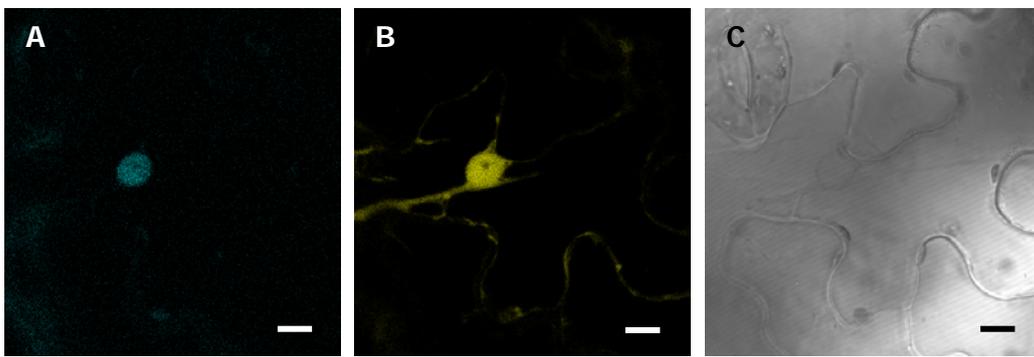


Figure 2. AtMYB30 and MIP1 are colocalized in the nucleus.

Confocal images of epidermal cells of *N. benthamiana* leaves 36 hours after *Agrobacterium*-mediated transient coexpression of AtMYB30-CFP **(A)** and MIP1-YFP **(B)**. The corresponding bright field image is shown on the right **(C)**. Bars = 15 μ m.

Table 1. FLIM measurements showing that AtMYB30 physically interacts with MIP1 in the nucleus of *N. benthamiana* cells.

Donor	Acceptor	Lifetime ^(a)	SD ^(b)	N ^(c)	E ^(d)	p-value ^(e)
AtMYB30-CFP	-	2,303	0,032	52	-	-
AtMYB30-CFP	MIP1-YFPv	1,945	0,023	64	15,5	6,8 x 10 ⁻¹⁵
AtMYB30-CFP	RING-C-YFPv	2,271	0,021	25	-	0,51
AtMYB123-CFP	-	2,227	0,027	30	-	-
AtMYB123-CFP	MIP1-YFPv	2,273	0,026	30	-	0,93

^a Mean lifetime in nanoseconds

^b Standard deviation

^c Total number of measured nuclei

^d FRET efficiency percentage ($E = 1 - t_{DA}/t_D$) was calculated by comparing the lifetime of the donor in the presence of the acceptor (t_{DA}) with its lifetime in the absence of the acceptor (t_D)

^e p-value of the difference between the donor lifetime in the presence and in the absence of the acceptor (t-test)

A

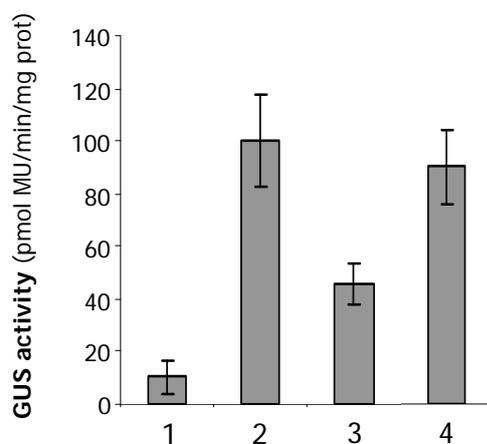
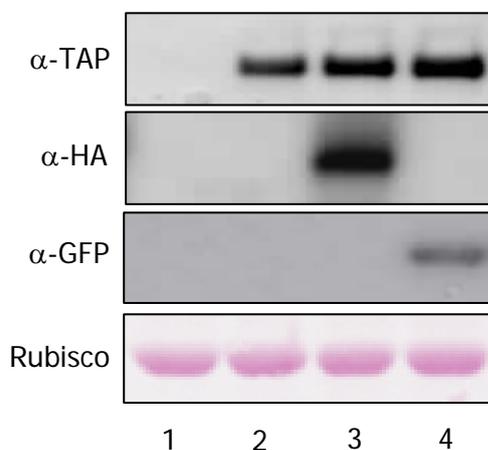


Figure 3. MIP1 represses AtMYB30 transcriptional activity.

Transactivation of the *KCS1* promoter by AtMYB30 in transient assays in *N. benthamiana* leaves. **(A)** Fluorimetric GUS assays in leaf discs 36 hours after agroinfiltration with the *KCS1p*:GUS-GFP reporter, alone (1) or with P35S:AtMYB30-TAP (2), P35S:AtMYB30-TAP and P35S:MIP1-HA (3), P35S:AtMYB30-TAP and P35S:GFP (4). Mean values and SEM values were calculated from the results of 5 independent experiments, with two to four replicates per experiment. MU, methylumbelliferone. **(B)** Western blot analysis showing expression of TAP-tagged AtMYB30, HA-tagged MIP1 and control GFP. Ponceau S staining of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) for confirmation of equal loading in each lane is shown.

B



The physical interaction between AtMYB30 and MIP1 *in planta* was tested by a quantitative non-invasive fluorescence lifetime imaging (FLIM) approach to monitor the Förster resonance energy transfer (FRET) between the CFP donor and YFPv acceptor molecules fused to AtMYB30 and MIP1, respectively. If the two proteins interact, the transfer of energy from the donor to the acceptor decreases the fluorescence lifetime (average time that a molecule remains in its excited state prior to returning to its basal state) of the donor fluorophore. The relative difference of lifetime is a measure of FRET efficiency. The average CFP lifetime in nuclei expressing AtMYB30-CFP was $2,303 \pm 0,032$ ns (mean \pm SD). A significant reduction of the average CFP lifetime to $1,945 \pm 0,023$ ns (p-value = $6,8 \times 10^{-15}$) was measured in nuclei coexpressing the AtMYB30-CFP and MIP1-YFPv fusion proteins (Table 1), showing that MIP1 is able to interact with AtMYB30 in the nucleus. To confirm that reduction of AtMYB30-CFP lifetime, in the presence of MIP1-YFPv, is not due to non-specific transfer of energy between the two fluorophores, AtMYB30-CFP and the RING-C protein fused to YFPv were co-expressed in a control experiment. As observed for MIP1-YFPv, RING-C-YFPv is ubiquitously localized in the cell. Despite the fact that AtMYB30-CFP and Ring-C-YFPv co-localize in the nucleus, no physical interaction could be detected between the two proteins, as indicated by an average CFP lifetime of $2,271$ ns \pm $0,021$ ns which is not different from AtMYB30-CFP alone (Table 1). Furthermore, no physical interaction could be detected between the nuclear localized TF AtMYB123-CFP (Nesi et al., 2001) and MIP1-YFPv, when co-expressed in *N. benthamiana* cells (Table 1). Taken together, these data demonstrate the specific physical interaction between AtMYB30 and MIP1 *in planta*.

MIP1 negatively regulates AtMYB30 transcriptional activity in *N. benthamiana*

Agrobacterium-mediated transient assays in *N. benthamiana* leaves were previously used to show that AtMYB30 is necessary for transcriptional activation of the promoter of several putative target genes involved in the biosynthesis of VLCFAs (Raffaele et al., 2008). In these assays, the promoter of several putative AtMYB30 target genes from the VLCFA pathway is fused to GUS and the quantification of GUS activity is performed after transient co-expression with TAP-tagged AtMYB30. These experiments have shown that the β -keto acyl-CoA synthase *KCSI* (Pruitt et al., 2000) is a putative target of AtMYB30.

To study the functional role of the interaction between AtMYB30 and MIP1, the effect of MIP1 on AtMYB30-mediated transcriptional activation of *KCSI**p* was tested. Consistent with previous results (Raffaele et al., 2008), overexpression of AtMYB30 (Figure 3A, lane 2)

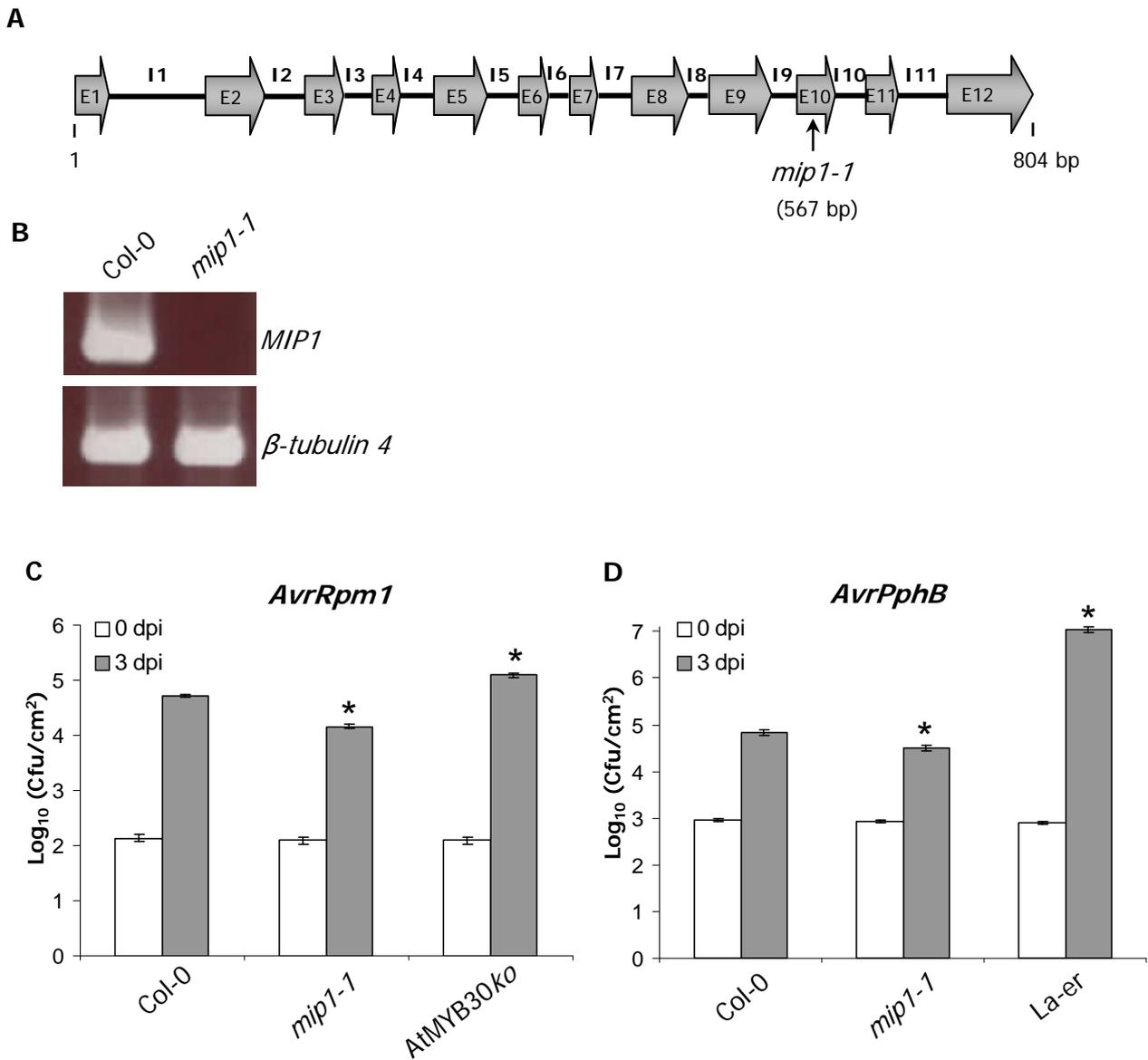


Figure 4. *mip1-1* mutant Arabidopsis plants show increased resistance in response to bacterial inoculation.

(A) Schematic representation of *MIP1* genomic organization. Exons (E1-E12) are represented with grey arrows and introns (I1-I11) are shown as black thick lines. The insertion site of the T-DNA in the *mip1* mutant is indicated with a black arrow at position 567 bp of the predicted ORF. **(B)** Reverse transcriptase mediated PCR analysis of *MIP1* transcript accumulation in wild type (Col-0) and *mip1-1* mutant Arabidopsis leaves. β -*tubulin 4* was used as an internal control for equal cDNA loading. **(C, D)** Growth of *Pst* DC3000 expressing *AvrRpm1* (C) or *AvrPphB* (D) in wild-type Col-0, *mip1* and *AtMYB30ko* or *La-er* ecotype. Inoculation was performed with a bacterial suspension of 5×10^5 cfu/ml, and bacterial growth was measured 0 (white bars) and 3 days (grey bars) after inoculation. Mean bacterial densities were calculated from 3 independent experiments with 4 individual plants in each experiment. Stars represent statistical significant difference using Multiple Factor ANOVA (p -value < 0.05).

induced *KCS1p* transcriptional activation. Interestingly, when co-expressed with MIP1, AtMYB30-TAP-mediated transcriptional activation of *KCS1p* was significantly reduced (Figure 3A, lane 3). In contrast, no effect on *KCS1p* activation was observed when a GFP control was co-expressed with AtMYB30 (Figure 3A, lane 4), indicating the specificity of the effect of MIP1 in the control of AtMYB30 transcriptional activity. Expression of all proteins was confirmed by Western blot analysis (Figure 3B).

A *mip1* Arabidopsis null mutant is more resistant to bacterial infection

To investigate the function of MIP1 in the establishment of the plant response to bacterial inoculation, we searched for an *Arabidopsis mip1* null mutant in the SALK collection (<http://signal.salk.edu/>). Genetic characterization of three candidate lines allowed us to identify one homozygous *mip1-1* knockout line (SALK_097638 line) containing a T-DNA insertion at position +567 of the predicted open reading frame (ORF) (Figure 4A). Absence of *MIP1* transcripts in homozygous *mip1-1* knockout plants was confirmed by RT-PCR using *MIP1* gene-specific primers (Figure 4B).

mip1-1 plants show increased resistance in response to inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst* DC3000) expressing the avirulence gene *AvrRpm1*, as compared to wild-type plants, with a difference in bacterial growth of $0,55 \pm 0,03 \log_{10}$ (Cfu/cm²) (Figure 4C). In this experiment, an AtMYB30*ko* mutant line (Raffaele et al., 2006) was used as an internal control and showed increased bacterial growth of *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*) as compared to wild type Col-0 plants. Identical results were obtained when *mip1-1* Arabidopsis mutant plants were inoculated with *Pst* DC3000 expressing the avirulence gene *AvrPphB*, with a difference in bacterial growth of $0,33 \pm 0,15 \log_{10}$ (Cfu/cm²) (Figure 4D), confirming the role of MIP1 as a negative regulator of plant defence.

To demonstrate that increased resistance observed in the *mip1-1* mutant was causally related to the loss of function of *MIP1*, genetic complementation of the mutant was performed using a 5977 bp genomic sequence from Col-0 containing the complete *mip1* open reading frame driven by 3362 bp of the native 5' regulatory sequence and 500 bp of the 3' terminator sequence (gMIP1). Three independent homozygous gMIP1 complemented T3 lines containing a single insertion of the wild-type *MIP1* gene were selected and inoculated with *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*). The *mip1-1* mutant plants containing the gMIP1 construct displayed *MIP1* gene expression and bacterial growth rates similar to those of wild type Col-0 plants (data not shown).

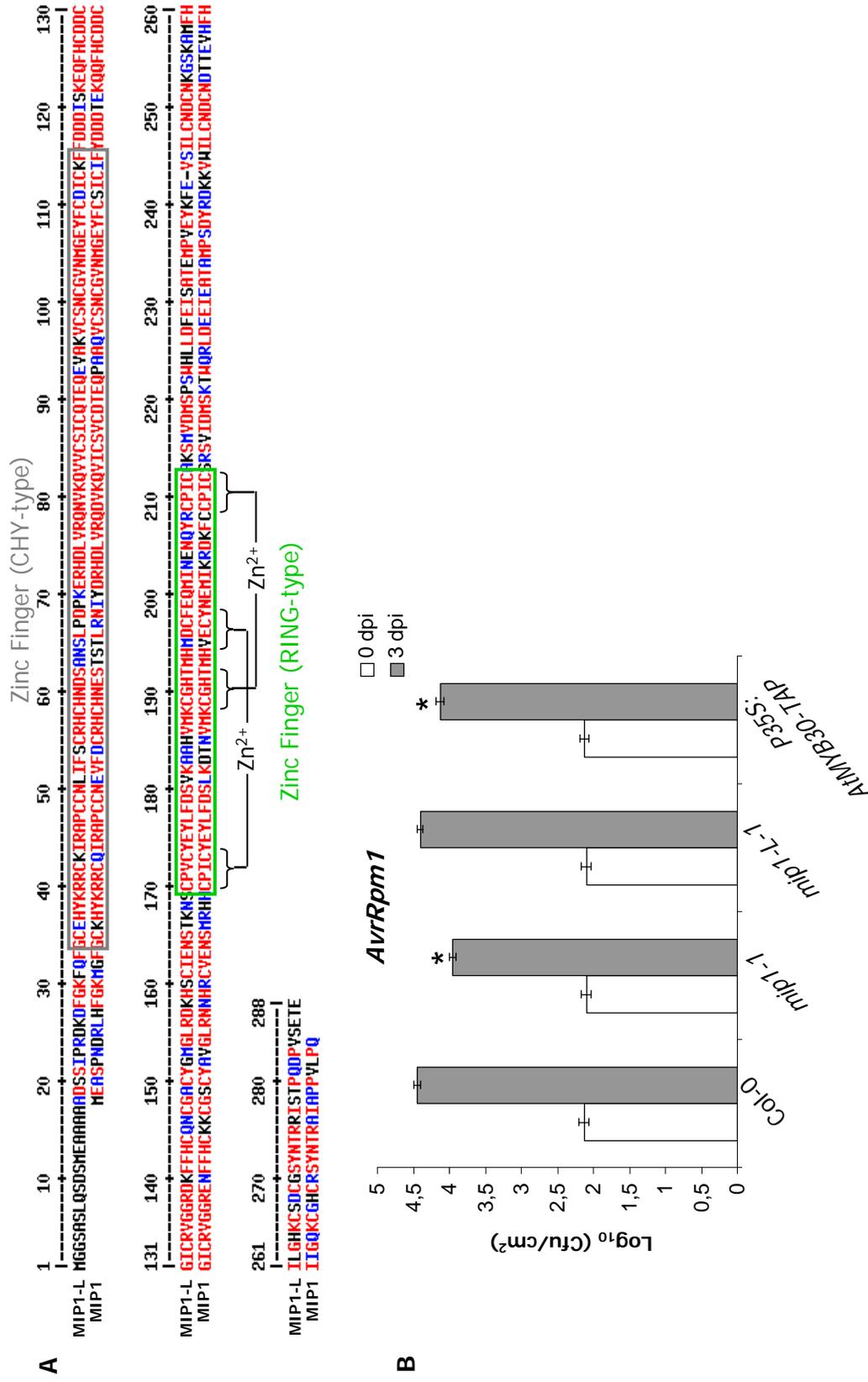


Figure 5. MIP1-L, the closest homolog of MIP1 in Arabidopsis, is not directly involved in the control of bacterial resistance.

(A) Amino acid alignment of the proteic sequence of *MIP1* and *MIP1-L*. The Zinc Finger CHY-type domain (similarity 80.7%, identity 72.3%) is indicated in grey and the Zinc Finger RING-type domain (similarity 76.2%, identity 62.8%) is indicated in green. (B) Growth of *Pst* DC3000 expressing *AvrRpm1* in wild-type Col-0, *mip1-1*, *mip1-1-7* and *P35S:AtMYB30-TAP*. Inoculation was performed with a bacterial suspension of 5 x 10⁵ cfu/ml, and bacterial growth was measured 0 (white bars) and 3 days (grey bars) after inoculation. Mean bacterial densities were calculated from 2 independent experiments with 4 individual plants in each experiment. Stars represent statistical significant difference using Multiple Factor ANOVA (p-value < 0.05).

E3 ubiquitin ligases have been previously shown to act redundantly in the control of a variety of plant processes (Liu et al., 2008; Qin et al., 2008). Since the enhanced resistance phenotype displayed by the *mip1-1* mutant is rather weak, it is then tempting to speculate that an additional E3 ligase may cooperate with MIP1 to regulate AtMYB30 function. Inspection of the Arabidopsis genome identified a second Zinc Finger gene (At3g62970; C3H2C3-type RING finger) closely related to *MIP1*. The predicted encoded protein, which we have called MIP1-L (MIP1- Like), is the closest MIP1 homolog in Arabidopsis, showing the zinc finger CHY type domain (similarity 80.7%, identity 72.3%) and the zinc finger RING type domain (similarity 76.2%, identity 62.8%) with all key amino acids in both domains well conserved (Figure 5A). To investigate whether MIP1-L may play a role in plant response to bacterial inoculation, we searched for an Arabidopsis *mip1-L* null mutant. Five candidate lines were genetically characterized and one homozygous *mip1-L-1* knockout line (SALK_027182 line) was identified. *mip1-L-1* plants contain a T-DNA insertion at position -2 of the predicted MIP1-L ORF, introducing a frame-shift that leads to production of an aberrant transcript. In contrast to *mip1-1* mutant plants, *mip1-L-1* showed no altered resistance in response to inoculation with *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*), as compared to wild-type Col-0 (Figure 5B).

Together, our results demonstrate that MIP1 acts as a negative regulator of Arabidopsis resistance, whereas MIP1-L, the closest Arabidopsis MIP1 homolog, is not directly involved in the regulation of plant defence to bacterial inoculation.

DISCUSSION

MIP1, a putative E3 ubiquitin ligase that interacts with the HR cell death regulator AtMYB30

Approximately 5% of the Arabidopsis proteome is predicted to be involved in the Ub/proteasome system (UPS). Consistent with this prediction, the UPS has been implicated in the regulation of almost all aspects of plant growth and development, from embryogenesis to floral organ production, and protection against biotic and abiotic stress (Smalle and Vierstra, 2004; Craig et al., 2009). E3 ubiquitin ligases are the most numerous and diverse factors of the ubiquitination cascade and are generally considered to provide substrate specificity (Stone et al., 2005). Among E3 ligases, RING/U-box E3s are a loosely defined collection of proteins bearing either a signature RING finger motif or a structurally related derivative called the U-box. Like RING/U-box E3 ligases, SCF E3s function as scaffolds that bring together the activated Ub-E2 complex and the target to promote conjugation without forming an E3-Ub intermediate.

Regulation of defense gene expression by the signaling hormones ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) has been previously linked to ubiquitination. For example, the stability of EIN3 (Ethylene Insensitive 3) TF, controlling the expression of defense-related genes, is regulated by SCF E3 ligase complexes (Gagne et al., 2004). Similarly, COI1, a SCF F-box subunit, is involved in JA-mediated signalling responses, including defence against herbivores and biotrophic pathogens (Yan et al., 2009).

The search for pathogen-responsive genes has revealed that the expression level of several E3 Ub-ligases is affected by a number of general elicitors and avirulence factors (Molnar et al., 2002; Ramonell et al., 2005; Zeng et al., 2006). Several Arabidopsis F-box proteins, as well as RING- and U-box-containing E3 ligases, are up-regulated after treatment with the general bacterial flagellin peptide elicitor flg22 (Navarro et al., 2004). In addition, genetic screens for mutants showing aberrant pathogenesis-related phenotypes have identified members of several E3 Ub ligase classes as positive and negative regulators of plant defense signaling (Dreher and Callis, 2007). RING-domain containing proteins have also surfaced in screens for transcriptional responses initiated in gene-for-gene resistance. For instance, the screen for *ACRE* (Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited) transcripts that uncovered the F-box protein ACRE189, also identified the RING E3 ligase ACRE132, and the U-box proteins ACRE276 and ACRE74 (Durrant et al., 2000). These proteins have been shown to regulate cell death and defence responses during pathogen recognition in tobacco and tomato (Gonzalez-

Lamothe et al., 2006; Yang et al., 2006; van den Burg et al., 2008). *ACRE132* is the proposed tobacco ortholog of the Arabidopsis *ATL2* gene (Salinas-Mondragon et al., 1999), which is transcriptionally induced by fungal chitin during basal resistance (Delauré et al., 2008), whereas *ACRE276* and *ACRE74* are the respective tobacco orthologs of Arabidopsis PUB17 (Plant U-Box 17) and *PUB20/21*, which are also upregulated after flg22 treatment (Navarro et al., 2004). In addition, the cumulative involvement of Arabidopsis U-box proteins PUB22, PUB23, and PUB24 in the negative regulation of basal resistance has been reported (Trujillo et al., 2008). Overall, these and other studies indicate that E3 ligases, and particularly U-box proteins, have a prominent role during the establishment of plant defence (Craig et al., 2009; Yee and Goring, 2009).

The Arabidopsis TF AtMYB30 was previously identified as a positive regulator of resistance and associated HR in response to pathogens. Here, we report on the identification of MIP1, an Arabidopsis RING domain-containing putative E3 Ub ligase that interacts with AtMYB30 in yeast. The physical interaction of MIP1 and AtMYB30 was confirmed by FLIM analysis in living plant cells. The specific character of this protein association was demonstrated by the absence of interaction between MIP1 and the MYB TF AtMYB123 or between AtMYB30 and the control RING protein RING-C.

MIP1-mediated ubiquitination of AtMYB30 may lead to attenuation of plant defence

A growing body of data indicates that E3 ligases respond to pathogen attack and contribute to plant defence. However, relatively few defence-associated ubiquitination plant targets have been identified to date (Dreher and Callis, 2007; Craig et al., 2009). One of the first clues that Ub-mediated proteolysis contributes to *R*-gene mediated defence was obtained in the case of the Arabidopsis resistance (*R*) protein Rpm1, which is degraded coincident with the onset of the HR elicited by *P. syringae* carrying the *AvrRpm1*, *AvrB*, *AvrRps4* or *AvrRpt2* avirulence genes (Boyes et al., 1998). Two RING-domain containing E3 ligases, RIN2 and RIN3, interact with RPM1, display E3 ligase activity *in vitro* and collectively contribute to pathogen-elicited RPM1-dependent ion leakage (Kawasaki et al., 2005). However, neither RIN2 nor RIN3 ubiquitinate RPM1 *in vitro*, and there is no difference in pathogen-induced RPM1 degradation in *rin2 rin3* plants as compared to wild type, suggesting that, although RIN2 and RIN3 are linked to defence signaling, they may not directly control RPM1 stability. Indeed, RIN2 and RIN3 may require additional proteins for *in vitro* activity and act redundantly *in vivo* with other uncharacterized E3(s) (Kawasaki et al., 2005).

Some bacterial pathogens have evolved to manipulate the host UPS for their own benefit. The plant pathogen *P. syringae* pv *tomato* DC3000 uses a type III secretion system to inject the AvrPtoB effector into plant cells, where it mediates suppression of the plant immune response by inhibiting basal resistance and associated cell death (Abramovitch and Martin, 2005; de Torres et al., 2006). AvrPtoB is an active U-box E3 ligase that ubiquitinates and targets the host R protein Fen for degradation. The plant kinase Pto, which is resistant to AvrPtoB-mediated ubiquitination, is thought to have evolved to bind AvrPtoB, thus restoring host immunity (Rosebrock et al., 2007). The evolving relationship between effectors and host R proteins illustrates how host ubiquitination can be exploited to benefit pathogen virulence.

The physical interaction between AtMYB30 and MIP1 leads to repression of AtMYB30 transcriptional activity. Furthermore, mutation of *mip1* in Arabidopsis plants confers enhanced resistance to inoculation with bacteria. These data identify MIP1 as a negative regulator of AtMYB30-mediated plant defence. Since (i) E3 Ub ligases have been previously shown to act redundantly in the control of a variety of plant processes (Liu et al., 2008; Qin et al., 2008) and (ii) the enhanced resistance phenotype displayed by the *mip1-1* mutant is rather weak, we sought out to investigate whether the closest MIP1 Arabidopsis homolog, MIP1-L, may be also involved in negative regulation of the plant defence response. Evidence of a physical interaction in plant cells between AtMYB30 and MIP1-L was recently obtained in FLIM experiments (S. Rivas, unpublished data) but *mip1-1* mutant plants showed no altered resistance to bacterial inoculation compared to wild type Col-0. Phenotypic characterization of the double mutant *mip1/mip1-l* is in progress and will help clarify the role of MIP1-L in the establishment of plant defence.

RING and U-Box E3s have been previously reported to act as negative regulators of plant responses to both abiotic and biotic environmental stresses through the ubiquitination and following degradation of target proteins, including TFs (Xie et al., 2002; Zeng et al., 2004; Zhang et al., 2005; Dong et al., 2006; Jang et al., 2007; Cho et al., 2008; Qin et al., 2008). Together, our data suggest that MIP1 may target AtMYB30 for ubiquitination, thereby leading to attenuation of the plant defence response. Future work will focus on the validation of this hypothesis. Preliminary experiments revealed that AtMYB30 stability is slightly increased in the presence of proteasome inhibitors (data not shown). However, as AtMYB30 stability is not altered when overexpressed together with MIP1 in *N. benthamiana* (Figure 3B, lane 3), we cannot exclude that AtMYB30 ubiquitination could also have a direct role on its transcriptional activity. Indeed, new roles are emerging for Ub in transcriptional regulation. Ubiquitination of the transactivation domain (TAD) of many TFs is required for their

transcriptional activation prior to degradation (Conaway et al., 2002). This close linkage between TAD activation and protein degradation may provide an efficient suicide mechanism for attenuation of transcription signals (Molinari et al., 1999; Salghetti et al., 2001). In contrast, ubiquitination of the yeast TF Met4, which has no effect on protein stability or affinity for the DNA, affects recruitment of its protein partners, leading to downregulation of its transcriptional activity (Kaiser et al., 2000). Surprisingly, this negative effect on Met4 transcriptional activity is mediated by a single ubiquitin chain attached to Met4 via UbK48, indicating that K48-linked Ub chains can have regulatory roles independent of proteolysis (Flick et al., 2004). Likewise, our results are consistent with the hypothesis that MIP1-mediated ubiquitination of AtMYB30 may lead to (i) proteasome-mediated degradation of AtMYB30 and/or (ii) direct repression of AtMYB30 transcriptional activity and attenuation of plant defence response *via* a proteolysis-independent mechanism.

Several post-translational modifications (PTMs), such as phosphorylation, acetylation, ubiquitination, and SUMOylation, play an important role in regulation of the stability and the transcriptional activity of c-Myb (Sramko et al., 2006). AtMYB30 is a SUMOylation and, possibly, a phosphorylation target (Okada et al., 2009); S. Rivas, unpublished data). Interestingly, SUMO conjugation has been reported to block other lysine-dependent modifications such as ubiquitination (Nasr et al., 2006), and phosphorylation has been proposed to be involved in either activation (Lin et al., 2002) or inhibition (Huang et al., 2009; Kaunisto et al., 2009) of ubiquitination. The presence of different combinations of PTMs on target proteins might act as a molecular barcode. The existence of such a PTM code has been proposed for TFs regulating multiple processes (Benayoun and Veitia, 2009). Beyond its role in the establishment of HR cell death, AtMYB30 has also been reported to be involved in the regulation of brassinosteroid-induced gene expression (Li et al., 2009). The existence of different post-translationally modified AtMYB30 isoforms may allow their interaction with distinct protein partners and/or differential DNA binding affinity and specificity, thereby providing dynamically regulated responses with highly specific cellular outputs.

Supplemental Table 1. Oligonucleotide primers used in this study.

Name	Sequence	Polarity	Comments
AttB1-MIP1	5'ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttaggcgcg ctatggaagcttcaccaatgatcgac	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-MIP1	5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtttaa cat tgaggaagaacaggaggcgcaatc	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-gMIP1	5'gggacaagttgtacaaaaaagcaggctcacagta actg ttttaagatttt	(+)	Cloning in pAM-PAT-GW
AttB2-gMIP1	5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggttagt atgaatt gtttttgtgcca	(-)	Cloning in pAM-PAT-GW
MIP1-S	5'atggaagcttcaccaatgatcgac	(+)	PCR on cDNA
MIP1-AS	5'tgaggaagaacaggaggcgcaatc	(-)	PCR on cDNA
T-MIP1-S	5'aggtgattgttctgtttc	(+)	PCR on gDNA
T-MIP1-L-S	5'ctttaaagtgagagatgattg	(+)	PCR on gDNA
T-DNA-LB	5'cccttagggttccgatttagtgct	(-)	PCR on gDNA
β -tubulin-S1	5'gtccagtgtctgtatattgcacc	(+)	PCR on cDNA
β -tubulin-AS1	5'gctccctcggattcgaagc	(-)	PCR on cDNA

MATERIALS AND METHODS

Constructs

Primers used in this study are shown in Supplemental Table 1. For the Y2H assays, GAL4-BD-AtMYB30 Δ AD, and GAL4-BD-AtMYB123 Δ AD fusions were previously described (Froidure et al., 2010, submitted).

AtMYB123 entry clone was obtained by ligation into pK207 (kind gift from L. Deslandes) as described (Froidure et al., 2010, submitted).

Other plasmids used in this study were constructed by Gateway technology (GW; Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. PCR products flanked by the attB sites were recombined into the pDONR 207 vector (Invitrogen) via a BP reaction to create the corresponding entry clones with attL sites. Inserts cloned into the entry clones (pENTR) were subsequently recombined into the destination vectors via an LR reaction to create the expression constructs.

The full-length MIP1 cDNA clone was amplified, using primers AttB1-MIP1 and AttB2-MIP1, from first-strand cDNAs synthesized from 1.5 mg of total RNA (Col-0; 1-weekold seedlings) using oligo(dT) primer and Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Meylan, France).

AtMYB30 was amplified by PCR as described (Froidure et al., 2010, submitted).

HA-, CFP- and YFPv-tagged proteins were generated from recombination of the corresponding pENTR constructs with the pBin19-P35S-GW-3HA, pBin19-P35S-GW-CFP and pBin19-P35S-GW-YFPv destination vectors, respectively (YFPv for YFP_{venus}, an enhanced form of the YFP; (Nagai et al., 2002b). AD-MIP1 for Y2H assays was generated from recombination of the corresponding pENTR constructs with the pGAD-AD-GTW vector, kindly provided by L. Deslandes.

The *KCS1p*:GUS and P35S:AtMYB30-TAP constructs were described previously (Raffaele et al., 2008b).

The P35S:RING-C-YFPv and AD-RING-C constructs were kindly provided by L. Deslandes. Col-0 genomic DNA was used as a template for the amplification of the *MIP1* gene (gMIP1, a 5977 bp fragment extending 3362 bp before the start codon and 500 bp after the stop codon), using primers AttB1-gMIP1 and AttB2-gMIP1. pENTR-gMIP1 was recombined with the pAM-PAT-GW destination vector (Bernoux et al., 2008) to generate the pAM-PAT-MIP1 binary plasmid.

Fluorescence Microscopy

The CFP and YFPv fluorescence in *N. benthamiana* leaves was analyzed with a confocal laser scanning microscope (TCS SP2-SE; Leica) using a x63 water immersion objective lens (numerical aperture 1.20; PL APO). CFP fluorescence was excited with the 458 nm ray line of the argon laser and recorded in one of the confocal channels in the 465 to 520 nm emission range. YFP fluorescence was excited with the 514 nm line ray of the argon laser and detected in the range between 520 and 575 nm. Images were acquired in the sequential mode using Leica LCS software (version 2.61).

FLIM and Data Analysis

Fluorescence lifetime of the donor was experimentally measured in the presence and absence of the acceptor. FRET efficiency (E) was calculated by comparing the lifetime of the donor in the presence (t_{DA}) or absence (t_D) of the acceptor: $E = 1 - (t_{DA}/t_D)$. Fluorescence decay measurements were performed using a multiphoton FLIM system coupled to a streak camera (Hamamatsu Photonics, Japan). The FLIM unit was composed of a streak camera (Streakscope C4334; Hamamatsu Photonics) coupled to a fast and high-sensitivity CCD camera (model C8800-53C; Hamamatsu) (Krishnan et al., 2003b; Biener et al., 2005b). The light source was a mode-locked Ti: sapphire laser (Tsunami, model 3941; Spectra-Physics), pumped by a 10-W diode laser (Millennia Pro; Spectra-Physics), delivering ultrafast femtosecond pulses with a fundamental frequency of 80 MHz. A pulsepicker (model 3980; Spectra-Physics) was used to reduce the repetition rate to 2 MHz. All the experiments reported in this work were performed at $\lambda = 800$ nm, the optimal wavelength to excite CFP in multiphoton mode while minimizing the excitation of YFP (Chen and Periasamy, 2004b). The power delivered at the entrance of the FLIM optics was 14 mW. All images were acquired with a 63x oil immersion lens (Plan Apo 1.4 numerical aperture, IR) mounted on an inverted microscope (Eclipse TE2000E; Nikon) coupled to the FLIM system. The fluorescence emission was directed back out into the detection unit through a short-pass filter ($\lambda < 750$ nm). For each nucleus, average fluorescence decay profile was calculated and lifetime was estimated by fitting data with a biexponential function using a nonlinear least squares estimation procedure with Origin 7.5 software (OriginLab, USA). Statistical comparisons between control (donor alone) and assay (donor + acceptor) lifetime values were performed using Student t-test.

Fluorimetric GUS Assays

Leaf discs were collected 36 h after agroinoculation and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. GUS activity was measured using the substrate 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide as described previously (Andriankaja et al., 2007). After protein extraction, 1 mg of total protein was used in replicates to measure enzymatic activities of individual samples.

RNA Extraction and RT-PCR Analysis

Material for RNA analysis was ground in liquid nitrogen and total RNA was isolated using the Nucleospin RNA plant kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using 1.5 µg of total RNA. cDNA synthesized from total RNA from *mip1-1* mutant and Col-0 wild type plants were tested for *MIP1* expression by PCR using primers MIP1-S and MIP1-AS. Expression of *β-tubulin 4* was used as an internal control for equal cDNA amounts using primers *β-tubulin-S1* and *β-tubulin-AS1*.

Plant and Bacterial Materials

All Arabidopsis lines used in this study were in the Columbia background. As a wild-type control, we used Col-0 (Nottingham Arabidopsis Stock Centre [NASC] accession number N1093). Plants were grown in Jiffy pots under controlled conditions, as previously described (Journot-Catalino et al., 2006b). The *mip1-1* T-DNA insertion line was derived from the SALK collection (SALK_097638 line; <http://signal.salk.edu/>). The position of the T-DNA insertion was confirmed by PCR using T-DNA-LB and T-MIP1-S primers and sequencing. The *mip1-L-1* T-DNA insertion line was derived from the SALK collection (SALK_027182 line; <http://signal.salk.edu/>). The position of the T-DNA insertion was confirmed by PCR using T-DNA-LB and T-MIP1-L-S primers and sequencing. The *AtMYB30ko* line, described before (Raffaele et al., 2006), and La-er ecotype were used as internal controls.

Agrobacterium-mediated transient expression in *N. benthamiana* leaves was performed as described (Rivas et al., 2004b). For FLIM experiments, leaf discs were harvested 36 hpi and fixed in a solution For plant inoculations, leaves of 4-week-old plants were syringe-infiltrated using the *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 (*AvrRpm1*) and *Pst* DC3000 (*AvrPphB*) strains at the indicated bacterial densities. *In planta* bacterial growth analysis was performed as described previously (Lorrain et al., 2004b). Data were collected for 4 plants from 3 independent experiments and subsequently submitted to a statistical analysis using

Statgraphics Centurion XV.II Professional Software (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Normality of residues was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. The effect of the genotype was tested by Multiple Factor ANOVA ($p < 0.05$).

Protein Gel Blot Analysis

Protein extracts were prepared as previously described (Combier et al., 2008).

For detection of TAP-, GFP-, and HA-tagged proteins, blots were respectively incubated with rabbit PAP soluble complex (SIGMA), anti-GFP mouse IgG1 K monoclonal antibody (clones 7.1 and 13.1; Roche) and anti-HA rat monoclonal (clone EF10; Roche) antibodies, linked to horseradish peroxidase, at a final dilution of 1:5,000. Proteins were visualized using the Immobilon kit (Millipore) under standard conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (Bourse Docteur-Ingénieur) to S.F. and a grant from the French Ministry of National Education and Research to J.C. X.D. was funded by VILMORIN & Cie and Biogemma.

REFERENCES

- Abramovitch, R.B., and Martin, G.B.** (2005). AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiol Lett* **245**, 1-8.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F.** (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866-2885.
- Barlow, P.N., Luisi, B., Milner, A., Elliott, M., and Everett, R.** (1994). Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol* **237**, 201-211.
- Benayoun, B.A., and Veitia, R.A.** (2009). A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* **19**, 189-197.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Biener, E., Charlier, M., Ramanujan, V.K., Daniel, N., Eisenberg, A., Bjorbaek, C., Herman, B., Gertler, A., and Djiane, J.** (2005). Quantitative FRET imaging of leptin receptor oligomerization kinetics in single cells. *Biol Cell* **97**, 905-919.
- Borden, K.L., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P.S.** (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J* **14**, 1532-1541.
- Boyes, D.C., Nam, J., and Dangl, J.L.** (1998). The Arabidopsis thaliana RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15849-15854.
- Chen, Y., and Periasamy, A.** (2004). Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc Res Tech* **63**, 72-80.
- Cho, S.K., Ryu, M.Y., Song, C., Kwak, J.M., and Kim, W.T.** (2008). Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatorial roles in response to drought stress. *Plant Cell* **20**, 1899-1914.
- Combiere, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A., and Rivas, S.** (2008). Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev* **22**, 1549-1559.
- Conaway, R.C., Brower, C.S., and Conaway, J.W.** (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-1258.
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A.** (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot* **60**, 1123-1132.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B., and Roby, D.** (1999). A novel *myb* oncogene homolog in *Arabidopsis thaliana* related to the hypersensitive cell death. *Plant J.* **20**, 57-66.
- de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammounh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M., and Boch, J.** (2006). Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *Plant J.* **47**, 368-382.
- Delauré, S.L., Van Hemelrijck, W., De Bolle, M.F.C., Cammue, B.P.A., and De Coninck, B.M.A.** (2008). Building up plant defenses by breaking down proteins. *Plant Science* **174**, 375-385.

- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L.Y., Braun, A., You, J.X., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J.** (2000). Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361.
- Dong, C.H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., and Zhu, J.K.** (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8281-8286.
- Downes, B.P., Stupar, R.M., Gingerich, D.J., and Vierstra, R.D.** (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J* **35**, 729-742.
- Dreher, K., and Callis, J.** (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* **99**, 787-822.
- Duncan, L.M., Piper, S., Dodd, R.B., Saville, M.K., Sanderson, C.M., Luzio, J.P., and Lehner, P.J.** (2006). Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *Embo J* **25**, 1635-1645.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2001). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209.
- 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**, 963-977.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J.A., Capati, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Kaiser, P.** (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**, 634-641.
- Froidure, S., Daniel, X., Canonne, J., Jauneau, A., Brière, C., Roby, D., and Rivas, S.** (2010, submitted). *AtsPLA₂-α* represses Arabidopsis hypersensitive cell death and defence *via* its interaction with the transcription factor AtMYB30.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.H., Durski, A.M., and Vierstra, R.D.** (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11519-11524.
- Gagne, J.M., Smalle, J., Gingerich, D.J., Walker, J.M., Yoo, S.D., Yanagisawa, S., and Vierstra, R.D.** (2004). Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6803-6808.
- Geri, C., Cecchini, E., Giannakou, M.E., Covey, S.N., and Milner, J.J.** (1999). Altered patterns of gene expression in Arabidopsis elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 377-384.
- Gonzalez-Lamothe, R., Tsitsigiannis, D.I., Ludwig, A.A., Panicot, M., Shirasu, K., and Jones, J.D.** (2006). The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell* **18**, 1067-1083.
- Greenberg, J.T., and Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**, 201-211.
- Haglund, K., and Dikic, I.** (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* **24**, 3353-3359.
- Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.
- Hicke, L., and Dunn, R.** (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172.
- Huang, C., Rajfur, Z., Yousefi, N., Chen, Z., Jacobson, K., and Ginsberg, M.H.** (2009). Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nat Cell Biol* **11**, 624-630.

- Huang, T.T., and D'Andrea, A.D.** (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 323-334.
- Jang, I.C., Yang, S.W., Yang, J.Y., and Chua, N.H.** (2007). Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes & Dev.* **21**, 2100-2111.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D., and Kroj, T.** (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**, 3289-3302.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S.I.** (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-314.
- Kaunisto, A., Kochin, V., Asaoka, T., Mikhailov, A., Poukkula, M., Meinander, A., and Eriksson, J.E.** (2009). PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. *Cell Death Differ* **16**, 1215-1226.
- Kawasaki, T., Nam, J., Boyes, D.C., Holt, B.F., 3rd, Hubert, D.A., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2005). A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response. *Plant J* **44**, 258-270.
- Krishnan, R.V., Masuda, A., Centonze, V.E., and Herman, B.** (2003). Quantitative imaging of protein-protein interactions by multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy using a streak camera. *J Biomed Opt* **8**, 362-367.
- Lee, M.W., Qi, M., and Yang, Y.** (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice *MYB* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 527-535.
- Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., and Yin, Y.** (2009). Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* **58**, 275-286.
- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwaijri, S., and Chang, C.S.** (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *Embo Journal* **21**, 4037-4048.
- Lippold, F., Sanchez, D.H., Musialak, M., Schlereth, A., Scheible, W.R., Hincha, D.K., and Udvardi, M.K.** (2009). AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**, 1761-1772.
- Liu, J.J., Zhang, Y.Y., Qin, G.J., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K.T., Shi, D.Q., Aki, S., Zheng, N.Y., Aoyama, T., Oka, A., Yang, W.C., Umeda, M., Xie, Q., Gu, H.Y., and Qu, L.J.** (2008). Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. *Plant Cell* **20**, 1538-1554.
- Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balagué, C., and Roby, D.** (2004). VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell* **16**, 2217-2232.
- Mandaokar, A., and Browse, J.** (2009). MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**, 851-862.
- Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). Myb transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**, 67-73.
- Martin, C.a.P.-A., J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**, 67-73.
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardi, A., Guerra, D., Di Fonzo, N., Cattivelli, L., and Mastrangelo, A.** (2006). The e3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr Genomics* **7**, 509-522.

- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., and Dietrich, R.** (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE 1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2551-2565.
- Molinari, E., Gilman, M., and Natesan, S.** (1999). Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *Embo J* **18**, 6439-6447.
- Molnar, G., Bancos, S., Nagy, F., and Szekeres, M.** (2002). Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from Arabidopsis thaliana. *Planta* **215**, 127-133.
- Morris, J.R., and Solomon, E.** (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**, 807-817.
- 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**, 501-520.
- Muratani, M., and Tansey, W.P.** (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A.** (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.
- Nasr, R., Chiari, E., El-Sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., de The, H., Pique, C., and Bazarbachi, A.** (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappa B activation. *Blood* **107**, 4021-4029.
- 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**, 1113-1128.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2001). The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3-MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.
- Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R.E., Fukuda, M., and Ohta, T.** (2004). Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**, 3916-3924.
- Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Tanaka, K.** (2009). Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO pathways in E. coli: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* **50**, 1049-1061.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926.
- Pickart, C.M., and Fushman, D.** (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616.
- Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., and Lolle, S.J.** (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1311-1316.
- Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.S., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K., and**

- Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2008). Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **20**, 1693-1707.
- Raffaele, S., Rivas, S., and Roby, D.** (2006). An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett* **580**, 3498-3504.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Léger, A., Joubès, J., Miersch, O., Huard, C., Blée, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D.** (2008a). A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 752-767.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D.** (2008b). A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 752-767.
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., and Somerville, S.** (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* **138**, 1027-1036.
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schausser, L., Yoshioka, H., and Jones, J.D.** (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *Embo J* **23**, 2156-2165.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B.** (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**, 370-374.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K.** (2009). Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *Embo J* **28**, 359-371.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P.** (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-1653.
- Salinas-Mondragon, R.E., Garciduenas-Pina, C., and Guzman, P.** (1999). Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **40**, 579-590.
- Schnell, J.D., and Hicke, L.** (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**, 35857-35860.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J.** (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**, 769-796.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 555-590.
- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D.** (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**, 67-76.
- Sramko, M., Markus, J., Kabat, J., Wolff, L., and Bies, J.** (2006). Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins. *J Biol Chem* **281**, 40065-40075.
- Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J.** (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**, 13-30.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-456.

- Sugimoto, K., Takeda, S., and Hirochika, H.** (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. *Plant Cell* **12**, 2511-2527.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., and Shirasu, K.** (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Curr Biol* **18**, 1396-1401.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.L., Triantaphylides, C., and Roby, D.** (2002). A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10179-10184.
- van den Burg, H.A., Tsitsigiannis, D.I., Rowland, O., Lo, J., Rallapalli, G., Maclean, D., Takken, F.L., and Jones, J.D.** (2008). The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell* **20**, 697-719.
- Weissman, A.M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-178.
- Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M., and Chua, N.H.** (2002). SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* **419**, 167-170.
- Yan, J.B., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z.Y., Zhang, W.G., Qi, T.C., Cheng, Z.W., Peng, W., Luo, H.B., Nan, F.J., Wang, Z., and Xie, D.X.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.
- Yang, C.W., Gonzalez-Lamothe, R., Ewan, R.A., Rowland, O., Yoshioka, H., Shenton, M., Ye, H., O'Donnell, E., Jones, J.D., and Sadanandom, A.** (2006). The E3 ubiquitin ligase activity of arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* **18**, 1084-1098.
- Yee, D., and Goring, D.R.** (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot* **60**, 1109-1121.
- Zeng, L.R., Vega-Sanchez, M.E., Zhu, T., and Wang, G.L.** (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res* **16**, 413-426.
- Zeng, L.R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B.H., Leung, H., and Wang, G.L.** (2004). Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* **16**, 2795-2808.
- Zhang, X., Garreton, V., and Chua, N.H.** (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* **19**, 1532-1543.
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P.** (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**, 533-539.
- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., and Ye, Z.H.** (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 248-266.



Figure 32. Essai de dégradation d'AtMYB30 par le proteasome 26S *in vitro*.

Détection d'AtMYB30-TAP par Western Blot dans un extrait protéique de la lignée transgénique d'Arabidopsis *35S:AtMYB30-TAP*. Cet extrait est incubé pendant 1, 2 ou 6 heures avec un tampon favorisant l'ubiquitination des protéines, en présence d'inhibiteurs du proteasome (MG132 et MG115) ou de DMSO (solvant utilisé pour préparer le MG132).

II.3 Données complémentaires

Des données complémentaires à celles présentées dans le projet d'article sont présentées ici en raison de leur caractère intéressant, mais préliminaire.

II.3.1 AtMYB30 serait dégradé par le protéasome 26S *in vitro*

Afin d'étudier si l'ubiquitination d'AtMYB30 pouvait conduire à sa dégradation par le protéasome, un test de dégradation *in vitro* a été effectué. Ce test consiste à recréer *in vitro* les conditions nécessaires à l'ubiquitination et à la dégradation d'AtMYB30, dans un extrait protéique végétal. Pour cela, les protéines totales de plantules d'Arabidopsis surexprimant AtMYB30 (*P35S:AtMYB30-TAP*) sont extraites et incubées avec un tampon contenant de l'ubiquitine et des enzymes permettant de régénérer l'ATP, en présence d'inhibiteurs du protéasome (MG132 et MG115) ou de leur solvant (DMSO). Si AtMYB30 est dégradée par le protéasome, on s'attend donc à observer une cinétique de dégradation de la protéine uniquement en l'absence de MG132 et MG115. Le Western Blot présenté dans la figure 32 montre qu'on observe une cinétique de dégradation d'AtMYB30 en présence ou en absence de MG132/MG115. Cependant, la quantité de protéine AtMYB30 est plus élevée en présence de MG132 et MG115. Ces résultats suggèrent qu'AtMYB30 est bien dégradée dans cette expérience, mais pas uniquement par le protéasome. En effet, on peut supposer que malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans le tampon d'extraction, certaines de ces enzymes soient encore actives et puissent dégrader AtMYB30.

Cette expérience suggère donc l'existence, *in vitro*, d'une dégradation d'AtMYB30 dépendante du protéasome.

II.3.2 AtMYB30 serait dégradé par le protéasome 26S *in vivo*

Le rôle de MIP1 dans l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 a été étudié *in planta*. Dans ces expériences, l'inhibiteur du protéasome MG132 a été utilisé pour bloquer une dégradation éventuelle d'AtMYB30 par le protéasome. Pour cela, l'expression transitoire d'AtMYB30-TAP seul, ou co-exprimé avec MIP1-HA, suivie d'une incubation avec du MG132 ou son solvant, le DMSO, ont été réalisées chez *N. benthamiana*. La Figure 33A montre qu'il existe une faible accumulation d'AtMYB30 après le traitement au MG132, suggérant une dégradation d'AtMYB30 par le protéasome. Par ailleurs, la co-expression d'AtMYB30 avec MIP1 ne semble pas affecter le niveau d'accumulation d'AtMYB30. Ceci suggère que la surexpression de MIP1 n'augmenterait pas le niveau d'ubiquitination d'AtMYB30 et/ou n'affecterait pas sa dégradation par le protéasome.

Le même type d'expérience a été mené avec différentes lignées d'Arabidopsis. Dans la lignée d'Arabidopsis sauvage Col-0, où l'expression *AtMYB30* est sous le contrôle de son propre promoteur, aucune détection de la protéine sauvage AtMYB30 n'est possible, à l'aide d'un anticorps anti-AtMYB30. Le même résultat est obtenu après traitement au MG132, suggérant que si le MG132 stabilise AtMYB30, cette stabilisation n'est pas suffisante pour être détectée dans ces conditions (Figure 33B). Dans la lignée mutante *mip1-1*, on peut s'attendre à une diminution de l'ubiquitination d'AtMYB30 qui pourrait conduire à une stabilisation de la protéine, en comparaison avec Col-0. Cependant, tout comme chez la

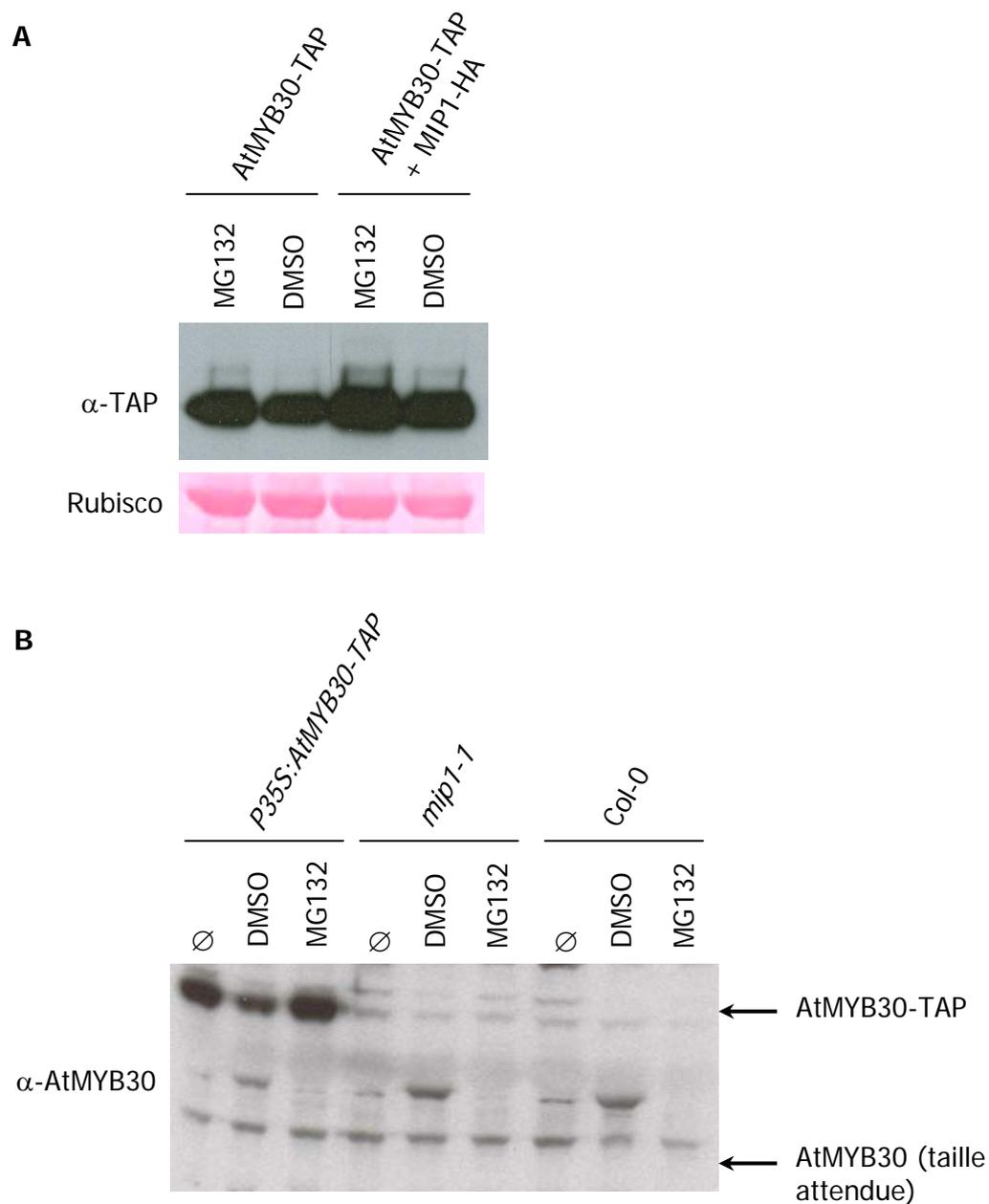


Figure 33. Essais de stabilisation d'AtMYB30 par inhibition du proteasome 26S *in vivo*.

(A) Expression transitoire d'AtMYB30-TAP seul ou co-exprimé avec MIP1-HA chez *N. benthamiana*.

(B) Expression d'AtMYB30 chez la lignée transgénique *35S::AtMYB30-TAP*, le mutant *mip1-1* et Col-0. Après incubation avec l'inhibiteur du protéasome MG132 ou le DMSO, un Western Blot contre le TAP tag (A) ou contre AtMYB30 (B) a été réalisé. La coloration de la Rubisco au Ponceau S permet de confirmer un chargement égal dans chaque puits (A).

lignée sauvage, la protéine sauvage AtMYB30 n'est pas détectable dans le mutant *mip1-1*, à l'aide d'un anticorps anti-AtMYB30, en présence ou en absence de MG132 (Figure 33B).

Etant donnée l'impossibilité de détecter AtMYB30 chez Col-0 ou le mutant *mip1-1*, nous avons utilisé une lignée dans laquelle on pouvait visualiser AtMYB30 et donc suivre l'effet d'un traitement au MG132. Cette lignée transgénique d'Arabidopsis exprimant AtMYB30-TAP (*P35S:AtMYB30-TAP*) montre alors une stabilisation de la protéine en présence de MG132, en comparaison avec un traitement au DMSO (Figure 33B).

Toutes ces données montrent que si AtMYB30 est dégradé *via* le protéasome chez la lignée sauvage Col-0 ou chez le mutant *mip1-1* d'Arabidopsis, cet effet n'est pas suffisant pour qu'AtMYB30 devienne détectable par Western Blot. Cependant, après expression d'AtMYB30-TAP de façon transitoire chez *N. benthamiana*, ou stable chez Arabidopsis, on détecte une accumulation de la protéine en présence de MG132. Ces résultats indiquent donc qu'AtMYB30 pourrait être dégradé par le protéasome *in vivo*. Cependant, le rôle de MIP1 dans ce processus est encore inconnu.

II.4 Conclusion, discussion et perspectives

Nous avons démontré qu'AtMYB30 et MIP1, une E3 ligase putative, sont colocalisés et qu'ils interagissent physiquement dans le noyau des cellules végétales. Nos données montrent également que MIP1 régule négativement l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30. De plus, le mutant d'Arabidopsis *mip1-1* est plus résistant à une inoculation par un agent pathogène avirulent, suggérant que MIP1 possède un rôle de régulateur négatif des réponses de défense médiées par AtMYB30. Enfin, toutes ces données suggèrent que l'ubiquitination d'AtMYB30 pourrait être nécessaire à l'atténuation des réponses de défense. Des résultats préliminaires montrent que si AtMYB30 est ubiquitiné *in planta*, cette modification pourrait être un signal de dégradation par le protéasome. Nous pouvons donc formuler l'hypothèse que l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 par MIP1 conduirait à une dégradation d'AtMYB30, diminuant ainsi son activité transcriptionnelle.

II.4.1 Quel rôle pour MIP1 dans le contrôle de la résistance ?

Les données obtenues lors de l'étude du phénotype du mutant *mip1-1*, après inoculation par des bactéries avirulentes, ont permis de montrer que MIP1 agirait comme régulateur négatif des réponses de défense. Afin de compléter cette étude, il pourrait être intéressant d'étudier son phénotype au cours d'une interaction compatible. De plus, afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'ubiquitination d'AtMYB30 conduirait à sa dégradation, et par conséquent à une diminution de son activité transcriptionnelle, il serait utile d'étudier le profil d'expression des gènes cibles putatifs d'AtMYB30, dans le mutant *mip1-1*. Ainsi, l'ubiquitination d'AtMYB30 serait abolie chez *mip1-1*, stabilisant la protéine et augmentant donc son activité transcriptionnelle. Ceci conduirait à une surexpression des gènes cibles d'AtMYB30, appartenant à la voie de biosynthèse des VLCFA, au cours d'une interaction avec un agent pathogène avirulent. En effet, des données préliminaires montrent que le gène *KCS1* présente un niveau d'expression plus fort dans la lignée mutante *mip1*, en comparaison avec la lignée sauvage Col-0, après inoculation avec *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*). Ces résultats préliminaires très encourageants doivent être confirmés, mais ils suggèrent que

l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 par MIP1 jouerait un rôle direct, ou non, dans le contrôle de son activité transcriptionnelle.

L'étude du rôle de MIP1 dans le contrôle des réponses de défense sera également facilitée par la génération de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant *MIP1* sous le contrôle d'un promoteur constitutif (*P35S:MIP1-HA*). Ces lignées sont actuellement en cours de criblage. Leur phénotype de résistance après inoculation par des bactéries virulentes et avirulentes sera étudié. Il sera également intéressant de quantifier l'expression des gènes cibles d'AtMYB30 au cours d'une interaction incompatible. On s'attend ici à une diminution de l'induction de ces gènes cibles, due à l'ubiquitination accrue d'AtMYB30 dans ces lignées *P35S:MIP1-HA*. Enfin, si le phénotype de la lignée *P35S:MIP1-HA* est suffisamment fort, il pourrait être envisagé de croiser cette lignée avec la lignée surexprimant AtMYB30-TAP (*P35S:AtMYB30-TAP*). La surexpression simultanée de MIP1 et d'AtMYB30 pourrait alors conduire à un niveau d'ubiquitination élevé d'AtMYB30. Si ce croisement permet de réverser le phénotype de résistance accrue conféré par la surexpression d'AtMYB30, cela permettra de confirmer le rôle majeur de MIP1 sur l'activité d'AtMYB30.

Enfin, dans le but de déterminer si MIP1 possède une activité E3 ligase, des tests d'auto-ubiquitination *in vitro* ont été menés. Pour cela, la cascade d'ubiquitination est reconstituée *in vitro* en mélangeant les différents composants nécessaires : de l'ubiquitine, de l'ATP, une enzyme E1 commerciale, une enzyme E2 à large spectre (UBC8) produite chez *E. coli* et enfin MIP1 produite également chez *E. coli*. Cependant, ces tests n'ont pas permis de détecter d'auto-ubiquitination de MIP1 *in vitro*. Ceci pourrait s'expliquer par les méthodes utilisées pour la purification des enzymes produites chez *E. coli*. En effet, il est important de trouver des conditions optimales qui permettent de préserver l'activité des enzymes purifiées. D'autre part, ce résultat négatif pourrait aussi provenir de l'enzyme E2 utilisée. En effet, il existe 37 gènes codant des enzymes E2 putatives dans le génome d'*Arabidopsis* (Wiborg et al., 2007), et il est connu que certaines E3 ligases interagissent préférentiellement avec certaines E2 (Kraft et al., 2005). Même si nous avons choisi une enzyme E2 à large spectre, il n'est pas exclu que MIP1 fonctionne préférentiellement avec une autre E2. D'autres enzymes E2 seront donc utilisées dans les essais d'ubiquitination *in vitro*, et ce point sera discuté dans la partie « Discussion générale ».

Une manière indirecte de déterminer si MIP1 possède une activité E3 ligase et si celle-ci est impliquée dans la régulation des réponses de défense, consiste à générer une construction mutée dans le domaine RING de MIP1. En effet, il a été montré que la substitution de trois acides aminés du domaine RING abolit l'activité E3 ligase des protéines à domaine RING (Stone et al., 2005). La génération d'une telle construction pour MIP1 est en cours. Elle sera utilisée dans les essais de transactivation *in planta*, afin de tester si l'effet de MIP1 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 est dépendant de son éventuelle activité E3 ligase. De plus, il sera envisagé de compléter le mutant *mip1* avec cette forme mutante de MIP1, et d'étudier le phénotype de cette lignée après une inoculation bactérienne. Si l'activité E3 ligase de MIP1 est nécessaire à son rôle de régulateur négatif de la résistance, cette lignée complétée possèdera le même phénotype que le mutant *mip1*. Enfin, cette construction pourra également être utilisée comme contrôle négatif dans les tests d'ubiquitination *in vitro*.

Toutes ces expériences permettront de mieux comprendre le rôle joué par MIP1 dans la régulation des mécanismes de défense médiée par AtMYB30.

II.4.2 Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre MIP1 et MIP1-L ?

Une redondance fonctionnelle entre E3 ligases à domaine RING a été mise en évidence dans divers processus biologiques. Par exemple, DRIP1 et DRIP2 sont deux protéines RING responsables de l'ubiquitination de DREP2A, un régulateur positif de la réponse au stress hydrique chez *Arabidopsis* (Qin et al., 2008). *DRIP1* et *DRIP2* sont phylogénétiquement proches car ils possèdent 66% d'identité dans leurs acides aminés. De façon intéressante, les simples mutants ne présentent pas de phénotype différent du sauvage, alors que le double mutant *drip1/drip2* présente une activation des gènes de réponse au stress hydrique. Ces données confirment l'existence d'une redondance fonctionnelle entre DRIP1 et DRIP2.

Ces données bibliographiques, ainsi que le phénotype quantitatif du mutant *mip1-1* nous ont amenés à étudier son plus proche homologue chez *Arabidopsis* : MIP1-L. A l'inverse de *mip1-1*, le mutant d'*Arabidopsis* *mip1-L-1* ne montre pas de résistance accrue après inoculation avec *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*). De plus, des données préliminaires montrent qu'aucune interaction entre AtMYB30-CFP et MIP1-L-YFP ne peut être détectée, en utilisant la technique du FLIM. Cependant, ce résultat négatif pouvait être dû à la conformation de MIP1-L, pouvant gêner le transfert d'énergie de la CFP, portée par AtMYB30, vers la YFP, portée par MIP1-L, même si les deux protéines interagissaient *in vivo*. Pour contourner ce problème, une fusion de la YFP à l'extrémité N-terminale de MIP1-L a été utilisée récemment dans les expériences de FLIM. Dans ce contexte, il est apparu qu'AtMYB30-CFP et YFP-MIP1-L interagissent *in planta*. AtMYB30 interagit donc *in vivo* avec MIP1, et avec son plus proche homologue chez *Arabidopsis*, MIP1-L.

Afin de déterminer s'il existe une redondance fonctionnelle entre MIP1 et MIP1-L, il est nécessaire d'analyser le phénotype du double mutant *mip1/mip1-L*, actuellement en génération T2. Des données préliminaires montrent que ce double-mutant présente un phénotype de résistance plus marqué que le mutant *mip1*. Si ce résultat est confirmé, cela signifierait qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les deux E3 ligases MIP1 et MIP1-L.

II.4.3 AtMYB30, une cible d'ubiquitination ?

Afin de déterminer si MIP1 est capable d'ubiquitiner AtMYB30, des tests d'ubiquitination *in vitro* seront menés. Ces tests pourront également être effectués avec la forme mutante de MIP1 dont l'activité E3 ligase est abolie. Dans ces tests, il faudra au préalable démontrer que MIP1 est une E3 ligase fonctionnelle *in vitro* (voir Résultats II.4.1). Des expériences similaires seront effectuées avec MIP1-L.

Par ailleurs, une production d'AtMYB30 *in planta*, suivie d'une immunoprécipitation et d'une analyse par spectrométrie de masse, pourrait permettre de démontrer l'ubiquitination d'AtMYB30 *in planta*. Une fois l'ubiquitination d'AtMYB30 validée, il sera intéressant d'identifier, par spectrométrie de masse, les sites d'ubiquitination dans la séquence

d'AtMYB30. Ces sites seront alors mutés et l'effet de ces mutations sur les phénotypes conférés par AtMYB30 pourra être étudié.

Les résultats présentés dans ce chapitre soutiennent l'hypothèse que l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 conduirait à sa dégradation par le protéasome. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de mettre en évidence une stabilisation d'AtMYB30 *in vitro* ou *in vivo*, chez *N. benthamiana* ou *Arabidopsis*. L'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 par MIP1 ou MIP1-L conduirait donc à sa dégradation par le protéasome, diminuant ainsi indirectement son activité transcriptionnelle. Cette hypothèse est soutenue par le fait que MIP1 soit un régulateur négatif de la résistance et que l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 soit diminuée en sa présence.

Cependant, la surexpression simultanée d'AtMYB30 et MIP1 chez *N. benthamiana* ne semble pas modifier la stabilité d'AtMYB30. On ne peut donc exclure que l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 ait plus un effet sur son activité transcriptionnelle que sur sa stabilité. Un mécanisme similaire a été observé chez les animaux, dans le cas du facteur de transcription Met4, où son ubiquitination provoque une diminution de son activité transcriptionnelle (Kaiser et al., 2000 ; Flick et al., 2004). Cependant, les résultats présentés ici ont été obtenus en exprimant *AtMYB30* sous le contrôle d'un promoteur 35S. Or des résultats préliminaires obtenus récemment dans l'équipe semblent indiquer que MIP1 aurait un effet négatif sur l'accumulation d'AtMYB30, lorsque celui-ci est sous le contrôle de son propre promoteur. Si ces données récentes sont confirmées, elles indiqueraient que l'effet négatif de MIP1 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 serait dû à une dégradation protéique dépendante du protéasome.

Les différentes perspectives évoquées ci-dessus permettront donc d'obtenir une meilleure compréhension de l'effet de l'ubiquitination sur la fonction d'AtMYB30 dans le contrôle des réponses de défense face aux agents pathogènes.

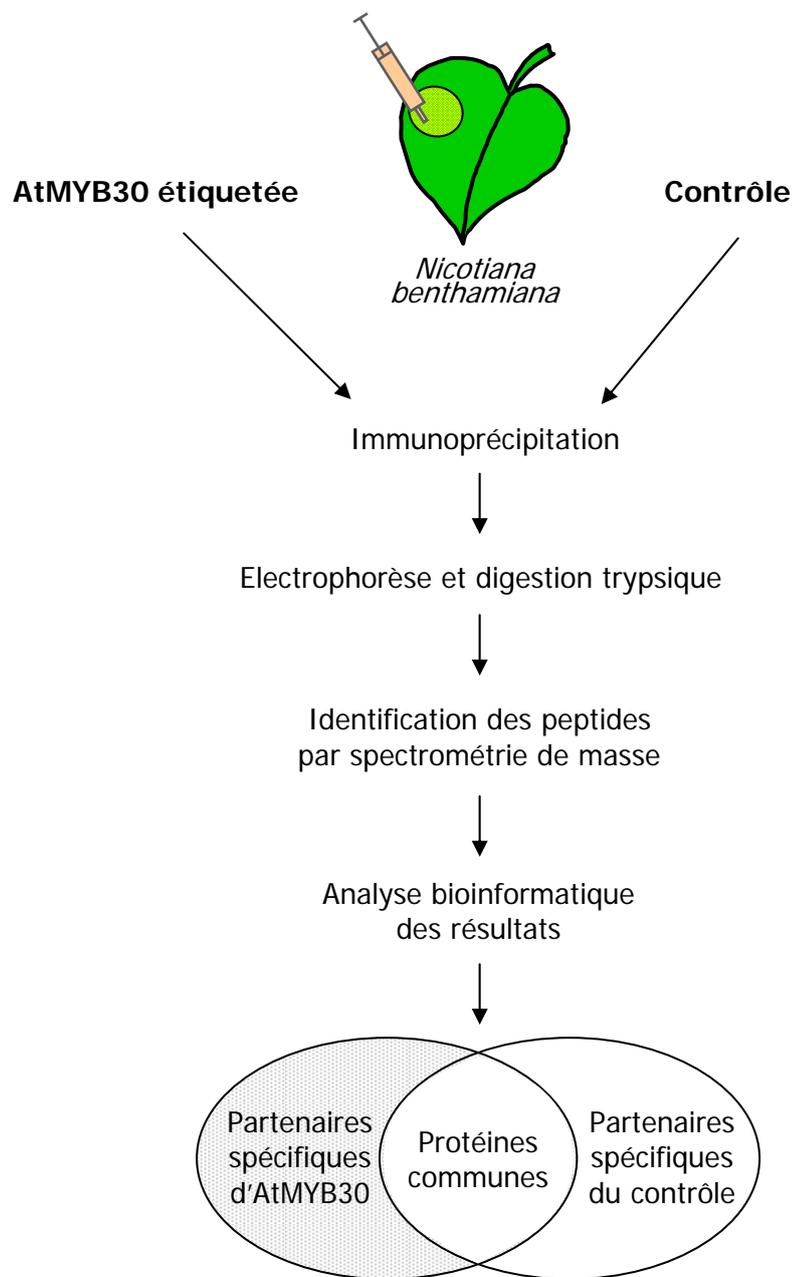


Figure 34. Vue d'ensemble de la stratégie de recherche des interacteurs d'AtMYB30 par une approche protéomique.

La protéine AtMYB30 étiquetée sera produite *in planta* de façon stable chez *Arabidopsis*, ou transitoire chez *N. benthamiana*. Après une extraction protéique totale, AtMYB30 sera ensuite immunoprécipitée à l'aide de son étiquette. Après électrophorèse, une digestion trypsique des protéines contenues dans les pistes « essai » et « contrôle » permettra d'identifier les peptides par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Une analyse bioinformatique sera mise en place afin d'identifier les protéines contenant ces peptides et d'éliminer les faux-positifs contenus également dans l'échantillon contrôle n'exprimant pas AtMYB30.

III. Recherche sans *a priori* des interacteurs d'AtMYB30 par une approche protéomique

III.1 Objectif global

Les interactions macromoléculaires de type protéine-protéine sont fondamentales pour tous les processus biologiques : formation des structures cellulaires, des complexes enzymatiques ou régulation des voies de signalisation, par exemple. L'identification et la caractérisation de tels complexes est une avancée dans la compréhension des mécanismes de mise en place et de régulation de ces processus biologiques.

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du fonctionnement d'AtMYB30, une recherche sans *a priori* de ses partenaires protéiques, *via* une approche protéomique, a donc été entreprise. Celle-ci est complémentaire du crible double-hybride précédemment décrit (Introduction IV.1.5), dans le sens où elle pourrait permettre de (i) valider certaines interactions identifiées dans la levure et (ii) permettre d'identifier de nouveaux partenaires d'AtMYB30. L'objectif de cette approche protéomique est de produire une version étiquetée d'AtMYB30 *in planta*, de purifier la protéine par immunoprécipitation à l'aide de cette étiquette et d'identifier par spectrométrie de masse les protéines co-purifiant avec AtMYB30 (Figure 34).

III.2 Recherche des conditions optimales de production d'AtMYB30 purifiée

Une des conditions requises pour la réussite de cette approche est d'obtenir une quantité suffisante de protéine après immunoprécipitation, pour permettre l'identification d'AtMYB30 par spectrométrie de masse. En effet, la fraction finale obtenue après ce type d'immunoprécipitation présente une diversité protéique élevée et constitue donc un mélange complexe. Dans ce type de mélange, et malgré l'amélioration de la sensibilité des spectromètres de masse, l'identification des protéines présentes en faible quantité est un challenge. Il faut donc trouver les conditions optimales permettant d'obtenir AtMYB30 purifiée en quantité suffisante, tout en s'assurant que le mélange contienne le minimum de contaminants.

III.2.1 Expression stable d'AtMYB30 chez Arabidopsis

III.2.1.1 Introduction

Dans le but d'identifier les partenaires d'AtMYB30 dans son contexte biologique, il parut pertinent de chercher à produire AtMYB30 dans le **système homologue** : Arabidopsis. Des lignées transgéniques d'Arabidopsis surexprimant AtMYB30 étiquetée avec l'étiquette TAP ont donc été générées (*35S:MYB30-TAP*). L'analyse de ces lignées dans le fonc génétique Col-0 a montré que le niveau d'expression protéique d'AtMYB30 chez les plantes adultes était très faible. Nous avons alors cherché à comprendre les mécanismes conduisant à ce faible niveau d'expression d'AtMYB30-TAP, afin d'envisager une solution pour l'augmenter.

Expression of the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 is post-transcriptionally regulated.

Solène Froidure, Dominique Roby and Susana Rivas*

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France.

Résumé

Le facteur de transcription AtMYB30 a été précédemment identifié comme régulateur positif de la mort cellulaire hypersensible et des réponses de défense, après infection par des agents pathogènes bactériens. Dans cette étude, nous avons essayé de générer des lignées transgéniques qui surexpriment *AtMYB30* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. Cependant, aucune lignée transgénique surexprimant *AtMYB30* n'a pu être obtenue, suggérant l'existence d'un mécanisme moléculaire qui régule négativement l'expression d'*AtMYB30* *in planta*. Nos résultats suggèrent qu'un phénomène de silencing post-transcriptionnel régule négativement l'expression d'*AtMYB30* chez les plantules et les plantes adultes. A l'inverse, un phénomène de silencing indirect est responsable de l'induction de l'expression d'*AtMYB30* après une inoculation bactérienne, probablement *via* la dégradation d'un régulateur négatif encore inconnu. Ces résultats soulignent l'importance du silencing post-transcriptionnel dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription, au cours du développement, mais aussi en réponse aux agents pathogènes.

Expression of the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 is post-transcriptionally regulated

Solène Froidure, Dominique Roby and Susana Rivas*

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS-INRA 2594/441, F- 31320 Castanet Tolosan, France.

*Corresponding author: susana.rivas@toulouse.inra.fr; Fax: +33 5 61285061

Running title: Post-transcriptional regulation of *AtMYB30* expression

Keywords: Arabidopsis; AtMYB30; posttranscriptional regulation; RNA silencing; transcription factor

ABSTRACT

The Arabidopsis transcription factor AtMYB30 was previously identified as a positive regulator of plant hypersensitive cell death and defence responses to inoculation with bacterial pathogens. In this study, we attempted to generate Arabidopsis transgenic lines that overexpress *AtMYB30* under the control of the constitutive 35S promoter. However, no transgenic lines overexpressing *AtMYB30* could be obtained, suggesting the existence of a molecular mechanism that negatively regulates *AtMYB30* expression *in planta*. Our results suggest that RNA silencing directly mediates downregulation of *AtMYB30* expression, both in young seedlings and in adult plants. In contrast, an indirect RNA silencing mechanism is responsible for the induction of *AtMYB30* expression after bacterial inoculation, possibly *via* the degradation of a yet unknown negative regulator of its expression. These results underline the importance of RNA silencing in the regulation of the activity of transcription factors both during plant development and in response to microbes.

1. Introduction

In RNA silencing, production of double-stranded RNA (dsRNA) of various origins can be programmed genetically as in the case of stem-loop microRNA transcripts and inverted repeats. dsRNA synthesis may also require the action of one of 6 RNA-dependent RNA polymerases (RDR1-6) that use single-stranded RNA as templates [1]. dsRNA is processed into small RNA (sRNA) duplexes of varying sizes through the action of RNase-III-like Dicer enzymes, of which four paralogs are found in Arabidopsis (DCL1-4). These sRNAs are known as short interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) [2]. sRNA duplexes are stabilized by 2'-O-methylation of their 3' overhanging ends by the activity of the methyl-transferase HEN1 [3]. sRNAs are then bound to one of 10 ARGONAUTE (AGO) proteins to guide an RNA-induced silencing complex. Following base-pairing with the target transcript, sRNA-loaded AGOs direct post-transcriptional silencing by endonucleolytic cleavage or repression of translation [1, 4].

Plant development is characterized by precise control of gene regulation, leading to the correct spatial and temporal tissue patterning. The role of RNA silencing is well established in the control of plant development. Indeed, most of the plant miRNA targets predicted *in silico* are transcription factors (TFs) involved in the control of development [5]. miRNAs have been reported to target TFs controlling flowering time and floral organ identity [6, 7], leaf development [8] or lateral organ polarity [9, 10]. Recent studies show that sRNAs are also integral components of plant responses to adverse environmental conditions, including biotic stresses [11, 12]. Finally, miRNAs can also have positive effects on symbiotic and parasitic plant-bacterium interactions [13, 14].

Plant *MYB* genes have been involved in regulation of secondary metabolism, particularly in the phenylpropanoid pathway and tryptophan biosynthesis, control of cellular morphogenesis and regulation of meristem formation and cell cycle, as well as in plant responses to various hormones and environmental stimuli [15-17]. The *MYB* gene *AtMYB30* was isolated on the basis of its early, transient and specific expression in Arabidopsis after inoculation with avirulent bacterial pathogens [18, 19]. Another report identified *AtMYB30* as a positive regulator of the signalling pathway controlling the establishment of cell death in response to pathogen attack [20]. Putative *AtMYB30* target genes are involved in the lipid biosynthesis pathway that leads to the production of very long chain fatty acids, suggesting a role of this pathway in the control of the HR and plant defence responses [21].

Here we describe RNA silencing as a post-transcriptional mechanism that regulates *AtMYB30* expression not only during development, but also after bacterial infection. These results underline the role of sRNAs in the regulation of TF activity both during plant development and in response to pathogen attack.

2. Materials and Methods

2.1. Constructs

The *35S:AtMYB30-TAP* construct was described previously [21].

2.2. Plant and Bacterial Materials

Arabidopsis lines used in this study were in Columbia (Col-0) background. Plants were grown in Jiffy pots under controlled conditions, as previously described [22]. For plant inoculations, leaves of 4-week-old plants were syringe-infiltrated using the *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) DC3000 (*AvrRpm1*) at the indicated bacterial densities.

2.3. Protein Gel Blot Analysis

Protein extracts were prepared as previously described [23]. For detection of TAP-tagged proteins, blots were incubated with rabbit PAP soluble complex antibody (SIGMA) linked to horseradish peroxidase, at a final dilution of 1:5,000. Proteins were visualized using the Immobilon kit (Millipore) under standard conditions.

2.4. RNA Extraction and Quantitative-RT-PCR Analysis

Material for RNA analysis was ground in liquid nitrogen and total RNA was isolated using the Nucleospin RNA plant kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using 1.5 µg of total RNA.

Real-time quantitative PCR was performed on a Light Cycler 480 II machine (Roche Diagnostics, Meylan, France), using Roche reagents. Primers used for Q-RT-PCR are described in Supplemental Table 1. Real-time quantitative PCR was performed on a Light Cycler 480 II machine (Roche Diagnostics, Meylan, France), using Roche reagents. Primers used for Q-RT-PCR were At2g38390-S (5' aactctatgcagcatttgatccact), At2g38390-AS (5' tgattgcatatctttatcgccatc), MYB30-S (5' tcaagagtgatgatgggaaggagt) and MYB30-AS (5' gtccaccagaatcctcaaca). Relative expression was calculated as the ΔC_p between *AtMYB30* and the internal control [*SAND* family (At2g28390)].

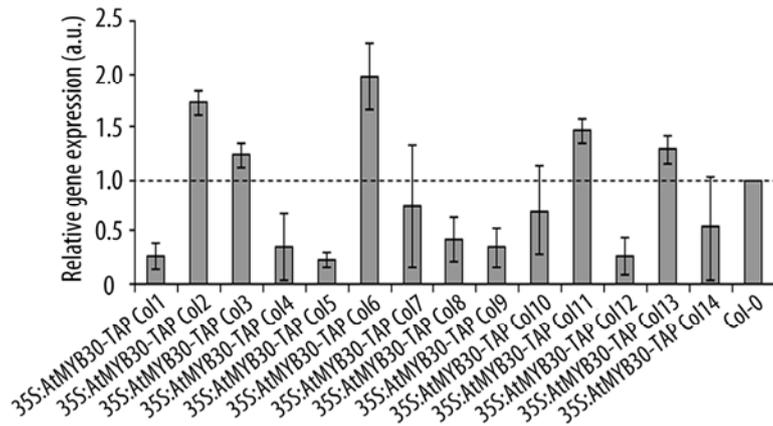


Fig. 1. TAP-tagged *AtMYB30* is not overexpressed in Col-0 transgenic plants.

AtMYB30 expression was studied by Q-RT-PCR in 4 week-old *Arabidopsis* plants expressing the *35S:AtMYB30-TAP* construct. The expression values were normalized using SAND family gene as internal standard. *AtMYB30* expression is related to the value of Col-0, which is set at 1. Mean and SEM values were calculated from 3 replicates for each transgenic line.

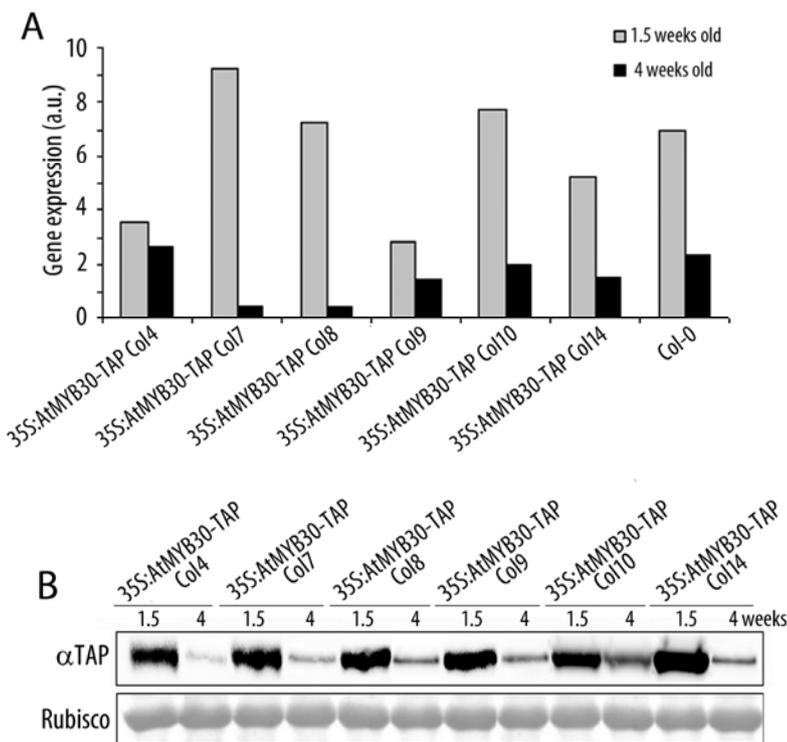


Fig. 2. *AtMYB30* developmental expression in Col-0 transgenic lines carrying the *35S:AtMYB30-TAP* construct.

(A) *AtMYB30* expression was studied by Q-RT-PCR in 1.5 week-old seedlings (grey bars) or 4 week-old adult plants (black bars). Expression values were normalized using SAND family gene as internal standard. One representative experiment out of three is shown.

(B) Western Blot analysis showing TAP-tagged *AtMYB30* protein expression in seedlings or adult plants of the indicated lines. Age of seedling and plants is indicated in weeks. Ponceau S staining of ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) for confirmation of equal loading in each lane is shown at the bottom.

3. Results and discussion

3.1. Generation of *AtMYB30-TAP* overexpressing lines

In order to get a better understanding of *AtMYB30*-mediated regulation of plant defence, we sought to generate Arabidopsis transgenic plants that overexpress *AtMYB30*. A TAP-tagged *AtMYB30* fusion was cloned under the control of the constitutive 35S promoter from cauliflower mosaic virus. This construct was then used to transform an *AtMYB30ko* mutant line in the Columbia (Col-0) background [24]. Analysis of *AtMYB30* transcript levels in 14 adult homozygous transgenic plants showed that, despite the presence of the 35S promoter, *AtMYB30* expression was, at best, only slightly higher than that observed in wild type Col-0 plants (Fig. 1). These results suggest that a regulatory mechanism exists in the Col-0 genetic background that impedes *AtMYB30* overexpression.

3.2. Analysis of *AtMYB30* expression in Col-0 transgenic lines during development and after bacterial inoculation

In a previous RT-PCR analysis of *AtMYB30* expression during development, the *AtMYB30* transcript was only detected in young seedlings and not in mature plants [19]. We therefore investigated whether *AtMYB30-TAP* expression is also developmentally regulated in Col-0 transgenic plants. Both transcript and protein expression analysis of six independent lines (35S:MYB30-TAP Col4, 7, 8, 9, 10 and 14) showed that expression of TAP-tagged *AtMYB30* is higher in 1.5 week-old seedlings than in 4 week-old plants (Fig. 2). These results could be explained by co-suppression of the *AtMYB30-TAP* transgene in the Col-0 transformants. However, *AtMYB30* transcript levels are also higher in seedlings than in adult wild type Col-0 plants, strongly suggesting that a post-transcriptional regulatory mechanism, other than co-suppression, is responsible for suppression of *AtMYB30* expression during development.

In wild type adult plants, *AtMYB30* expression is transiently upregulated around 2 hours post-inoculation (hpi) with avirulent bacteria and later decreases to basal levels [24]. The expression pattern of *AtMYB30* was studied in two independent Col-0 transgenic lines (35S:MYB30-TAP Col2 and 10), after inoculation of 4 week-old plants with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 expressing the avirulence gene *AvrRpm1*. Because of the presence of the 35S promoter, constitutive expression of *AtMYB30* was expected. However, *AtMYB30* expression peaked 2 hpi in both transgenic lines and wild type Col-0 plants (Fig. 3). These results strongly suggest that *AtMYB30* expression is also post-transcriptionally regulated in Arabidopsis plants after inoculation with bacterial pathogens.

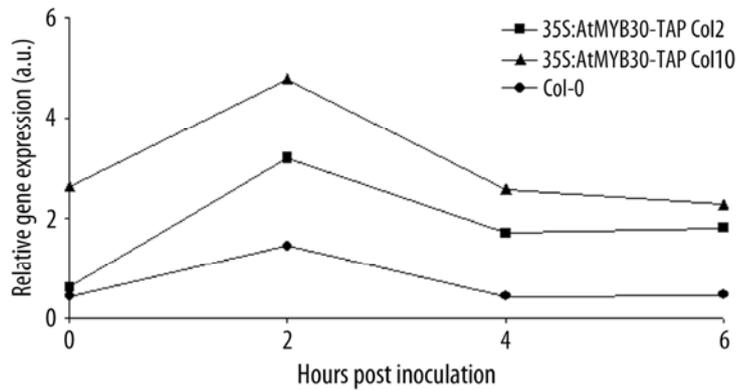


Fig. 3. Analysis of *AtMYB30* expression profile in wild type Col-0 and two independent transgenic lines after bacterial inoculation.

Leaves of 4 weeks-old *Arabidopsis* plants, Col-0 (circles), 35S:AtMYB30-TAP Col2 (squares) and 35S:AtMYB30-TAP Col10 (triangles) were syringe-infiltrated with a bacterial suspension of *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*), 5×10^7 cfu/mL. Samples were harvested at the indicated time points. Expression values were determined by Q-RT-PCR and normalized using SAND family gene as internal standard. One representative experiment out of three is shown.

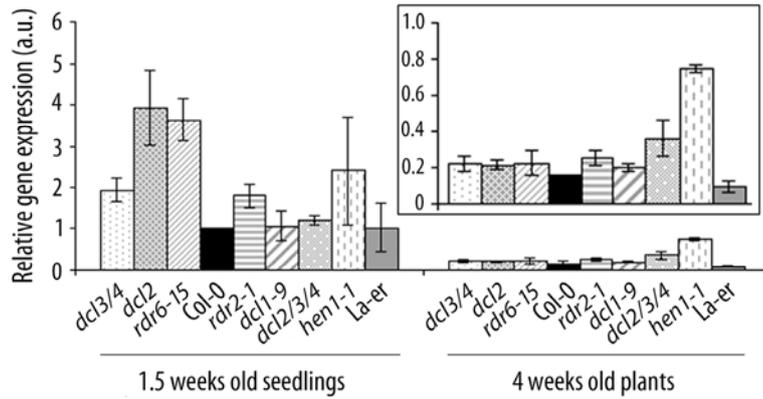


Fig. 4. Analysis of *AtMYB30* expression in Arabidopsis silencing mutants during development. *AtMYB30* expression was studied by Q-RT-PCR in 1.5 week-old seedlings (left) or 4 week-old adult plants (right; see inset) of the indicated lines. The expression values were normalized using SAND family gene as internal standard. *AtMYB30* expression is related to that of 1.5 week-old wild type Col-0 seedlings, which is set at 1. Mean and SEM values were calculated from 3 replicates for each line.

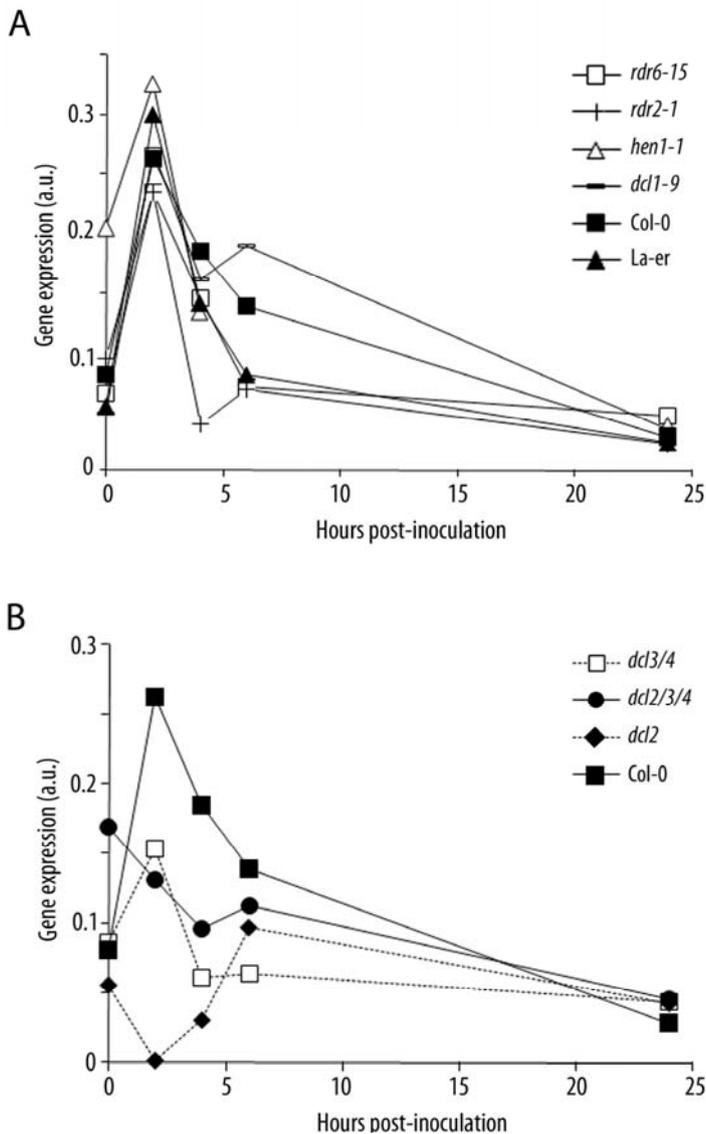


Fig. 5. Analysis of *AtMYB30* expression in Arabidopsis silencing mutants after bacterial inoculation.

Leaves of 4 week-old Arabidopsis plants were syringe-infiltrated with a bacterial suspension of *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*), 5×10^7 cfu/mL. Samples were harvested at the indicated times. *AtMYB30* expression values were determined by Q-RT-PCR and normalized using SAND family gene as internal standard. One representative experiment is shown.

3.3. Analysis of *AtMYB30* expression in *Arabidopsis* silencing mutants, during development and after bacterial inoculation

To investigate whether an RNA silencing mechanism is involved in regulation of *AtMYB30* expression, *AtMYB30* transcript levels were monitored, both during development and after bacterial inoculation, in mutant plants affected in several silencing pathways. Used mutants are impaired in either siRNA biosynthesis mediated by DICER-LIKE2, 3 and 4 enzymes (*dcl3/4*, *dcl2*, *dcl2/3/4*), miRNA biosynthesis via DICER-LIKE1 (*dcl1-9*), small RNA methylation (*hen1-1*) or double-stranded RNA biosynthesis via RNA-dependent RNA polymerase (*rdr6-15*, *rdr2-1*). The *dcl1-9* and *hen1-1* mutants are in the La-er background, whereas all the other mutants are in the Col-0 background. Similar to wild type Col-0 or La-er plants, *AtMYB30* expression in all silencing mutants was higher in 1.5 week-old seedlings than in adult plants (Fig. 4). In addition, *dcl2* and *rdr6-15* and, to a lower extent, *dcl3/4* and *rdr2-1* seedlings presented higher *AtMYB30* expression than wild type Col-0, suggesting that a silencing phenomenon, which involves double-stranded RNA and siRNA biosynthesis, contributes to downregulation of *AtMYB30* expression in seedlings. In contrast, in 4 week-old plants, *AtMYB30* expression was found to be higher in *dcl2/3/4* and in *hen 1-1* mutant plants compared to wild type Col-0 and La-er, respectively (Fig. 4, inset), indicating that siRNA-mediated RNA silencing and small RNA methylation may be responsible for down-regulation of *AtMYB30* expression in adult plants.

Finally, in order to investigate whether an RNA silencing mechanism is involved in regulation of *AtMYB30* expression during bacterial inoculation, *AtMYB30* transcript levels were measured in the different silencing mutants after inoculation with *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*). *hen1-1* and *dcl2/3/4* plants showed higher *AtMYB30* expression before inoculation, consistent with the transcript analysis performed with adult plants (Fig. 4). *rdr6-15*, *rdr2-1*, *hen1-1* and *dcl1-9* mutant plants displayed a similar *AtMYB30* expression profile than wild type plants (Fig. 5A), whereas in *dcl2*, *dcl3/4* and *dcl2/3/4* mutants *AtMYB30* expression was significantly lower than that observed in wild type Col-0 plants (Fig. 5B). These data indicate that DCL2, 3 and 4, involved in siRNA biosynthesis, are necessary for upregulation of *AtMYB30* expression after bacterial inoculation. Since *AtMYB30* expression is weaker in the tested *dcl* mutants, the effect of DCL enzymes on *AtMYB30* expression seems to be indirect, possibly via downregulation of a negative regulator or its expression after bacterial inoculation.

A model that integrates the findings of this work is presented in Fig. 6. Briefly, in young seedling and untreated adult plants, RNA silencing directly mediates downregulation of *AtMYB30* expression. In contrast, an indirect post-transcriptional regulatory mechanism is responsible for the induction of *AtMYB30* expression after bacterial inoculation, possibly via the degradation of a yet unknown negative regulator of its expression.

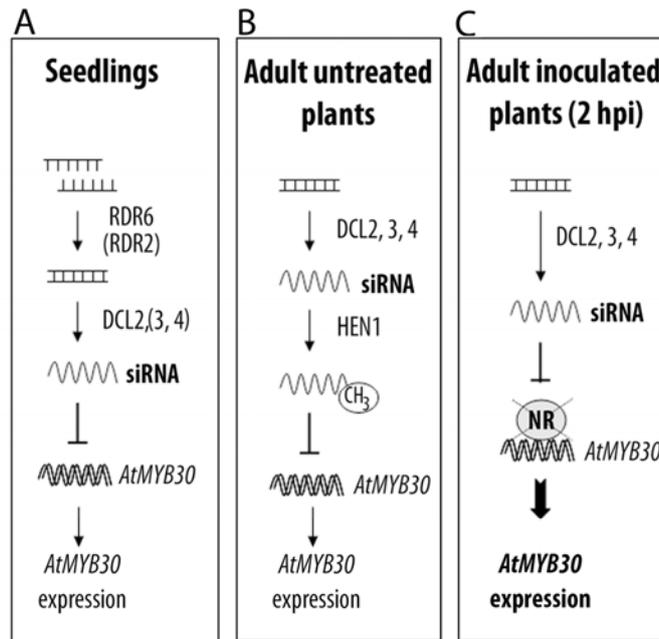


Fig. 6. Model of regulation of *AtMYB30* expression, during development and after bacterial inoculation.

(A) In seedlings, *AtMYB30* expression is higher in *dcl2* and *rdr6-15* and, to a lower extent, *dcl3/4* and *rdr2-1* mutants, as compared to wild type Col-0. These results suggest that, in wild type Col-0, dsRNA biosynthesis *via* RDR6 and RDR2, and siRNA biosynthesis *via* DCL2, 3 and 4, contribute to downregulation of *AtMYB30* expression.

(B) In untreated adult plants, *AtMYB30* expression is higher in *dcl2/3/4* and *hen1-1* mutants than in wild type Col-0 plants. In wild type plants, production of a siRNA by DCL2, 3 and 4, and its methylation by HEN1, thus contribute to decreased *AtMYB30* expression.

(C) After bacterial inoculation of adult plants, *AtMYB30* expression is significantly lower in *dcl2*, *dcl3/4* and *dcl2/3/4* mutants than in wild type Col-0. In the wild type situation, DCL2, 3 and 4, involved in siRNA biosynthesis, would thus indirectly contribute to induction of *AtMYB30* expression *via* downregulation of a negative regulator of its expression.

RNA silencing-related enzymes identified in this study as playing a role in controlling *AtMYB30* expression are indicated. NR, Negative Regulator of *AtMYB30* expression.

Globally, DCL2, 3 and 4, but not DCL1, seem to contribute to the control, direct or indirect, of the expression of *AtMYB30* both during development and after bacterial inoculation. Many mature miRNAs have been found to silence partly or fully complementary mRNAs that encode developmentally important TFs. However, the expression of *AtMYB30* is not altered in *dcl1-9* mutant plants, either during development or inoculation with bacteria, indicating that *AtMYB30* expression is not regulated by a miRNA. Although we cannot completely rule out this possibility, our results are consistent with the fact that no miRNA was found to hit on *AtMYB30* transcript, according to the ASRP (Arabidopsis Small RNA Project 2010; <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/db/>). Likewise, the ASRP did not identify any sRNA hits within the chromosomal *AtMYB30* sequence. However, 138 sRNAs, as well as 2 inverted repeat elements, were identified as perfect hits in the intergenic region upstream of *AtMYB30* coding sequence. These sRNAs could be responsible for downregulation of *AtMYB30* expression during development.

4. Conclusion

Activation of plant defence and associated cell death responses entail significant costs for the plant cell. Therefore, defence responses need to be tightly regulated to be, not only efficient but also, beneficial to the plant. In agreement with this idea, here we showed that the expression of *AtMYB30*, previously identified as a positive regulator of Arabidopsis cell death in response to bacterial pathogens, is tightly regulated both during development and in response to bacterial inoculation. However, the nature of this regulation seems to be different depending on the situation. Whereas RNA silencing would be responsible for direct downregulation of *AtMYB30* expression, both in young seedlings and in adult plants, an indirect RNA silencing mechanism would lead to the induction of *AtMYB30* expression after bacterial inoculation, possibly *via* the degradation of a yet unknown negative regulator of its expression. Future work should focus on the identification and characterization of this negative regulator. Our work underlines the role of sRNAs in the regulation of the activity of transcription factors both during plant development and in response to microbes.

Acknowledgments

We thank Céline Remblière for help with Arabidopsis transformation. We also thank Lionel Navarro for the kind gift of the different Arabidopsis silencing mutant lines. This work was supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (Bourse Docteur-Ingénieur) to S.F.

References

- [1] O. Voinnet, Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility, *Curr Opin Plant Biol* 11 (2008) 464-470.
- [2] D. Baulcombe, RNA silencing in plants, *Nature* 431 (2004) 356-363.
- [3] B. Yu, Z. Yang, J. Li, S. Minakhina, M. Yang, R.W. Padgett, R. Steward, X. Chen, Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis, *Science* 307 (2005) 932-935.
- [4] P. Brodersen, O. Voinnet, The diversity of RNA silencing pathways in plants, *Trends Genet* 22 (2006) 268-280.
- [5] M.W. Rhoades, B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel, D.P. Bartel, Prediction of plant microRNA targets, *Cell* 110 (2002) 513-520.
- [6] M.J. Aukerman, H. Sakai, Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes, *Plant Cell* 15 (2003) 2730-2741.
- [7] X. Chen, A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development, *Science* 303 (2004) 2022-2025.
- [8] J.F. Palatnik, E. Allen, X. Wu, C. Schommer, R. Schwab, J.C. Carrington, D. Weigel, Control of leaf morphogenesis by microRNAs, *Nature* 425 (2003) 257-263.
- [9] M.T. Juarez, J.S. Kui, J. Thomas, B.A. Heller, M.C. Timmermans, microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity, *Nature* 428 (2004) 84-88.
- [10] C.A. Kidner, R.A. Martienssen, Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1, *Nature* 428 (2004) 81-84.
- [11] L. Navarro, P. Dunoyer, F. Jay, B. Arnold, N. Dharmasiri, M. Estelle, O. Voinnet, J.D. Jones, A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling, *Science* 312 (2006) 436-439.
- [12] N. Fahlgren, M.D. Howell, K.D. Kasschau, E.J. Chapman, C.M. Sullivan, J.S. Cumbie, S.A. Givan, T.F. Law, S.R. Grant, J.L. Dangel, J.C. Carrington, High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes, *PLoS One* 2 (2007) e219.
- [13] J.P. Combier, F. Frugier, F. de Billy, A. Boualem, F. El-Yahyaoui, S. Moreau, T. Vernie, T. Ott, P. Gamas, M. Crespi, A. Niebel, MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*, *Genes Dev* 20 (2006) 3084-3088.
- [14] A. Boualem, P. Laporte, M. Jovanovic, C. Laffont, J. Plet, J.P. Combier, A. Niebel, M. Crespi, F. Frugier, MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*, *Plant J* 54 (2008) 876-887.
- [15] R. Stracke, M. Werber, B. Weisshaar, The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Curr Opin Plant Biol* 4 (2001) 447-456.
- [16] Y. Chen, X. Yang, K. He, M. Liu, J. Li, Z. Gao, Z. Lin, Y. Zhang, X. Wang, X. Qiu, Y. Shen, L. Zhang, X. Deng, J. Luo, X.-W. Deng, Z. Chen, H. Gu, L.-J. Qu, The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family, *Plant Mol Biol* 60 (2006) 107-124.
- [17] C. Martin, J. Paz-Ares, MYB transcription factors in plants, *Trends in Genetics* 13 (1997) 67-73.
- [18] C. Lacomme, D. Roby, Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett* 459 (1999) 149-153.
- [19] X. Daniel, C. Lacomme, J.B. Morel, D. Roby, A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death, *Plant J* 20 (1999) 57-66.
- [20] F. Vaillau, X. Daniel, M. Tronchet, J.L. Montillet, C. Triantaphylides, D. Roby, A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 10179-10184.

- [21] S. Raffaele, F. Vaillau, A. Léger, J. Joubès, O. Miersch, C. Huard, E. Blée, S. Mongrand, F. Domergue, D. Roby, A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis, *The Plant Cell* 20 (2008) 752-767.
- [22] N. Journot-Catalino, I.E. Somssich, D. Roby, T. Kroj, The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell* 18 (2006) 3289-3302.
- [23] J.P. Combier, F. de Billy, P. Gamas, A. Niebel, S. Rivas, Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development, *Genes Dev* 22 (2008) 1549-1559.
- [24] S. Raffaele, S. Rivas, D. Roby, An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis, *FEBS Lett* 580 (2006) 3498-3504.

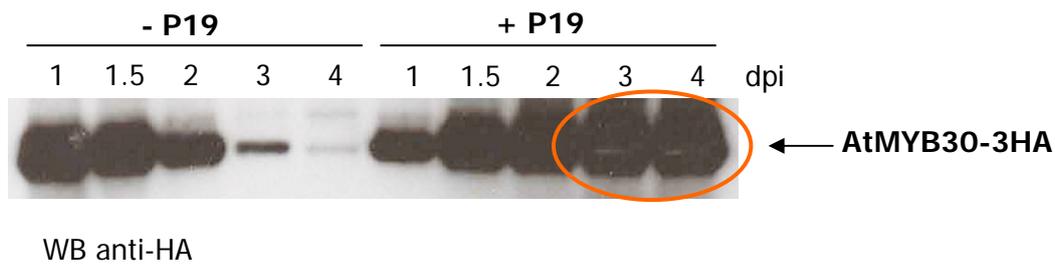


Figure 35. Expression transitoire d'AtMYB30-3HA via *Agrobacterium*, chez *N. benthamiana*.

Le niveau d'expression de la protéine AtMYB30-3HA, entre 1 et 4 jours après agroinfiltration en présence, ou non, de l'inhibiteur de silencing P19 (Voinnet et al., 2003), a été suivi par Western Blot. L'expression d'AtMYB30-3HA est élevée dans la zone entourée.

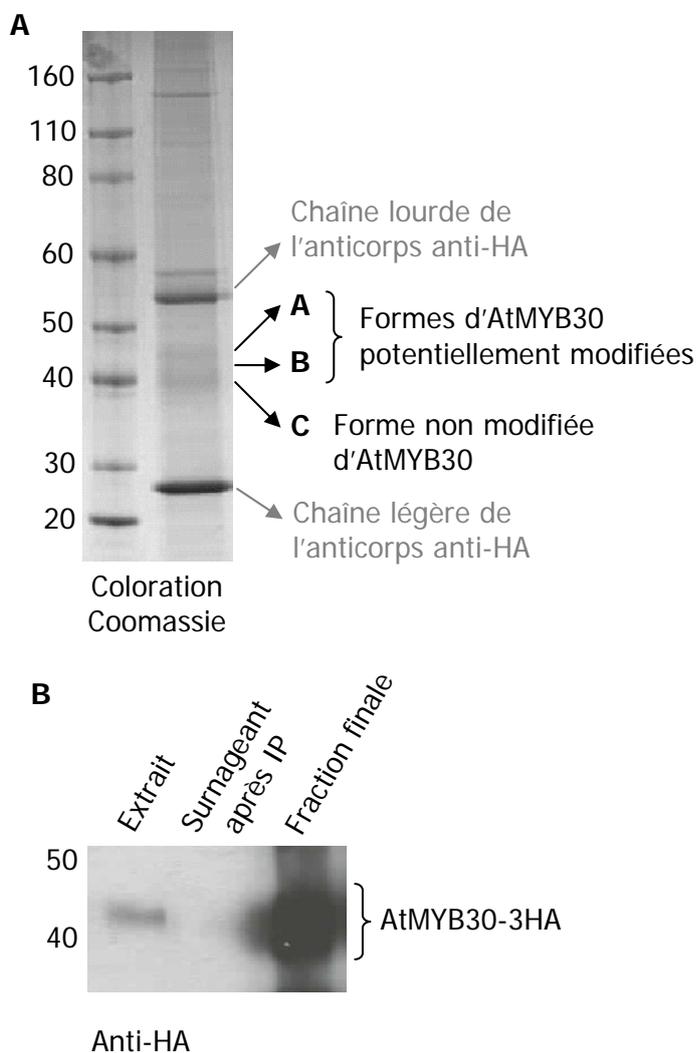


Figure 36. Bandes A, B et C dans lesquelles AtMYB30 a pu être identifié par spectrométrie de masse.

Après immunoprécipitation d'AtMYB30, la fraction finale est soumise à une électrophorèse 1D. **(A)** Le gel ainsi obtenu est coloré au bleu de Coomassie, puis les bandes A, B et C sont excisées pour être analysées par spectrométrie de masse. Ces bandes contiennent des peptides appartenant à AtMYB30. **(B)** La présence d'AtMYB30 dans ces bandes a pu être vérifiée par Western Blot.

III.2.1.3 Conclusion

Les plantes transgéniques *35S:MYB30-TAP* exprimant AtMYB30-TAP en quantité trop faible à l'état adulte, des plantules âgées de 1,5 semaines pourraient alors être préférables pour l'identification des partenaires protéiques. Cependant, des données suggèrent qu'indépendamment de son rôle de régulateur de la HR, AtMYB30 posséderait également un rôle au cours du développement (voir Introduction IV.1.4). Il est donc possible que les interacteurs d'AtMYB30 à ce stade soient différents de ceux impliqués dans la régulation de la défense chez les plantes adultes. Pour cette raison, nous avons décidé de ne pas utiliser les plantules *35S:MYB30-TAP* pour effectuer une recherche des partenaires protéiques d'AtMYB30.

En conclusion, le niveau d'expression d'*AtMYB30* dans les lignées transgéniques *35S:MYB30-TAP* adultes ne permet pas d'obtenir une quantité suffisante de protéines pour envisager l'identification de ses interacteurs par spectrométrie de masse. Pour tenter de contourner ce problème, la génération de nouvelles lignées transgéniques surexprimant *AtMYB30-TAP* sous le contrôle d'un promoteur inductible a alors été envisagée. En attendant ces lignées, des expériences exploratoires ont été menées, en utilisant le système hétérologue d'expression transitoire chez *N. benthamiana*. L'utilisation de ce système hétérologue est validée par le fait qu'AtMYB30 conserve son rôle de régulateur positif de la HR chez *N. benthamiana* (Froidure et al., 2010, submitted). Ceci suggère que les partenaires nécessaires à la fonction d'AtMYB30 dans la régulation de la HR seraient présents chez *N. benthamiana*.

III.2.2 Expression transitoire d'*AtMYB30* chez *N. benthamiana*

L'expression transitoire de protéines recombinantes *via Agrobacterium* chez *N. benthamiana* est couramment utilisée et fournit des rendements élevés en protéine. Pour des raisons techniques, la construction *P35S::AtMYB30-3HA* a été utilisée pour effectuer une première expérience de purification d'AtMYB30. Dans un premier temps, le niveau d'expression d'AtMYB30-3HA a été suivi par Western Blot entre 1 et 4 jours après Agro-infiltration de feuilles de *N. benthamiana*. De plus, l'inhibiteur viral de silencing P19 (Voinnet et al., 2003) a été utilisé afin d'augmenter le niveau d'expression. Comme attendu, il est apparu qu'un niveau élevé de production d'AtMYB30-3HA pouvait être obtenu en présence de P19, entre 3 et 4 jours après agro-infiltration (Figure 35).

Ces conditions de production ont donc été utilisées pour effectuer une première expérience d'immunoprécipitation dont l'objectif était de savoir si AtMYB30 pouvait être obtenue en quantité suffisante pour être identifiable par spectrométrie de masse. Les protéines purifiées après immunoprécipitation ont été soumises à une électrophorèse (SDS-PAGE), puis le gel obtenu a été coloré au bleu de Coomassie. Nous avons alors pu observer 3 bandes, situées à la taille attendue pour AtMYB30 (bande C), ou légèrement supérieure à celle-ci (bandes A et B) (Figure 36A). Un Western Blot a pu confirmer que ces bandes correspondaient à AtMYB30 (Figure 36B). Ces 3 bandes ont donc été excisées et analysées par spectrométrie de masse en tandem (Nano LC-MS/MS, Nano Liquid Chromatography associated to Mass Spectrometry) à la plate-forme protéomique de Toulouse (IFR40, Coll. C. Pichereaux, M. Rossignol). Après analyse des peptides contenus dans ces bandes et comparaison avec la base de données protéiques d'Arabidopsis (TAIR) à l'aide du logiciel MASCOT, **AtMYB30 a pu être identifiée dans ces 3 bandes** (A, B et C) avec un recouvrement de séquence de 31%, 37% et 24% respectivement (Figure 36, 37). La présence d'AtMYB30 dans ces 3 bandes, visibles à des poids moléculaires

Bande A (*potentiellement modifiée*)

1 MVRPPCCDKG GVKKGPWTPE EDIILVTYIQ EHGPGNWRRAV PTNTGLLRCS
51 KSCRLRWTNY LRPGIKRGNF **TEHEEKMIVH** LQALLGNRWA **AIASYLPQRT**
101 DNDIKNYWNT HLKKKLNKVN **QDSHQELDRS** **SLSSSPSSSS** **ANSNSNISRG**
151 QWERRLQTDI **HLAKKALSEA** LSPAVAPIIT STVTTTSSSA **ESRRSTSSAS**
201 **GFLRTQETST** **TYASSTENIA** KLLKGWVKNS PKTQNSADQI **ASTEVKEVIK**
251 SDDGKECAGA FQSFSEFDHS YQQAGVSPDH ETKPDITGCC SNQSQWSLFE
301 KWLFEDSGGQ IGDILLDENT NFF

Bande B (*potentiellement modifiée*)

1 MVRPPCCDKG GVKKGPWTPE EDIILVTYIQ EHGPGNWRRAV **PTNTGLLRCS**
51 KSCRLRWTNY **LRPGIKRGNF** **TEHEEKMIVH** LQALLGNRWA **AIASYLPQRT**
101 DNDIKNYWNT HLKKKLNKVN **QDSHQELDRS** **SLSSSPSSSS** **ANSNSNISRG**
151 QWERRLQTDI **HLAKKALSEA** LSPAVAPIIT STVTTTSSSA **ESRRSTSSAS**
201 **GFLRTQETST** **TYASSTENIA** KLLKGWVKNS PKTQNSADQI **ASTEVKEVIK**
251 SDDGKECAGA FQSFSEFDHS YQQAGVSPDH ETKPDITGCC SNQSQWSLFE
301 KWLFEDSGGQ IGDILLDENT NFF

Bande C

1 MVRPPCCDKG GVKKGPWTPE EDIILVTYIQ EHGPGNWRRAV PTNTGLLRCS
51 KSCRLRWTNY LRPGIKRGNF **TEHEEKMIVH** LQALLGNRWA AIASYLPQRT
101 DNDIKNYWNT HLKKKLNKVN **QDSHQELDRS** **SLSSSPSSSS** **ANSNSNISRG**
151 QWERRLQTDI HLAKKALSEA LSPAVAPIIT STVTTTSSSA ESRRSTSSAS
201 GFLRTQETST TYASSTENIA KLLKGWVKNS PKTQNSADQI **ASTEVKEVIK**
251 SDDGKECAGA FQSFSEFDHS YQQAGVSPDH ETKPDITGCC SNQSQWSLFE
301 KWLFEDSGGQ IGDILLDENT NFF

Figure 37. Séquence protéique des peptides d'AtMYB30 identifiés par spectrométrie de masse, dans les bandes A, B et C.

Les peptides identifiés sont représentés en gras sur la séquence protéique totale d'AtMYB30. Les peptides soulignés ont été identifiés dans la bande C supposée non modifiée, mais n'ont pas été identifiés dans les bandes A et/ou B. Les lysines qu'ils contiennent, notées en rouge, pourraient donc être des cibles de MPT. C'est le cas des lysines K66, K113 et K232.

différents, suggère que les bandes supérieures (A et B) pourraient correspondre à des formes d'AtMYB30 portant une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, alors que la bande C correspondrait à une forme non modifiée de la protéine. Même si aucune modification post-traductionnelle d'AtMYB30 n'a pu être identifiée dans cette expérience, il est intéressant de noter que plusieurs peptides d'AtMYB30, identifiés dans la bande C, n'ont pas été identifiés dans les bandes A et B, supposées modifiées (Figure 37). C'est le cas des peptides contenant les lysines K66, K113, K228 et K232. La lysine K66 possède une forte probabilité de SUMOylation selon le logiciel SUMOplot, et des données obtenues dans l'équipe indiquent d'ailleurs que cette lysine possède un rôle majeur dans le fonctionnement d'AtMYB30. En effet, des expériences de transactivation ont montré que la mutation de la lysine K66 diminue fortement l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 (Canonne, J., données non publiées). D'autre part, la lysine K228 a été identifiée comme site mineur de SUMOylation d'AtMYB30 *in vitro* (Okada et al., 2009). L'analyse de l'effet de la mutation des lysines K113, K228 et K232 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 est en cours.

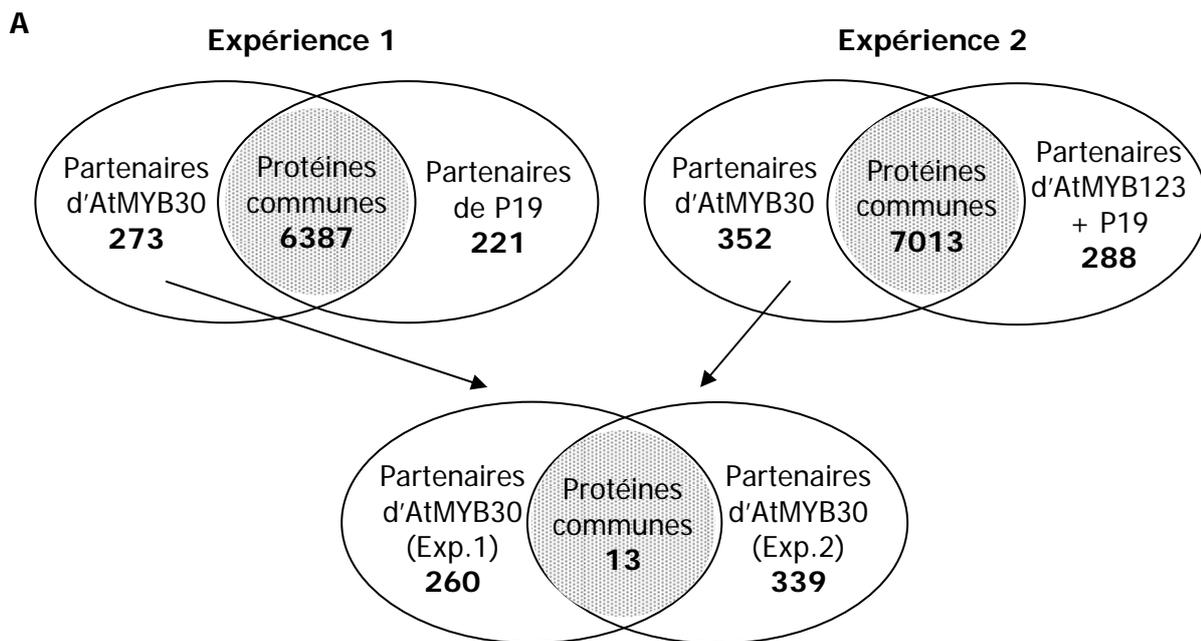
Ces résultats encourageants montrent donc qu'AtMYB30-3HA est identifiable par spectrométrie de masse après production chez *N. benthamiana* et purification. De plus, ces analyses suggèrent qu'AtMYB30 pourrait présenter une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, dont l'étude est actuellement en cours. Pour cela, les constructions contenant des versions mutantes d'AtMYB30 dans les lysines K66, K118, K228 et K232 ont été générées. Elles seront utilisées pour répéter cette expérience et tenter d'identifier si ces lysines sont des cibles de SUMOylation ou de toute autre MPT. Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse que l'absence d'identification de ces peptides soit simplement due à des raisons techniques.

Enfin, lors de cette expérience exploratoire, d'autres bandes détectées sur le gel pouvaient correspondre à d'éventuels interacteurs d'AtMYB30. Elles n'ont pas été analysées en raison du manque de contrôle permettant d'écarter les partenaires non spécifiques d'AtMYB30. Cette expérience a donc été répétée, en présence des contrôles adaptés, dans le but d'identifier les partenaires spécifiques d'AtMYB30.

III.3 Identification des interacteurs d'AtMYB30

Afin d'identifier les interacteurs d'AtMYB30 dans les conditions optimales décrites dans la partie Résultats III.2.2, il est nécessaire d'avoir des **contrôles internes** qui permettront d'éliminer les protéines aspécifiques : protéines immunoprécipitées de façon non spécifique, ou protéines dont l'expression est induite par le stress lié à l'expression transitoire chez *N. benthamiana*, par exemple. Afin de déterminer les vrais partenaires d'AtMYB30, deux contrôles indépendants ont été réalisés. Dans une première expérience, des plantes surexprimant uniquement l'inhibiteur de silencing P19 ont été utilisées comme contrôle, afin d'éliminer les protéines (i) liées à l'expression transitoire de P19 *via Agrobacterium*, et (ii) se fixant de manière non spécifique aux billes. Puis, afin d'éliminer les protéines induites par la surexpression d'un facteur de transcription de type MYB, des plantes surexprimant AtMYB123, un FT non impliqué dans les réponses de défense des plantes (Nesi et al., 2001), ont été utilisées comme contrôle dans une deuxième expérience. Voici donc les deux expériences réalisées (« essai » *versus* « contrôle ») :

- 1^{ère} expérience : (AtMYB30-3HA + P19) *versus* P19
- 2^{ème} expérience : (AtMYB30-3HA + P19) *versus* (AtMYB123-3HA + P19)



B

Gene	Tax	Description
LOC100273415	Zea mays	Phosphoglycerate kinase
AT4G32960	Arabidopsis thaliana	Fonction inconnue
AT5G42990	Arabidopsis thaliana	ubiquitin-conjugating enzyme E2 18 (UBC18)
	Zea mays	Protéine de liaison à l'ATP
	Vitis vinifera	Fonction inconnue
AT1G31190	Arabidopsis thaliana	IMPL1 (MYO-Inositol monophosphate like 1), chloroplastique
LOC100247342	Vitis vinifera	Fonction inconnue
rps15	Nicotiana glauca	30S ribosomal protein S15, chloroplastique
AT5G13200	Arabidopsis thaliana	GEM-like protein 5, protéine G
Os11g0529800	Oryza sativa Japonica	Chalcone et stilbene synthases
AT3G58140	Arabidopsis thaliana	Putative phenylalanine-tRNA synthetase
AT5G05850	Arabidopsis thaliana	PIRL1, domaine LRR intracellulaire
AT4G22300	Arabidopsis thaliana	SOBER1 (Suppressor of AvrBst-elicited resistance 1)

Figure 38. Protéines identifiées comme partenaires spécifiques d'AtMYB30, dans les deux expériences réalisées.

(A) Parmi les 273 partenaires spécifiques d'AtMYB30 identifiés dans l'expérience 1 et les 352 partenaires spécifiques d'AtMYB30 identifiés dans l'expérience 2, 13 protéines sont communes. **(B)** Liste des 13 partenaires spécifiques d'AtMYB30 communs entre les expériences 1 et 2.

Dans ces deux expériences, les protéines obtenues après immunoprécipitation sont soumises à une électrophorèse 1D. Les pistes « essai » et « contrôle » du gel ainsi obtenu sont découpées et toutes les protéines contenues dans chaque piste sont soumises à une digestion par la trypsine. Les peptides issus de cette digestion sont analysés par la technologie LC-MS/MS sur un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap. Les données sont ensuite filtrées et validées par le logiciel MFPAQ. La liste des peptides identifiés est ensuite introduite dans le moteur de recherche MASCOT pour identifier les protéines à partir de la base de données SGN (Solanaceae Genome Network) limitée aux contigs de Tabac et de Tomate ou la banque UNIPROT (SwissProt et TRembl) limitée aux plantes supérieures. Pour la banque SGN, à l'aide d'un outil disponible sur le site web (<http://sgn.cornell.edu/bulk/input.pl?mode=unigene>), les séquences protéiques sont ensuite alignées automatiquement avec le génome d'*Arabidopsis* pour déterminer les protéines homologues dans la banque TAIR. Les listes correspondantes ont été ensuite regroupées selon les critères définis dans le chapitre Matériel et Méthodes, et analysées par le logiciel de traitement de données protéomiques **Protein-Center**. On obtient finalement 3 listes pour chacune des 2 expériences : les groupes de protéines présentes uniquement en présence d'AtMYB30, celles uniquement dans les contrôles et celles communes aux 2 échantillons.

Parmi les protéines co-purifiant spécifiquement avec AtMYB30 dans la première expérience, 13 ont été également trouvées dans la deuxième expérience (Figure 38A). Parmi ces 13 protéines, plusieurs ont une fonction inconnue, ou ne possèdent pas d'homologue chez *Arabidopsis* (Figure 38B). Cependant, deux d'entre elles nous ont paru particulièrement intéressantes : une enzyme de conjugaison du l'ubiquitine (**UBC18**) et une caboxylestérase impliquée dans la défense (**SOBER1**). Le Tableau 4 présente une sélection, sur la base de leur fonction et de leur abondance, des protéines co-purifiant spécifiquement avec AtMYB30 parmi celles obtenues dans la première et/ou dans la deuxième expérience. Nous avons effectué une sélection en fonction de l'abondance car les protéines très abondantes, telles les protéines ribosomales, ont une forte probabilité d'être des contaminants plutôt que de vrais interacteurs (Graumann et al., 2004). De façon intéressante, les interacteurs putatifs d'AtMYB30 ont pu être regroupés selon 3 grands types de fonctions biologiques : le système ubiquitine-protéasome (UPS), le trafic membranaire et la défense (Tableau 4).

III.4 Conclusions, Discussion et Perspectives

III.4.1 Fonctions biologiques des partenaires putatifs identifiés

III.4.1.1 Protéines impliquées dans des processus cellulaires

Un certain nombre de partenaires putatifs d'AtMYB30 semble être impliqué dans la régulation de deux processus cellulaires majeurs : le système ubiquitine-protéasome (UPS) et le trafic membranaire *via* les protéines G.

Plusieurs partenaires putatifs d'AtMYB30 appartiennent à l'**UPS** : une sous-unité du protéasome et des enzymes de conjugaison (E2) impliquées dans la cascade d'ubiquitination (Tableau 4). Ceci pourrait suggérer qu'AtMYB30 serait ubiquitiné puis dirigé vers le protéasome. Cette hypothèse, en lien avec les résultats présentés dans le chapitre II, sera analysée dans la partie « Discussion générale ».

Tableau 4. Sélection des protéines co-purifiant spécifiquement avec AtMYB30.

A l'aide du logiciel Protein-Center, les partenaires putatifs d'AtMYB30 peuvent être regroupés en 3 fonctions biologiques majeures. Une croix dans les colonne « Exp. 1 » ou « Exp. 2 » indique que la protéine a été identifiée dans l'expérience 1 (avec le contrôle P19) ou l'expérience 2 (avec le contrôle AtMYB123 + P19).

Gene	Description	Exp. 1	Exp. 2
Système Ubiquitine-protéasome			
AT4G31300	Sous-unité du proteasome (beta type-6)	0	x
AT5G42990	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 18 (UBC18)	x	x
AT3G46460	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13 (UBC13)	0	x
AT1G63800	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 5 (UBC5)	0	x
Trafic membranaire			
AT5G03520	Protéine G (AtRABE1d/AtRab8C)	x	0
AT1G02130	Protéine G (AtRABD2a/AtRab1b)	x	0
AT5G03530	Protéine G (AtRABC2a/AtRAB ALPHA)	x	0
AT1G43890	Protéine G (AtRABC1/AtRAB18)	x	0
AT1G05810	Protéine G (AtRABA5e/AtRab11D)	x	0
AT5G58590	Ran Binding Protein 1c (AtRan-BP1c)	0	x
Défense			
AT4G22300	Carboxylestérase (SOBER1)	x	x
AT4G33430	BRI1-Associated Receptor Kinase (BAK1)	x	0

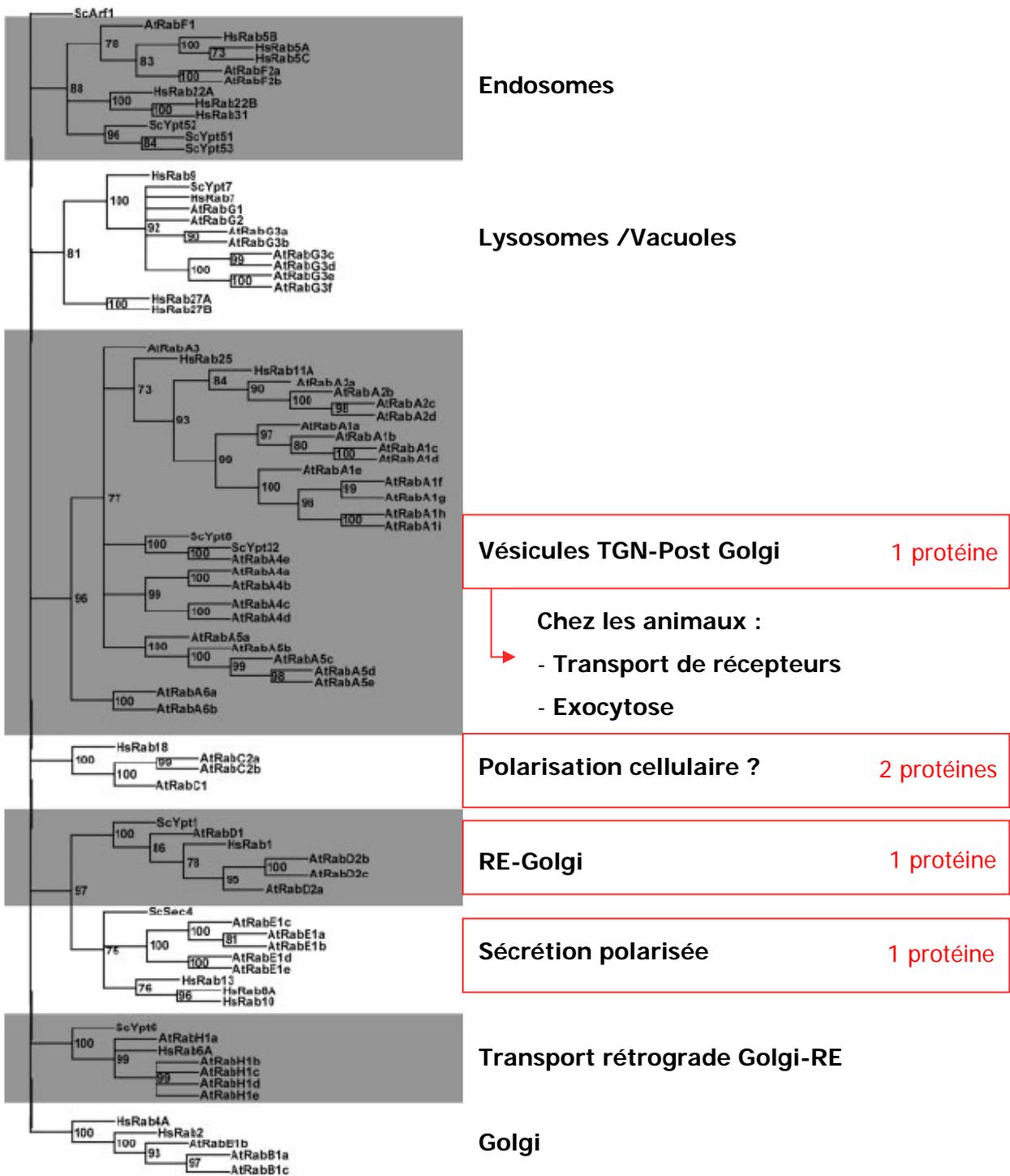


Figure 39. La famille des GTPases de type Rab chez Arabidopsis (d'après Vernoud et al., 2003).

Arbre phylogénétique des Rab GTPases d'Arabidopsis, incluant les séquences de certaines Rab GTPases de *S. cerevisiae* ou *H. sapiens*. La fonction précise des sous-familles dans le trafic cellulaire, déterminée pour plusieurs Rab de chaque sous-famille, est notée au milieu de la figure. Le nombre de protéines identifiées comme partenaires putatifs d'AtMYB30 est précisé en rouge pour chaque sous-famille, sur la droite de la figure. TGN, réseau trans-golgi ; RE, réticulum endoplasmique.

D'autre part, de nombreuses **petites protéines G**, impliquées dans le trafic membranaire, ont été identifiées comme des partenaires putatifs d'AtMYB30. Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui balancent entre une forme « active » et une forme « inactive », en fonction de la fixation et de l'hydrolyse de GTP. Le génome d'*Arabidopsis* contient 93 gènes codant des petites protéines G répartis en 4 grandes familles : Rab, Rho, Arf, et Ran (Kahn, 1992). Parmi les interacteurs putatifs d'AtMYB30, 5 protéines Rab et une protéine régulatrice de Ran GTPases (Ran-Binding Protein) ont été identifiées (Tableau 4). Les protéines Rab fonctionnent à différentes étapes du **trafic membranaire**, alors que les protéines Ran (Ras-related nuclear) régulent le transport des protéines au travers de l'enveloppe nucléaire. La fonction des protéines Rab dans le trafic cellulaire est présentée dans la figure 39. Chez les plantes, leur rôle précis n'a pas encore été identifié mais les protéines Rab de la sous-famille A (Vésicules TGN-Post Golgi) seraient impliquées dans l'acheminement des **composés pariétaux** vers la membrane plasmique (Vernoud et al., 2003). Sachant que l'épaississement de la paroi est une des réponses de défense des plantes face aux agents pathogènes, ce résultat suggère qu'AtMYB30 pourrait être impliqué dans la régulation de ce processus.

De façon intéressante, cette approche protéomique est validée par l'identification de la protéine régulatrice de Ran GTPases (Ran-BP1c), identifiée comme partenaire putatif d'AtMYB30, et précédemment identifiée au cours du crible double-hybride (voir Introduction IV.1.5). L'expression en orientation antisens du gène *AtRan-BP1c* chez *Arabidopsis* augmente la croissance des racines primaires mais supprime la croissance des racines latérales, celles-ci étant hypersensibles à l'auxine (Kim et al., 2001). AtRan-BP1c inhibe la libération de GTP fixé sur Ran et agit comme co-activateur d'une protéine activatrice de Ran-GTPases (RanGAP) (Kim and Roux, 2003). AtRan-BP1c aurait donc un rôle dans la **distribution des protéines nucléaires** responsables de la suppression de l'action de l'auxine dans les racines. L'auxine pouvant réguler les réponses de défense, un rôle d'AtMYB30 sur le contrôle du transport nucléaire *via* AtRan-BP1c pourrait être envisagé. Cependant, le mécanisme moléculaire conduisant à une interaction éventuelle entre AtRan-BP1c et AtMYB30 reste inconnu.

AtMYB30 interagirait donc avec des protéines impliquées dans différents processus cellulaires : le système ubiquitine-protéasome, le trafic membranaire et la distribution des protéines nucléaires. La validation de ces interactions *in planta* est indispensable afin de s'assurer qu'elles ont un sens biologique.

III.4.1.2 Protéines impliquées dans le contrôle de la résistance

III.4.1.2.1 BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase)

BAK1, identifié comme un interacteur putatif d'AtMYB30, est un récepteur de type LRR-RLK (Leucline-Rich Repeat Receptor-Like Kinase), connu pour son implication dans la perception et la transduction du signal lié aux brassinostéroïdes (BR) (Li et al., 2002). En parallèle, BAK1 a récemment été impliqué dans le contrôle des réponses de défense chez *Arabidopsis*. En effet, il a été montré que BAK1 est nécessaire à la mise en place des réponses de défense induites par la flagelline, *via* son interaction avec le récepteur FLS2, dans les 2 minutes suivant un traitement par la flagelline (Heese et al., 2007) (Figure 40A). BAK1 possède donc un rôle dans

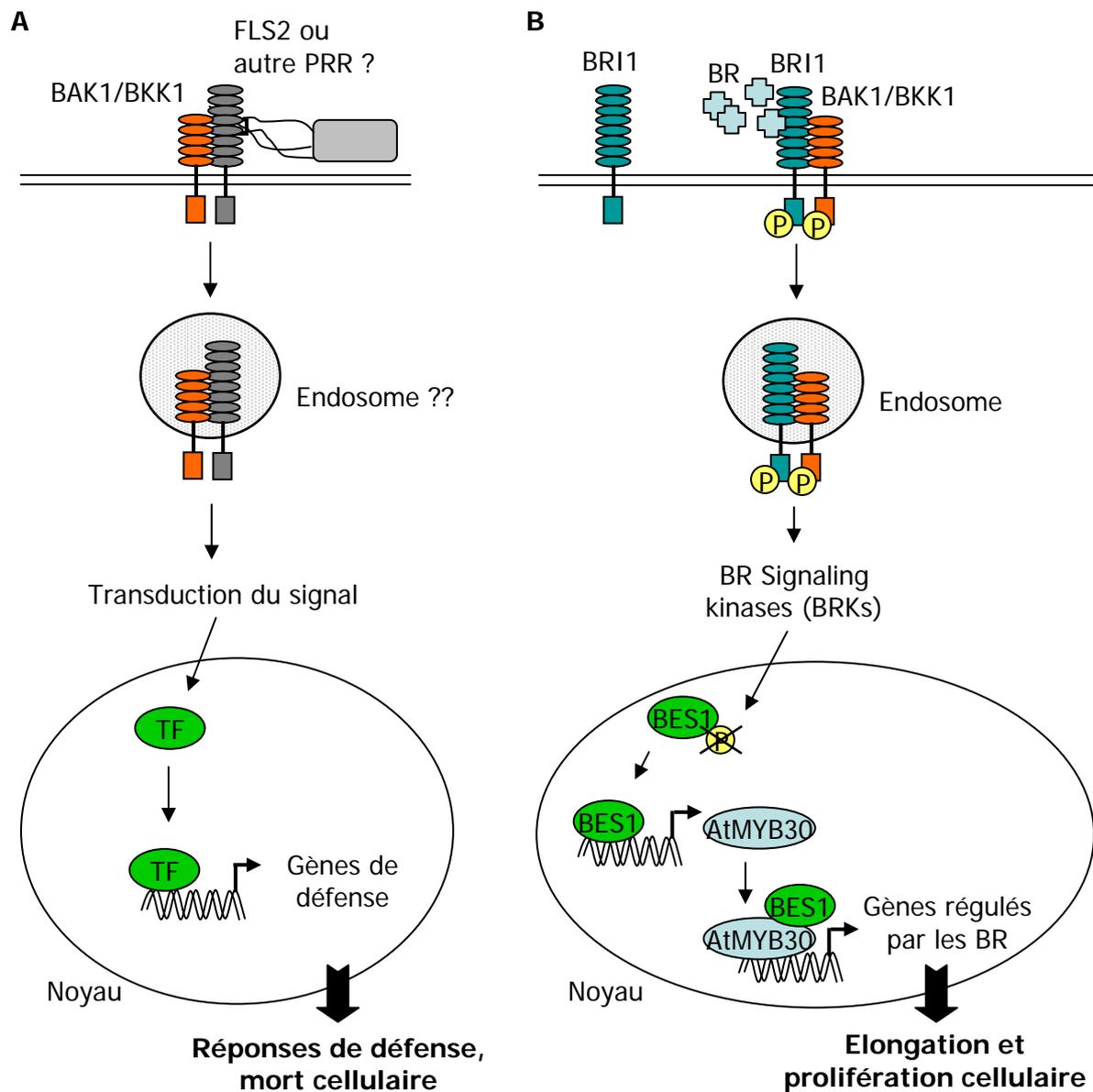


Figure 40. Modèle des voies de signalisation impliquant BAK1 et son proche homologue BKK, chez Arabidopsis.

(A) BAK1 est impliqué dans une voie de signalisation BR-indépendante de régulation des réponses de défense. BAK1 interagit avec FLS2 et est nécessaire à la mise en place des réponses de défense liées à la perception de la flagelline par FLS2 (Heese et al., 2007). **(B)** BAK1 régule une voie de signalisation BR-dépendante qui active l'élongation et la prolifération cellulaire (Li et al., 2002 ; Oh et al., 2009 ; Russinova et al., 2004). La perception des BR par BRI1 induit la phosphorylation et l'endocytose de BRI1 et BAK1. Ces 2 récepteurs interagissent alors dans des endosomes et activent des kinases BRKs. Une cascade de phosphorylation/déphosphorylation aboutit à la déphosphorylation de BES1, ce qui lui permet d'activer ses gènes cibles. Parmi eux, *AtMYB30*, dont l'expression est induite (Li et al., 2009). *AtMYB30* interagit avec BES1 et active alors des gènes BR-dépendants.

l'immunité induite par les PAMPs. D'autre part, l'expression de *BAK1* est induite en réponse à une inoculation par la souche avirulente *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*), mais diminuée en réponse à la souche virulente *Pst* DC3000 (Kemmerling et al., 2007). Le phénotype du mutant *bak1* est subtil, mais il présente une extension des lésions nécrotiques et une augmentation de la sensibilité après une infection par un agent pathogène nécrotrophe, *Alternaria brassicicola* (Kemmerling et al., 2007). Ce phénotype subtil peut s'expliquer par le fait que BAK1 fonctionne de façon redondante avec BKK1 (BAK1-LIKE 1), un de ses plus proches homologues (He et al., 2007). En effet, le phénotype du double mutant *bak1/bkk1* est beaucoup plus fort que le phénotype des mutants individuels et montre une expression constitutive des gènes de défense, une augmentation des dépôts de callose, de la production des ROS et une mort cellulaire spontanée (He et al., 2007). BAK1 et BKK1 réguleraient donc négativement, de façon BR-indépendante, les réponses de défense et la mort cellulaire en dehors de toute interaction avec un agent pathogène. Les voies de signalisation impliquant BAK1 dans le contrôle des réponses de défense sont encore très mal connues, et il est donc difficile de placer l'interaction putative entre AtMYB30 et BAK1 dans ce contexte.

De façon très intéressante, AtMYB30 est associé au contrôle des réponses de défense et à la transduction d'un signal BR induisant l'élongation et la prolifération cellulaire. Les BR sont d'abord perçus par le récepteur-kinase BRI1 (BRassinosteroid Insensitive1) dont le domaine kinase s'active, ce qui provoque son association avec BAK1 et induit l'autophosphorylation de ces deux récepteurs (Li et al., 2002; Oh et al., 2009). Le complexe BAK1-BRI1 est alors soumis à une endocytose dont la fonction est inconnue à ce jour (Rusinova et al., 2004). Le signal BR est alors transduit jusqu'au noyau où il induit la déphosphorylation de plusieurs FT dont BES1. Il a été montré récemment que (i) l'expression d'*AtMYB30* est induite par un traitement BR, (ii) *AtMYB30* est une cible directe de BES1 et (iii) AtMYB30 et BES1 interagissent *in vivo* (Li et al., 2009). *AtMYB30*, en tant que cible directe de BES1, agirait pour amplifier le signal BR en aidant BES1 à activer ses cibles (Figure 40B). BES1 étant localisé dans le noyau mais également dans le cytoplasme des cellules végétales (Rusinova et al., 2004), on pourrait envisager que le complexe BES1-AtMYB30 puisse sortir du noyau et permettre alors à AtMYB30 d'interagir avec la partie cytoplasmique de BAK1. A l'inverse, il est possible que BAK1 entre dans le noyau après son endocytose. De façon très encourageante, des résultats préliminaires, obtenus dans l'équipe, montrent que BAK1 serait relocalisé vers le noyau en présence d'AtMYB30, après expression transitoire chez *N. benthamiana*. Ce résultat suggère donc que ces deux protéines pourraient interagir au sein du noyau. Cette interaction entre AtMYB30 et BAK1 pourrait permettre, par exemple, la mise en place d'une boucle de rétro-contrôle négatif de cette voie.

L'identification d'une interaction putative entre BAK1 et AtMYB30 ouvre donc d'importantes perspectives de recherche visant à mieux comprendre la fonction duale de ces deux protéines dans la transduction du signal BR et dans le contrôle de la résistance.

III.4.1.2.2 SOBER1 (Suppressor Of avrBst-Elicited Resistance)

SOBER1 a été identifié lors de l'interaction entre *Arabidopsis* et *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) exprimant le gène d'avirulence *AvrBst* (Cunnac et al., 2007). Chez l'écotype Pi-0 d'*Arabidopsis*, résistant à *Xcv* exprimant *AvrBst*, une mutation récessive qui inactive une hydrolase conservée, SOBER1 (Suppressor Of avrBst-Elicited Resistance1), a été mise en évidence. Chez l'écotype Col-0, cette hydrolase inhibe les mécanismes de résistance déclenchés

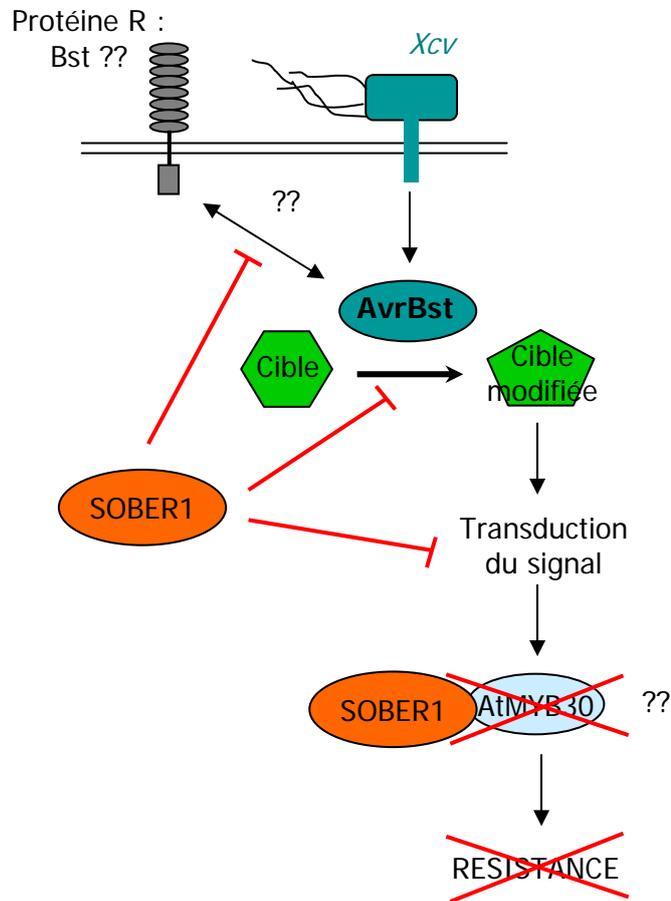


Figure 41. Modèle de fonctionnement de SOBER1 dans l'inhibition de la résistance face à *Xcv* (*AvrBst*) chez *Arabidopsis*.

L'injection d'*AvrBst* par *Xcv*, dans le cytoplasme de la cellule hôte, pourrait être reconnue directement ou non par une protéine de résistance encore inconnue. Cette reconnaissance permettrait une transduction du signal faisant intervenir *AtMYB30*, par exemple, et menant à la résistance. Chez l'écotype Col-0, SOBER1 pourrait inhiber 3 étapes différentes : l'éventuelle reconnaissance d'*AvrBst* par une protéine R, la modification d'une cible végétale par *AvrBst* ou plus en aval, les mécanismes de transduction du signal. Ceci ayant pour conséquence le développement de la maladie.

par AvrBst et conduit à la maladie. Récemment, il a été montré que SOBER1 possède une activité enzymatique de type phospholipase A₂ (Kirik and Mudgett, 2009). SOBER1 supprimerait la production d'acide phosphatidique, *via* les phospholipases de type D, en réponse à la perception d'AvrBst.

De façon intéressante, SOBER1 possède une fonction biochimique similaire à celle d'*AtSPLA₂-α*, dont l'interaction avec AtMYB30 a été validée *in planta*. L'interaction entre AtMYB30 et SOBER1 constitue donc le deuxième exemple d'interaction entre AtMYB30 et une protéine possédant une activité de type phospholipase. SOBER1 pourrait diminuer la résistance en inhibant trois événements distincts : l'éventuelle reconnaissance d'AvrBst par une protéine R encore inconnue, la modification d'une cible végétale par AvrBst, ou plus en aval, les mécanismes de transduction du signal (Figure 41). L'interaction putative entre SOBER1 et AtMYB30 pourrait ainsi contribuer, en diminuant l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30, à réduire la transduction du signal menant à la résistance.

L'interaction putative entre SOBER1 et AtMYB30 pourrait fournir un nouvel élément de compréhension des mécanismes de régulation de la résistance face à *Xanthomonas*.

III.4.2 Avantages et inconvénients de cette approche, Perspectives

Actuellement, deux approches majeures permettent de révéler, sans *a priori*, les interacteurs d'une protéine donnée : le **système double-hybride** et l'immunoprécipitation combinée à la spectrométrie de masse. Un crible double-hybride chez la Levure ayant déjà été réalisé dans le but d'identifier les interacteurs d'AtMYB30 (voir Introduction IV.1.5), une approche protéomique, dont les avantages face au crible double-hybride seront développés par la suite, a été menée afin (i) de confirmer les interacteurs identifiés lors du crible double-hybride et (ii) d'identifier d'autres interacteurs d'AtMYB30. L'**approche protéomique** utilisée ici présente l'avantage de mettre en jeu des protéines produites par la plante, permettant ainsi de se rapprocher du contexte biologique étudié. En effet, certaines interactions protéiques nécessitent la présence de modifications post-traductionnelles ou de cofacteurs présents chez les plantes. Lors d'un crible double-hybride chez la Levure, ces modifications ne sont pas forcément présentes et peuvent donc conduire à l'apparition de faux-négatifs. Par ailleurs, les interactions protéine-protéine s'intègrent parfois dans des complexes multi-protéiques dont la formation nécessite la présence de tous les protagonistes. L'approche protéomique permet de révéler les différents partenaires de ces complexes, contrairement au système double-hybride qui ne mesure que les interactions binaires directes (Rigaut et al., 1999). Enfin, la production d'AtMYB30 *in planta* devra être réalisée, dans le futur, dans différentes conditions biologiques : en conditions d'interaction avec un agent pathogène virulent ou avirulent, par exemple. Ceci permettrait de se rapprocher au plus près du système biologique étudié en identifiant les partenaires spécifiques d'AtMYB30 dans ces différentes conditions biologiques. L'approche protéomique semble donc présenter de nombreux avantages, en particulier par rapport à un crible double-hybride.

Cependant, le protocole expérimental développé ici pour cette approche protéomique présente également des **inconvénients**. En effet, l'identification de nombreuses protéines interagissant de manière non spécifique ou, au contraire, l'absence d'identification de vrais interacteurs, sont des événements fréquents dans cette méthode. Plusieurs causes sont à l'origine de ces problèmes :

- Pour la réalisation de l'extrait protéique, tous les **compartiments cellulaires** sont mis en contact. AtMYB30 étant une protéine nucléaire, on ne s'attend pas, *a priori*, à ce qu'elle interagisse avec des protéines localisées dans d'autres compartiments cellulaires. Cependant, il est possible que des interactions se mettent en place entre AtMYB30 et des protéines non nucléaires qui n'auraient pas pu être physiquement en contact avec AtMYB30 dans un contexte biologique normal. Afin de contourner ce problème, ces interactions seront **validées par la technique de FLIM**, permettant l'étude des interactions protéines-protéines dans des cellules vivantes et intactes. De plus, la quantité élevée de protéines non nucléaires dans l'extrait protéique augmente la complexité du mélange et donc le risque de leur purification non spécifique. Tout cela aboutit donc à la formation de faux-positifs. D'autre part, la complexité du mélange liée à la présence de protéines non nucléaires peut gêner ou empêcher l'identification de vrais interacteurs. Une solution efficace pour résoudre ce problème peut consister à **purifier les noyaux** avant d'effectuer l'immunoprécipitation. La mise au point du protocole est actuellement en cours dans l'équipe.
- Le fait de **surexprimer AtMYB30 à un niveau élevé non physiologique** peut engendrer, dans la plante, des réponses de stress différentes de celles observées lors d'une interaction incompatible où AtMYB30 est exprimé plus faiblement. Cela peut provoquer la purification non spécifique de protéines détectables dans la piste « essai » et non dans la piste « contrôle ». Elles constituent une source supplémentaire d'interacteurs non spécifiques. D'autre part, contrairement à AtMYB30 lui-même, il est très peu probable que les partenaires protéiques d'AtMYB30 soient surexprimés dans la cellule végétale. Cela pourrait donc favoriser la purification de formes non complexées d'AtMYB30 et augmenter les faux-négatifs. Cette surexpression d'AtMYB30, indispensable à son identification, est cependant défavorable pour garder la stœchiométrie avec ses partenaires.
- Enfin, les problèmes rencontrés pour produire AtMYB30 à un niveau suffisant pour la détecter par spectrométrie de masse nous ont amenés à utiliser le **système hétérologue *N. benthamiana***, au lieu d'*Arabidopsis* (voir Résultats III.2). L'inconvénient majeur vient du fait que les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse correspondent à des EST de Tomate et de Tabac, qui doivent être alignées avec les séquences protéiques d'*Arabidopsis*. Les homologues n'étant pas toujours très fortes, ceci diminue la capacité d'identification. Afin de contourner ce problème, et étant donné le niveau faible d'expression d'AtMYB30 dans les lignées *P35S::AtMYB30-TAP*, la génération de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant AtMYB30 sous le **contrôle d'un promoteur fort inductible** est en cours.

Probablement en lien avec les problèmes ci-dessus, il a été observé que la **reproductibilité** entre expériences indépendantes identiques était faible. En effet, peu d'interacteurs communs ont pu être identifiés à partir de 2 expériences indépendantes chez la Levure en utilisant une approche double-hybride (Uetz et al., 2000; Ito et al., 2001b) ou une approche protéomique (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002). De plus, très peu d'interacteurs sont sortis simultanément de ces deux approches. Dans le cadre de la recherche des partenaires d'AtMYB30, on observe une reproductibilité faible entre les 2 expériences protéomiques, avec 13 protéines communes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les deux expériences réalisées ne sont pas identiques, car elles ne possèdent pas le même contrôle. Par ailleurs, une protéine (AtRan-BP1c) est sortie simultanément du crible double-hybride et d'une expérience protéomique, validant ainsi cette dernière approche.

En conclusion, il ne semble pas exister de méthode idéale pour rechercher sans *a priori*, les interacteurs d'une protéine donnée. Il est donc nécessaire d'utiliser différentes approches en parallèle (crible double-hybride et immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, par exemple). L'existence et le sens biologique des interactions mises en évidence par ces techniques doivent donc impérativement être **validés *in vivo*** par d'autres approches : co-immunoprécipitation, FLIM ou BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation), par exemple. La technique de FLIM sera d'ailleurs utilisée pour valider l'interaction *in planta* entre AtMYB30 et trois interacteurs putatifs d'intérêt majeur : AtRan-BP1c, BAK1 et SOBER1. De plus, l'effet de ces trois protéines sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 sera étudié. Enfin, des approches génétiques consistant à étudier le phénotype des plantes résultant du croisement entre la lignée *P35S::AtMYB30-TAP* et les mutants *Atran-bp1c*, *bak1* et *sober1* ont été mises en place.

Toutes ces expériences permettent donc d'ouvrir de nombreuses perspectives sur la compréhension du fonctionnement d'AtMYB30, *via* l'identification de nouveaux partenaires protéiques et l'étude de ses modifications post-traductionnelles.

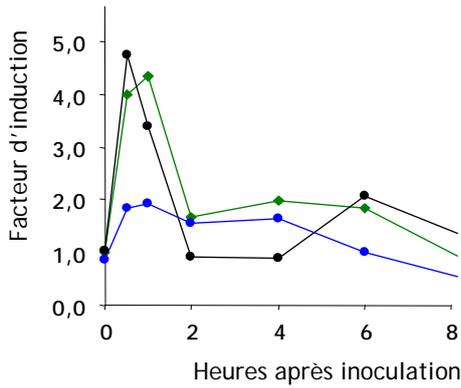


Figure 42. Profil d'expression d'*AtMYB96* en réponse à l'inoculation par *Xcc147* (Raffaële, 2006).

Profil représentatif des profils obtenus au cours de 4 répétitions biologiques, dans les plantes sauvages Col-0 (—◆—), *AtMYB30ko* (—●—) et *AtMYB30as* (—●—).

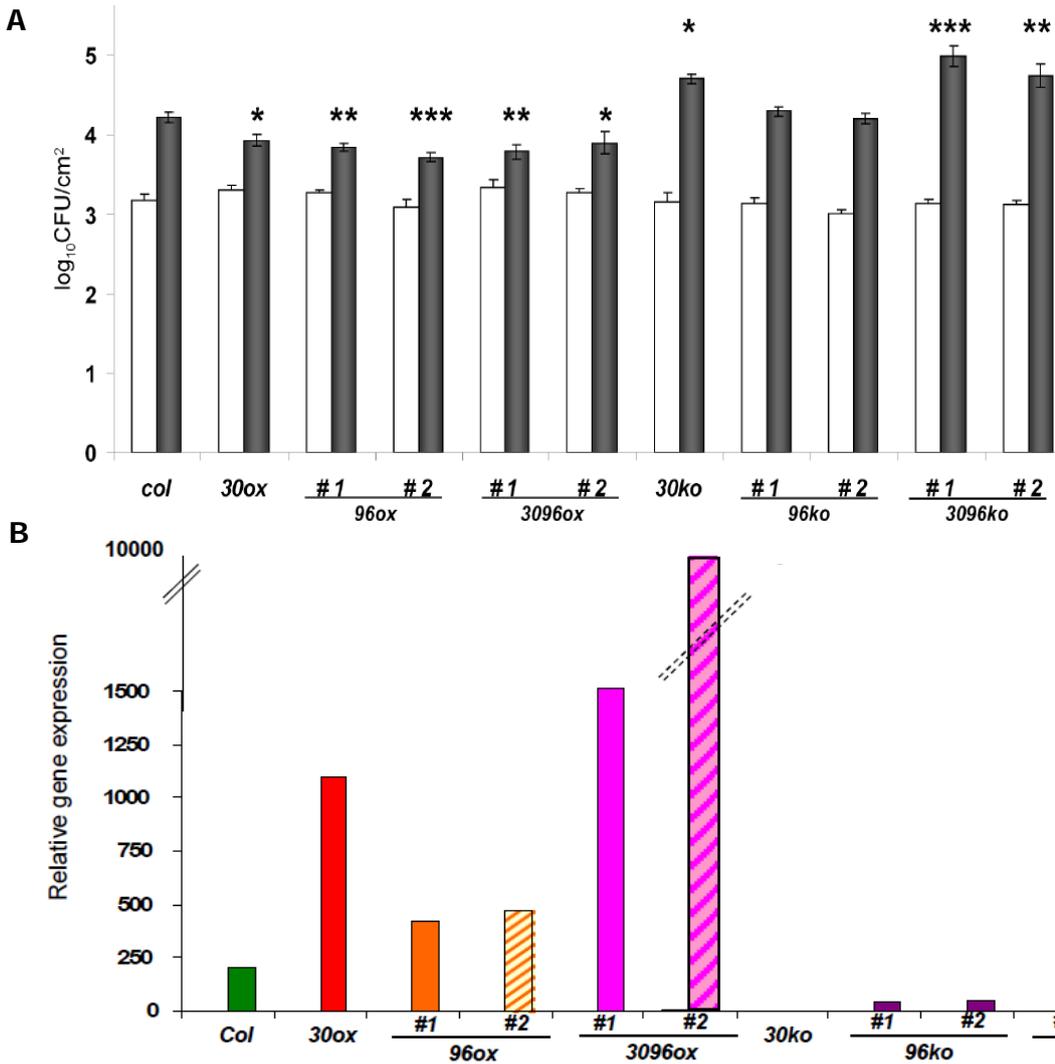


Figure 43. Phénotype des différentes lignées dérégulées pour l'expression d'*AtMYB30* et/ou *AtMYB96*, après inoculation avec des souches avirulentes de *Pst* DC3000 (Léger A.).

(A) Mesure de la croissance bactérienne *in planta* de *Pst* DC3000 (*AvrPphB*) après inoculation à 5×10^5 Cfu/mL. Résultats représentatifs de 3 répétitions biologiques comprenant 6 plantes individuelles chacune. Les étoiles représentent une différence significative par rapport au sauvage Col-0, d'après le test de Student (p -value < 0.05). (B) Expression du gène de défense *PR1* à 24hpi, après inoculation avec *Pst* DC3000 (*AvrRpm1*) à 5×10^7 Cfu/mL. Résultats représentatifs d'une expérience biologique parmi 5 expériences indépendantes.

30ox, *AtMYB30ox*; 96ox, *AtMYB96ox*; 3096ox, *AtMYB30ox/96ox*; 30ko, *AtMYB30ko*; 96ko, *AtMYB96ko*; 3096ko, *AtMYB30ko/96ko*.

IV. Résultats complémentaires : étude de l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96

IV.1 Contexte scientifique et objectif global

L'identification d'AtMYB96 à été réalisée dans le cadre de l'analyse du **phénotype de la lignée mutante *AtMYB30ko***, où l'insertion d'un ADN-T altère fortement l'expression d'*AtMYB30* (Raffaële, 2006). En effet, des observations visuelles de mise en place de la HR et des mesures du taux de mort cellulaire, ont montré qu'*AtMYB30ko* possède un phénotype intermédiaire entre les lignées sauvage et *AtMYB30as*. Ces données pourraient s'expliquer par le fait que l'expression d'un (ou de plusieurs) autre(s) gène(s), soit affectée dans la lignée *AtMYB30as*. L'analyse de l'expression de tous les gènes R2R3-MYB induits précocement au cours de l'interaction avec *Xcc147*, et aussi des gènes appartenant à la même sous-famille qu'*AtMYB30*, a donc été réalisée par transcriptomique. Il est apparu que, parmi les gènes MYB étudiés, seul le gène *AtMYB96* présente un pic d'induction (i) concomitant à celui d'*AtMYB30* dans les plantes sauvages et *AtMYB30ko*, (ii) aboli chez *AtMYB30as* (Figure 42). L'ARN antisens d'*AtMYB30* réprime donc également l'expression d'*AtMYB96* dans les plantes *AtMYB30as*. Ceci pourrait permettre d'expliquer le phénotype de la lignée *AtMYB30as*, dont la HR est plus fortement altérée que chez la lignée *AtMYB30ko*.

Afin de comprendre le rôle d'AtMYB96 dans la régulation de la HR, ainsi que la nature de sa coopération avec AtMYB30, des lignées transgéniques d'*Arabidopsis AtMYB96ko*, *AtMYB96ox*, *AtMYB30ox/96ox* et *AtMYB30ko/96ko* ont été générées (Léger A., Raffaële S., données non publiées). Leur phénotype de mise en place de la HR et de la résistance après inoculation par un agent pathogène bactérien a été étudié. La Figure 43A montre que les lignées *AtMYB96ox* possèdent un phénotype de résistance accrue après une inoculation bactérienne, comparable à celui de la lignée *AtMYB30ox*. De plus, l'accumulation du gène de défense *PR1* est plus élevée dans les lignées *AtMYB96ox* que dans la lignée sauvage Col-0 (Figure 43B). Le phénotype inverse est observé pour les lignées *AtMYB96ko*. Ces résultats sont en corrélation avec les phénotypes de mise en place de la HR observés chez les lignées *AtMYB96ox* et *AtMYB96ko*. Ces données suggèrent que, tout comme AtMYB30, **AtMYB96 possède un rôle de régulateur positif de la HR et de la résistance**. Afin de connaître la nature de la coopération entre AtMYB30 et AtMYB96, le phénotype des lignées *AtMYB30ox/96ox* et *AtMYB30ko/96ko* a été étudié. Il apparaît que les lignées *AtMYB30ox/96ox* présentent une accélération de la HR plus marquée que les simples surexprimeurs, ainsi qu'une résistance accrue (Figure 43A). A l'inverse, les lignées *AtMYB30ko/96ko* montrent un phénotype de HR retardée plus fort que celui des simples mutants et une diminution de la résistance (Figure 43A). De plus, l'expression du gène marqueur de défense *PR1* est plus élevée dans les lignées *AtMYB30/96ox* que dans les simples surexprimeurs (Figure 43B). Ces données suggèrent donc qu'**AtMYB30 et AtMYB96 collaborent positivement pour réguler la HR et la défense**.

Ma participation à ce projet a consisté à étudier une éventuelle interaction entre AtMYB30 et AtMYB96. Pour cela, leur co-localisation subcellulaire a d'abord été étudiée, puis leur interaction a été analysée par deux approches distinctes.

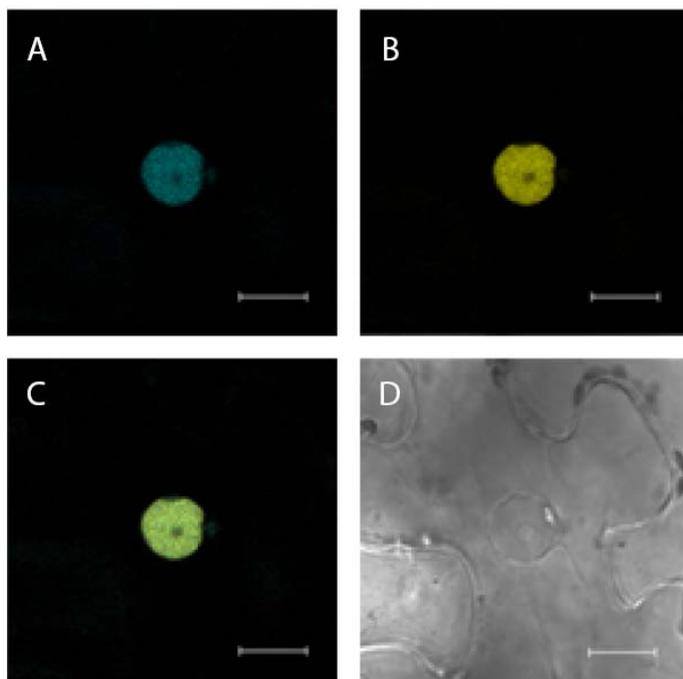


Figure 44. AtMYB30-CFP et AtMYB96-YFP sont co-localisés dans le noyau.

Images confocales de cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana*, 36 h après co-expression transitoire via *Agrobacterium* des constructions *P35S:AtMYB30-CFP* (A) et *P35S: AtMYB96-YFPv* (B). La co-localisation d'AtMYB30-CFP et AtMYB96-YFP est montrée par la superposition des images A et B (C). L'image correspondante en champ clair est présentée (D). Barres = 15 μm.

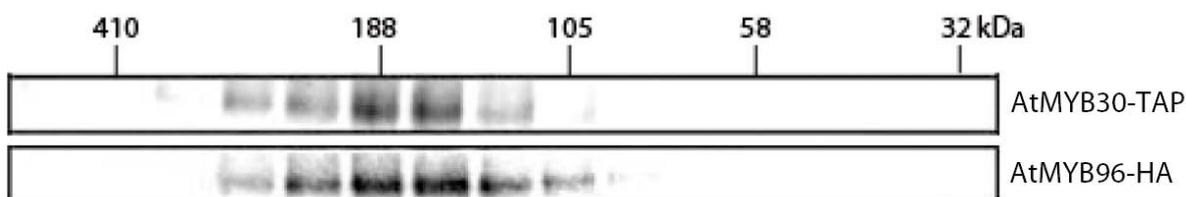


Figure 45. Analyse d'AtMYB30-TAP et AtMYB96-HA par chromatographie d'exclusion stérique.

Les protéines solubles extraites des feuilles de *N. benthamiana* exprimant transitoirement AtMYB30-TAP et AtMYB96-HA ont été soumises à une chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 200 10/30. Les fractions individuelles ont été collectées et analysées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-TAP (en haut) ou anti-HA (en bas). Le poids moléculaire (kDa) estimé pour chaque fraction est indiqué au dessus.

Tableau 5. Données FLIM montrant l'interaction spécifique entre AtMYB30 et AtMYB96 dans les noyaux des cellules de *N. benthamiana*.

Donneur	Accepteur	Durée de vie ^(a)	SD ^(b)	N ^(c)	E ^(d)	p-value ^(e)
AtMYB30-CFP	-	2,303	0,032	52	-	-
AtMYB30-CFP	AtMYB96-YFPv	2,032	0,032	43	11,7	5,0 x 10 ⁻⁸
AtMYB30-CFP	AtMYB123-YFPv	2,272	0,041	30	-	0,55

^a Durée de vie moyenne en nanosecondes

^b Standard déviation

^c Nombre total de noyaux mesurés

^d Pourcentage d'efficacité de FRET ($E = 1 - tDA/tD$), calculé en comparant la durée de vie du donneur, en présence de l'accepteur (tDA) ou non (tD)

^e p-value de la différence entre la durée de vie du donneur, en présence de l'accepteur ou non (t-test)

IV.2 AtMYB96 et AtMYB30 sont co-localisés dans le noyau des cellules végétales

AtMYB30, fusionné à la CFP, présente une localisation nucléaire après expression transitoire chez *N. benthamiana* (Figure 44A) et *Arabidopsis* (Froidure et al., 2010, submitted). La localisation subcellulaire d'AtMYB96 a été étudiée, après expression transitoire de la construction *P35S:AtMYB96-YFP* chez *N. benthamiana*. Comme attendu pour un facteur de transcription de type MYB, AtMYB96 est localisé dans le noyau des cellules végétales (Figure 44B). Ce résultat est en accord avec la localisation nucléaire d'AtMYB96 exprimé transitoirement dans des cellules d'Oignon (Seo et al., 2009). AtMYB30-CFP et AtMYB96-YFP sont donc co-localisés dans le noyau (Figure 44C), rendant possible leur interaction physique dans ce compartiment cellulaire.

IV.3 AtMYB96 et AtMYB30 interagissent *in planta*

Afin, d'initier l'étude de l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96, des extraits protéiques contenant AtMYB30 étiqueté avec le TAP tag (AtMYB30-TAP) et AtMYB96 étiqueté HA (AtMYB96-HA) ont été soumis à une chromatographie d'exclusion stérique. Cette technique est utilisée pour séparer les protéines présentes dans un mélange complexe en fonction de leur forme et de leur taille. Elle permet donc de collecter, dans une même fraction, les protéines faisant partie d'un même complexe protéique. Afin de détecter la présence d'AtMYB30 et AtMYB96, les fractions collectées ont été analysées par Western Blot (Figure 45). Des profils d'élution identiques ont été obtenus pour ces deux facteurs de transcription. La masse estimée d'AtMYB30 et AtMYB96 dans les fractions récoltées varie entre 127 et 228 kDa, avec un pic à 170kDa (Figure 45). Cette valeur est plus élevée que celle attendue pour les formes monomériques d'AtMYB30-TAP (56 kDa) ou AtMYB96-HA (40 kDa). De plus, cette valeur est également supérieure à la somme des poids moléculaires des formes monomériques d'AtMYB30 et AtMYB96 (96 kDa). Ceci suggère que ces deux protéines font partie d'un complexe multi-protéique dans les cellules végétales. Le même profil d'élution est observé quand AtMYB30-TAP et AtMYB96-HA sont co-exprimés chez *N. benthamiana*, ce qui laisse penser qu'AtMYB30 et AtMYB96 seraient capables de former un complexe avec les homologues de leurs partenaires d'*Arabidopsis*, chez *N. benthamiana*. Ces données renforcent donc l'hypothèse d'une éventuelle interaction entre AtMYB30 et AtMYB96.

L'interaction physique entre AtMYB30 et AtMYB96 a été étudiée par la technique quantitative non invasive FLIM qui mesure le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) entre la CFP (donneur) et la YFPv (accepteur), fusionnée à AtMYB30 et AtMYB96, respectivement. Si les deux protéines interagissent, le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur diminue la durée de vie du donneur. La différence relative de durée de vie, en présence de l'accepteur ou non, est une mesure de l'efficacité du FRET (Tableau 5). Dans les noyaux exprimant AtMYB30-CFP, la durée de vie moyenne de la CFP est de $2,303 \pm 0,032$ ns (moyenne \pm SD). Une réduction significative de la durée de vie de la CFP ($2,032 \pm 0,032$ ns) a pu être observée dans les noyaux co-exprimant AtMYB30-CFP et AtMYB96-YFPv (Tableau 5), montrant qu'AtMYB96 est capable d'interagir avec AtMYB30 au sein du noyau. Aucune interaction n'a pu être mise en évidence entre AtMYB30-CFP et le facteur MYB nucléaire AtMYB123-YFPv (Nesi et al., 2001), avec une durée de vie de la CFP de $2,272 \pm 0,041$ ns, qui n'est pas significativement différente de celle obtenue pour AtMYB30-CFP exprimé seul. Ces résultats montrent que la réduction de la durée de vie d'AtMYB30-CFP, en présence d'AtMYB96-YFP, n'est pas due à un transfert non

spécifique d'énergie entre les deux fluorophores. L'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 est donc bien spécifique.

Ces données fournissent les preuves d'une interaction physique spécifique entre AtMYB30 et AtMYB96 dans le noyau des cellules végétales.

IV.4 Conclusion et perspectives

L'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96, ainsi que les phénotypes des lignées transgéniques dérégulées dans l'expression de ces deux facteurs de transcription, montrent qu'ils **coopèrent positivement pour réguler la HR**. L'action combinée de plusieurs FT de type MYB dans la régulation de certains processus biologiques a été largement mise en évidence chez les plantes. En effet, on peut citer l'exemple de MYB28 et MYB29 qui régulent positivement la biosynthèse des glucosinolates (Hirai et al., 2007), de MYB58 et MYB63 impliqués dans la biosynthèse de la lignine (Zhou et al., 2009), de CCA1 et LHY qui régulent les rythmes circadiens (Daniel et al., 2004), ou de MYB21, MYB24 et MYB108 qui régulent la maturation des étamines (Mandaokar and Browse, 2009). Dans le cas de MYB21, MYB24 et MYB108, leur coopération est séquentielle, l'expression de MYB21 allant activer celle de MYB24, puis MYB24 allant activer l'expression de MYB108. Cette cascade transcriptionnelle permet d'amplifier le signal d'activation des gènes cibles car ces trois FT pourront activer plus de cibles que MYB21 seul. Aucune interaction physique n'a été mise en évidence entre ces différents MYB impliqués dans la régulation d'un même processus biologique, sauf pour CCA1 et LHY, qui constituent à ce jour le seul exemple d'interaction entre deux MYB végétaux (Daniel et al., 2004). CCA1 et LHY étant des MYB de type MYB-R1, nos résultats concernant l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 constituent donc le **premier exemple d'interaction entre deux MYB-R2R3** chez les plantes.

Dans le cas d'AtMYB30 et AtMYB96, on peut envisager que ces deux protéines coopèrent en se fixant ensemble sur des promoteurs cibles communs, modifiant alors le niveau d'expression en comparaison avec leur fixation individuelle. AtMYB30 et AtMYB96 pourraient avoir certaines cibles communes, co-régulées par ces deux FT, mais également d'autres cibles, spécifiques de l'un ou l'autre (travaux en cours dans l'équipe). Cette notion de cibles spécifiques de chacun de ces FT est soutenue par le fait qu'*AtMYB96* a été récemment impliqué dans la régulation de la réponse au stress hydrique (Seo et al., 2009). Or, à ce jour, aucune donnée ne montre qu'*AtMYB30* serait impliqué dans la régulation de ce processus. Par ailleurs, on peut supposer que l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 modifie leur capacité de fixation à l'ADN et donc leur activité transcriptionnelle. Afin d'obtenir une meilleure compréhension de ces mécanismes, il serait intéressant d'étudier si l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 s'effectue au niveau de l'ADN ou de façon libre dans le noyau, *via* des expériences de CHIP par exemple.

La coopération positive entre AtMYB30 et AtMYB96 pour la régulation de la HR et de la défense pourrait donc s'expliquer par leur interaction physique *in planta*. Cependant, on ne peut exclure que cette coopération soit due à un effet activateur ou répresseur d'AtMYB30 sur l'expression *AtMYB96*, ou vice-versa. En effet, des données préliminaires sur l'étude de l'expression d'*AtMYB96* dans les lignées dérégulées pour l'expression d'*AtMYB30*, au cours d'une interaction incompatible, suggèrent qu'AtMYB30 active l'expression d'*AtMYB96* (Léger A., données non publiées). A l'inverse, l'expression d'*AtMYB30* est augmentée dans les lignées *AtMYB96ko* et diminuée dans les lignées *AtMYB96ox*, suggérant un rôle répresseur d'AtMYB96

sur l'expression d'*AtMYB30*. *AtMYB96* serait donc impliqué dans une boucle de rétro-contrôle négatif de l'expression d'*AtMYB30*.

La mise en évidence de l'interaction originale entre deux MYB-R2R3, *AtMYB30* et *AtMYB96*, permet donc d'apporter un élément supplémentaire pour la compréhension des mécanismes de coopération entre les facteurs MYB. Cependant, de nombreuses questions restent ouvertes sur le mécanisme menant à la collaboration positive entre *AtMYB30* et *AtMYB96* pour la régulation de la défense.

Discussion générale et Perspectives

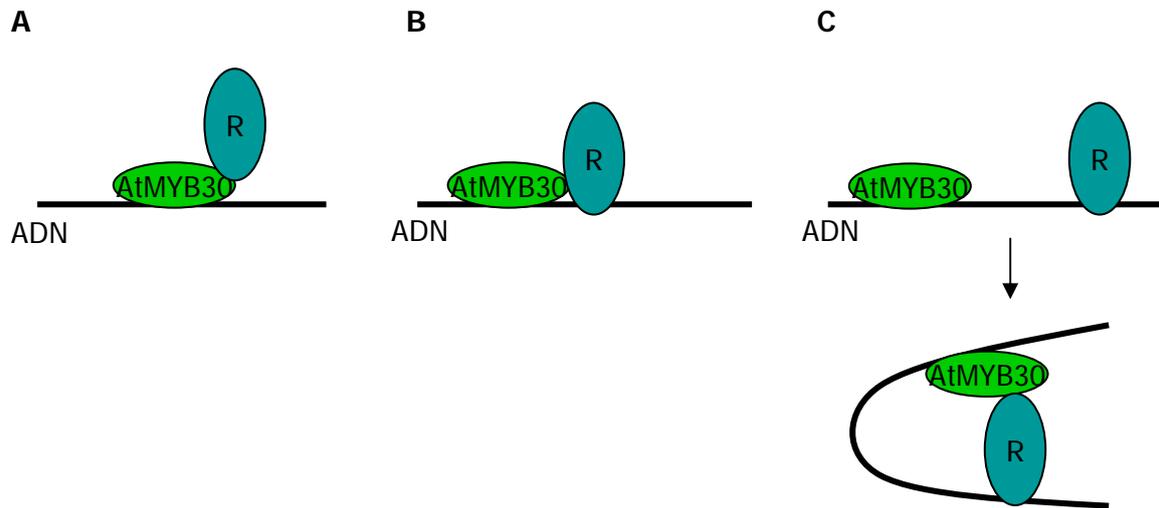


Figure 46. Trois modèles d'interaction entre AtMYB30 et un régulateur (R), au niveau d'un promoteur cible d'AtMYB30.

(A) Interaction entre AtMYB30 et un régulateur ne possédant pas obligatoirement de domaine de fixation à l'ADN. Ce modèle pourrait s'appliquer à toutes les interactions impliquant AtMYB30, identifiées à ce jour. **(B)** Interaction entre AtMYB30 et un régulateur se fixant à l'ADN à proximité d'AtMYB30. **(C)** Interaction entre AtMYB30 et un régulateur se fixant à l'ADN à distance d'AtMYB30. Les modèles (B) et (C) pourraient s'appliquer à l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 ou BES1, qui possèdent tous deux *a priori* la capacité de se lier à l'ADN.

AtMYB30 est un facteur de transcription de type MYB-R2R3 identifié comme régulateur positif de la mort cellulaire hypersensible et de la résistance chez *Arabidopsis*. Avant mon arrivée au laboratoire, un crible double-hybride chez la Levure a permis d'identifier plusieurs interacteurs putatifs d'AtMYB30. Parmi eux, **AtSPLA₂-α** (Résultats, Chapitre I) et **MIP1** (Résultats, Chapitre II) ont été validés, au cours de ma thèse, comme interacteurs d'AtMYB30 *in planta*, et régulateurs négatifs de son activité. Ces deux partenaires régulent négativement les réponses de défense médiées par AtMYB30. De plus, l'étude de l'interaction entre AtMYB30 et MIP1 a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives sur la **régulation post-traductionnelle d'AtMYB30** par ubiquitination, et sur le rôle de cette MPT dans le contrôle de la HR et de la résistance. Par ailleurs, le facteur de transcription **AtMYB96** interagit également avec AtMYB30 *in planta* et coopérerait avec lui pour réguler la HR et la résistance (Résultats, Chapitre IV). Enfin, une approche protéomique, après immunoprécipitation d'AtMYB30, a permis d'identifier de **nouveaux interacteurs putatifs** d'AtMYB30 et de révéler l'existence de formes d'AtMYB30 potentiellement **modifiées post-traductionnellement** (Résultats, Chapitre III). Ces résultats soulèvent de nombreuses questions sur le rôle et les mécanismes de mise en place de ces événements de régulation : interactions protéine-protéine et MPT. Différentes hypothèses seront proposées pour discuter les résultats de cette thèse, ainsi que les perspectives de stratégies à mettre en place pour les étudier dans le futur.

I. AtMYB30 : membre d'un réseau protéique complexe ?

I.1 Effet des différents interacteurs d'AtMYB30 sur sa fonction

Un contrôle précis de la transcription est essentiel à l'activité biologique des organismes Eucaryotes, au cours de leur développement, et tout particulièrement lorsque ceux-ci sont soumis à un stress. En général, la régulation transcriptionnelle est assurée en synergie avec plusieurs facteurs de régulation de la transcription capables de se fixer sur une séquence d'ADN cible. L'implication de plusieurs sortes de FT permet également l'intégration de différentes voies de signalisation au sein du noyau. Les FT peuvent interagir avec trois types de régulateurs : des protéines incapables de se fixer à l'ADN, des protéines se fixant à l'ADN à proximité du FT avec lequel elles interagissent, ou des protéines se fixant à l'ADN à distance du FT avec lequel elles interagissent. Parmi tous les interacteurs d'AtMYB30 abordés dans cette thèse, seuls **AtMYB96** et **BES1** (Li et al., 2009) présentent *a priori* une capacité de **se lier à l'ADN**. Ces deux FT pourraient se fixer sur les mêmes promoteurs cibles qu'AtMYB30 (Figure 46B ou C) ou ils pourraient simplement interagir avec AtMYB30, lorsque celui-ci est fixé sur l'un de ses promoteurs cibles (Figure 46A), ou libre dans le noyau.

AtMYB30 et **AtMYB96** interagissent *in planta* et sont tous deux des régulateurs positifs de la HR. On peut alors se demander si ces deux FT possèdent des cibles communes. Il a été montré qu'AtMYB30 active la voie de biosynthèse des VLCFA (Raffaele et al., 2008), alors qu'AtMYB96 active des gènes impliqués dans les voies de transduction de l'AIA et de l'ABA (Seo et al., 2009). Cependant, leurs cibles directes n'ont pas été identifiées à ce jour. Plusieurs situations peuvent expliquer la coopération entre AtMYB30 et AtMYB96 pour la régulation de la HR. Tout d'abord, AtMYB30 et AtMYB96 pourraient avoir des cibles communes, de façon indépendante de leur interaction physique. Ensuite, l'interaction entre AtMYB30 et AtMYB96 pourrait être nécessaire à l'activation de certaines cibles communes. Enfin, AtMYB30 et

AtMYB96 pourraient avoir des gènes cibles différents, dans des voies parallèles contribuant à la mise en place des réponses de défense. La recherche des cibles d'AtMYB96, actuellement en cours dans l'équipe, permettra certainement d'expliquer le mécanisme de coopération entre AtMYB30 et AtMYB96.

Deux interacteurs d'AtMYB30 validés *in planta*, **AtSPLA₂-α** et **MIP1**, ont un **effet négatif sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30**. Ceci suggère que leur interaction avec AtMYB30 pourrait avoir plusieurs effets : placer AtMYB30 dans une conformation l'empêchant de se fixer à l'ADN, diminuer son affinité pour l'ADN, l'empêcher d'interagir avec des activateurs, ou favoriser son interaction avec des répresseurs. Dans le cas de l'interaction entre AtMYB30 et MIP1, ces effets pourraient être dus à l'ubiquitination d'AtMYB30 par MIP1. Quant à *AtSPLA₂-α*, il semble que son rôle de régulateur négatif sur les réponses de défense médiées par AtMYB30 ne soit pas dépendant de son activité phospholipase, mais plutôt de son interaction physique avec AtMYB30. *AtSPLA₂-α* et MIP1 sont des **régulateurs négatifs des réponses de défense** médiées par AtMYB30, probablement *via* leur effet négatif sur son activité transcriptionnelle. L'importance de ces régulateurs négatifs pourrait s'expliquer par la nécessité d'un contrôle étroit du processus de mort cellulaire régulé par AtMYB30. En effet, la plante aurait besoin de régulateurs négatifs pour contrôler l'action d'AtMYB30 et éviter la propagation non-contrôlée de la HR. De nombreuses protéines végétales ont pu être identifiées comme régulateurs négatifs des réponses de défense : CPR30, une protéine de type F-Box (Gou et al., 2009), AtNUDT7, une protéine à domaine Nudix (Ge et al., 2007), des FT de type WRKY (Journot-Catalino et al., 2006), SPL11, une protéine de type U-Box (Zeng et al., 2004), ainsi qu'un grand nombre de protéines identifiées *via* les mutants « lésions spontanées » (Lorrain et al., 2003). Il semblerait que leur rôle serait d'éviter que les défenses se mettent en place de façon inappropriée, ou de s'assurer que celles-ci s'arrêtent une fois l'agent pathogène vaincu. En effet, la mise en place des mécanismes de défense est couteuse pour la plante et celle-ci doit donc être finement régulée (Heil, 2002; Brown, 2003).

I.2 La mise en place de complexes multi-protéiques contenant AtMYB30

Les expériences de filtration sur gel suggèrent qu'AtMYB30, exprimé transitoirement chez *N. benthamiana*, fait partie d'un **complexe protéique** de poids moléculaire élevé, environ trois fois supérieur à celui d'AtMYB30 monomérique (Voir Résultats, IV.3). On pourrait donc envisager que plusieurs partenaires d'AtMYB30 puissent faire partie d'un même complexe. Ainsi, pour des raisons d'homologies élevées entre AtMYB30 et AtMYB96, l'interaction entre AtMYB96 et *AtSPLA₂-α* semblerait possible car nous avons pu montrer que le domaine MYB d'AtMYB30, très conservé au sein de la famille MYB, était nécessaire à son interaction avec *AtSPLA₂-α* (Froidure et al., 2010, submitted). Cependant, aucune relocalisation d'*AtSPLA₂-α* du cytoplasme vers le noyau n'a pu être observée en présence d'AtMYB96. Pour ces mêmes raisons d'homologies élevées entre AtMYB30 et AtMYB96, MIP1 et BES1 interagissant avec AtMYB30, pourraient également interagir avec AtMYB96 au sein du noyau. Une interaction entre AtMYB96 et MIP1 a d'ailleurs été mise en évidence chez la Levure. A l'inverse, aucune interaction n'a été décrite à ce jour, chez les plantes, entre une phospholipase et une protéine à domaine RING. Afin de déterminer si AtMYB30 fait partie d'un complexe multi-protéique avec plusieurs de ses partenaires identifiés dans cette étude, on pourrait envisager d'effectuer des expériences de filtration sur gel ou de co-immunoprécipitation multiples.

Par ailleurs, un lien intéressant entre les **phospholipases A₂** et les **protéines G** a pu être mis en évidence récemment chez les animaux. En effet, des PLA₂ du groupe VI pourraient affecter l'activité des récepteurs aux protéines G, soit en altérant la production du substrat de ces récepteurs, soit en modifiant en aval l'activité de leurs cibles (Hooks and Cummings, 2008). De plus, certaines PLA₂ modifieraient l'activité des protéines G impliquées dans la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique (Sattar and Haque, 2007). Cependant, aucune interaction physique entre des protéines G et des phospholipases n'a pu être démontrée à ce jour. Ces résultats suggèrent donc qu'*At*PLA₂- α et les petites protéines G, identifiées comme partenaires putatifs d'*At*MYB30, pourraient interagir, physiquement ou non, pour réguler un même processus biologique.

*At*MYB30 appartient donc certainement à plusieurs complexes protéiques qui diffèrent en fonction du contexte biologique, par exemple. Le fait qu'*At*MYB30 possède différents interacteurs dans l'espace et dans le temps pourrait être un moyen efficace pour (i) obtenir une régulation fine d'un processus biologique régulé par *At*MYB30 et (ii) permettre un recrutement d'*At*MYB30 dans différents processus biologiques, selon les besoins de la plante (voir Discussion, III).

I.3 *At*MYB30 et l'importance du trafic cellulaire pour l'interaction avec ses partenaires protéiques

Nous avons pu montrer que l'interaction entre *At*MYB30 et *At*PLA₂- α nécessitait sa **relocalisation spécifique vers le noyau**. Un phénomène similaire a d'ailleurs été observé chez les animaux où une PLA₂ cytosolique est relocalisée dans le noyau en présence d'un facteur MYB avec lequel elle interagit, régulant alors négativement l'activité transcriptionnelle de ce facteur MYB (Tashiro et al., 2004). Cependant, cette PLA₂ animale est cytosolique, alors qu'*At*PLA₂- α est située dans le système endomembranaire avant sécrétion. Les mécanismes de relocalisation de ces phospholipases vers le noyau sont donc certainement différents dans ces deux situations. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer la relocalisation d'*At*PLA₂- α vers le noyau (Voir Résultats, I). La première est que la fixation d'*At*MYB30 sur *At*PLA₂- α pourrait masquer son signal de sécrétion. Ceci pourrait s'effectuer dans le système endomembranaire, car il possède une continuité avec l'enveloppe nucléaire, et ce lieu pourrait donc contenir à la fois *At*MYB30 et *At*PLA₂- α . La deuxième hypothèse est qu'*At*MYB30 pourrait affecter le trafic vésiculaire et donc empêcher partiellement la sécrétion d'*At*PLA₂- α . Cette hypothèse est renforcée par l'identification de **petites protéines G**, impliquées dans le trafic membranaire, comme partenaires putatifs d'*At*MYB30. Parmi ces régulateurs du trafic membranaire, la protéine *At*Ran-BP1c, identifiée comme partenaire protéique d'*At*MYB30 lors du crible double-hybride et lors d'une expérience d'immunoprécipitation, est impliquée dans la **distribution des protéines nucléaires** (Voir Résultats, III.4.1.1). En effet, *At*Ran-BP1c modifie l'équilibre des concentrations en RanGTP et RanGDP entre le noyau et le cytoplasme (Kim and Roux, 2003). De façon plus spécifique, l'interaction entre *At*MYB30 et *At*Ran-BP1c pourrait affecter le trafic nucléo-cytoplasmique de plusieurs autres protéines. Ceci pourrait alors expliquer comment *At*MYB30 pourrait interagir avec des protéines non nucléaires, telles BAK1 ou SOBER1. De façon intéressante, il a été montré que le récepteur transmembranaire BAK1 est internalisé, de façon constitutive, dans des endosomes (Russinova et al., 2004). L'effet d'*At*MYB30 sur le trafic membranaire pourrait conduire BAK1 à entrer dans le noyau où il

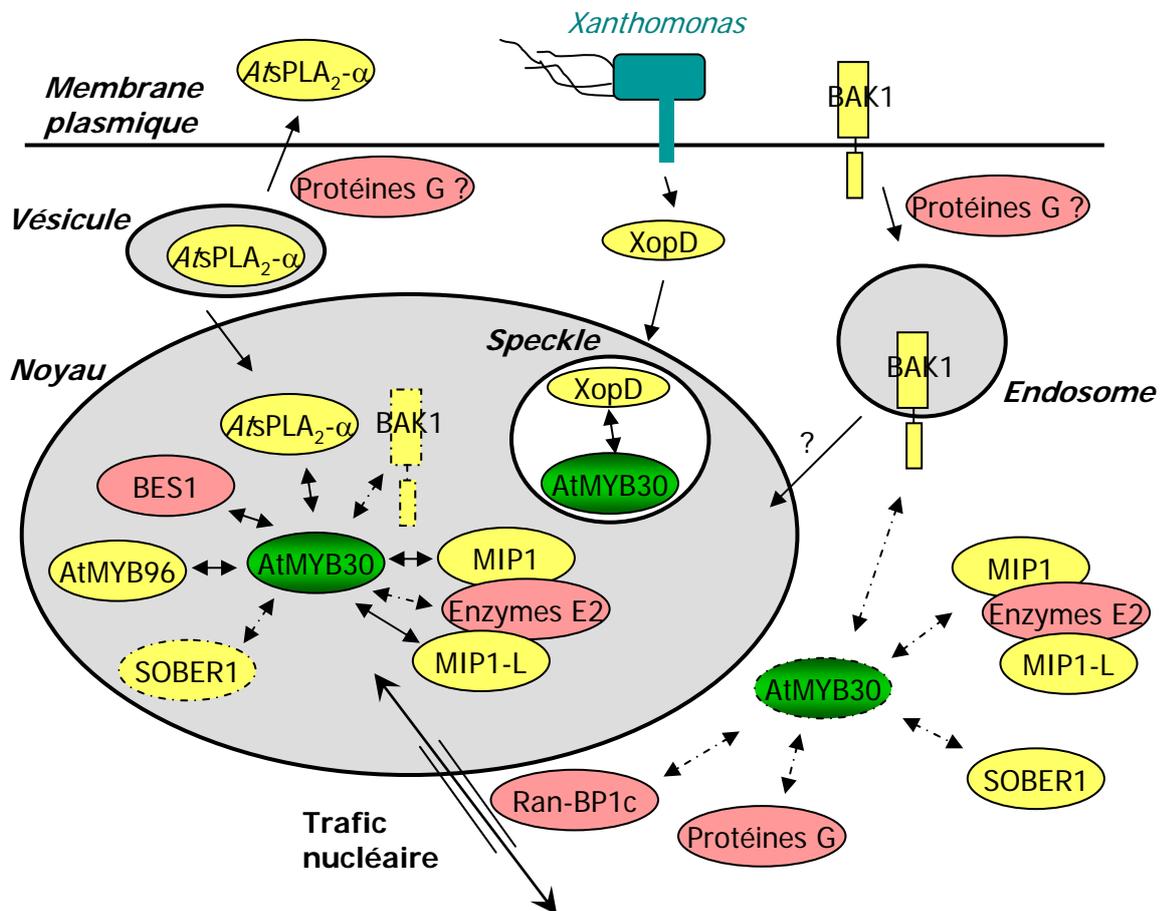


Figure 47. Interactions protéine-protéine faisant intervenir AtMYB30, et localisation subcellulaire.

Les interactions validées *in planta* sont représentées par des flèches double-sens en trait plein. Celles identifiées lors de l'analyse protéomique sont représentées par des flèches double-sens en trait pointillés. La localisation subcellulaire démontrée est représentée par un contour en trait plein alors que les autres localisations possibles sont représentées par un contour en trait pointillé. AtMYB30 pourrait affecter le trafic nucléaire, et donc la localisation de ces différentes protéines, *via* son interaction avec Ran-BP1c. Les interacteurs représentés en jaune ont une fonction dans la régulation des mécanismes de défense.

pourrait alors interagir avec AtMYB30. Comme indiqué précédemment, des résultats préliminaires montrent que BAK1 est relocalisé dans le noyau, en présence d'AtMYB30.

Des phénomènes de translocation nucléaire en réponse à une interaction avec un agent pathogène ont été fréquemment décrits dans la littérature (Deslandes et al., 2003; Burch-Smith and Dinesh-Kumar, 2007; Shen and Schulze-Lefert, 2007; Wiermer et al., 2007; Liu and Coaker, 2008; Cheng et al., 2009b). Cependant, tous ces exemples concernent de relocalisations de protéines cytoplasmiques vers le noyau, alors que mes résultats mettent en évidence des relocalisations nucléaires à partir d'autres compartiments. En effet, dans le cas d'*AtSPLA₂-α*, on a pu observer une relocalisation nucléaire à partir de vésicules cytoplasmiques. Et dans le cas de BAK1, si nos résultats préliminaires se confirment, on assisterait à une relocalisation nucléaire à partir de la membrane plasmique. Ces résultats sont particulièrement originaux car il existe très peu d'exemples de ce type dans le cadre des interactions plante-pathogènes. On peut citer l'exemple d'une protéine chloroplastique (Caplan et al., 2008) et de deux protéines localisées dans le système endomembranaire (Matarasso et al., 2005; Bernoux et al., 2008), qui sont relocalisées vers le noyau après perception d'un agent pathogène.

La figure 47 résume les différentes interactions faisant intervenir AtMYB30, ainsi que leur localisation subcellulaire éventuelle.

I.4 Conclusion et perspectives

Plusieurs interacteurs d'AtMYB30 ont été validés par ces travaux de thèse : *AtSPLA₂-α*, MIP1 et AtMYB96, et de nombreuses questions restent en suspens concernant leur mode d'action. L'interaction entre *AtSPLA₂-α* et AtMYB30 a été caractérisée mais le mécanisme de relocalisation d'*AtSPLA₂-α* vers le noyau reste encore inconnu. L'étude des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* récemment obtenues, et surexprimant la protéine *AtSPLA₂-α*-YFP, pourrait se révéler utile pour suivre la localisation d'*AtSPLA₂-α* en présence d'un agent pathogène. Quant à l'interaction entre AtMYB30 et **MIP1**, elle ouvre de nombreuses questions sur la fonction d'E3 ligase de MIP1 et sur son effet sur AtMYB30. L'étude des lignées transgéniques *P35S:MIP1-3HA* permettra de mieux comprendre le rôle joué par MIP1 dans le contrôle de la HR. L'activité E3 ligase de MIP1 sera également étudiée *in vitro*. Enfin, l'interaction entre AtMYB30 et **AtMYB96**, qui coopèrent positivement pour réguler la HR, suggère que ces deux MYB pourraient former un complexe transcriptionnel et avoir des cibles communes. L'étude des cibles moléculaires d'AtMYB96 est actuellement en cours dans l'équipe.

Par ailleurs, deux autres interacteurs putatifs d'AtMYB30, impliqués dans la régulation de la défense, ont été révélés par ces travaux de thèse : BAK1, SOBER1. L'interaction éventuelle entre **BAK1** et AtMYB30 est d'un intérêt tout particulier car, tout comme AtMYB30, BAK1 possède une activité duale dans le contrôle de la défense et des voies des brassinostéroïdes. De plus, des données préliminaires obtenues dans l'équipe montrent que BAK1 serait relocalisé vers le noyau en présence d'AtMYB30, facilitant ainsi leur éventuelle interaction au sein du noyau. Les perspectives seront donc de valider leur interaction *in planta*, d'étudier l'effet de BAK1 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30, et d'étudier le croisement, en cours de criblage, du mutant d'*Arabidopsis bak1* avec une lignée transgénique surexprimant AtMYB30. L'analyse phénotypique, après inoculation, des plantes issues de ce croisement, permettra de déterminer si la présence de BAK1 est nécessaire à la fonction d'AtMYB30 dans la régulation de la HR et de la défense. Des approches similaires seront menées pour valider l'interaction entre AtMYB30 et

SOBER1, ce dernier étant impliqué dans la régulation négative de la résistance à *Xanthomonas*.

AtMYB30 possède donc de nombreux interacteurs de structures et de fonctions biochimiques variées. Ceci suggère la mise en place de plusieurs **réseaux d'interaction** permettant la régulation des différentes étapes d'un processus biologique donné. Afin de mieux comprendre les mécanismes de mise en place de ce réseau, l'étude des interactions entre les différents partenaires d'AtMYB30 pourrait se révéler très intéressante. De plus, afin d'étudier la dynamique des interactions entre AtMYB30 et ses différents partenaires, il serait intéressant d'étudier la mise en place de ces interactions dans les quelques heures suivant l'inoculation par un agent pathogène. Ainsi, l'étude de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant les différents interacteurs d'AtMYB30 fusionnés à la YFP, pourrait se révéler utile pour suivre la localisation de ces protéines en présence d'un agent pathogène. L'étude dynamique des interactions entre AtMYB30 et ses partenaires permettrait également de mieux comprendre le rôle du trafic nucléaire dans la mise en place des différentes interactions entre AtMYB30, localisé dans le noyau, et ses interacteurs décrits comme non nucléaires. Cette perspective sera certainement un « challenge » au niveau technique, mais elle pourrait permettre une avancée considérable dans la compréhension du fonctionnement d'AtMYB30.

Par ailleurs, afin d'identifier de nouveaux interacteurs d'AtMYB30 en conditions d'interaction avec un agent pathogène, on pourrait envisager d'effectuer une analyse protéomique similaire à celle développée dans cette thèse, mais sur des plantes infectées. Cependant, cette analyse étant difficile à mettre en place chez *N. benthamiana*, et en raison du niveau d'expression d'AtMYB30 trop faible chez les lignées transgéniques d'*Arabidopsis P35S:AtMYB30-TAP*, il faudra attendre d'obtenir des lignées d'*Arabidopsis* exprimant *AtMYB30* sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ces expériences pourraient permettre de valider des partenaires identifiés par les approches précédentes, mais surtout d'identifier de nouveaux partenaires d'AtMYB30 dans son contexte biologique d'identification : la régulation de la HR.

II. AtMYB30 : un facteur de transcription multi-modifié ?

De nombreuses données, détaillées dans la suite de cette partie, suggèrent qu'AtMYB30 serait affecté par plusieurs modifications post-traductionnelles (MPT) : phosphorylation, SUMOylation et ubiquitination. De plus, les résultats obtenus dans le Chapitre III renforcent cette hypothèse. En effet, l'analyse par électrophorèse de protéines issues de l'immunoprécipitation d'AtMYB30, produit transitoirement chez *N. benthamiana*, a permis d'identifier AtMYB30 dans 3 bandes de poids moléculaires différents. La bande de poids moléculaire le plus bas correspond à la taille attendue pour une forme non modifiée d'AtMYB30. A l'inverse, les deux bandes supérieures pourraient correspondre à des formes modifiées de cette protéine. Les MPT peuvent avoir des conséquences très variables sur l'activité des facteurs de transcription et leur effet sur l'activité biologique d'AtMYB30 commence seulement à être appréhendé.

II.1 AtMYB30 : une cible de phosphorylation ?

La phosphorylation d'un FT peut avoir des conséquences diverses. En effet, elle peut modifier son activité transcriptionnelle ou sa localisation subcellulaire, constituer un signal de dégradation, ou altérer les interactions avec ses partenaires (Peck, 2006).

L'analyse *in silico* de la séquence d'AtMYB30 par le programme NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) révèle que la région C-terminale d'AtMYB30 est particulièrement riche en sites de phosphorylation potentiels pour plusieurs kinases. Des expériences préliminaires ont été réalisées pour étudier la phosphorylation d'AtMYB30 *in planta* (Rivas S., données non publiées). Ces expériences d'électrophorèse bidimensionnelle, en présence ou en absence de phosphatase, indiquent qu'AtMYB30 serait **phosphorylé *in planta***.

L'identification des sites de phosphorylation d'AtMYB30 pourrait s'effectuer par une approche protéomique similaire à celle développée dans la partie Résultats Chapitre III. Après immunoprécipitation d'AtMYB30, en présence ou en absence de phosphatase, et électrophorèse, les bandes correspondant à AtMYB30 seraient analysées. La séquence des peptides serait ensuite analysée par LC-MS/MS afin de localiser les sites de phosphorylation dans la séquence d'AtMYB30. Une comparaison du profil de phosphorylation d'AtMYB30 avant ou après une inoculation par un agent pathogène avirulent pourrait également être réalisée.

Il resterait alors à étudier le rôle de cette modification sur l'activité d'AtMYB30 dans le contrôle de la HR et de la résistance. Pour cela, les sites de phosphorylation pourraient être ciblés par mutagenèse et l'expression de ces constructions mutantes *in planta* permettrait d'étudier leur effet sur plusieurs aspects de l'activité d'AtMYB30 : sa localisation subcellulaire, son activité transcriptionnelle, ses interactions avec ses partenaires et son rôle de régulateur positif de la HR et de la défense. Ces analyses permettront d'élucider le rôle de la phosphorylation d'AtMYB30 dans le contrôle de la HR et de la résistance des plantes face aux agents pathogènes.

II.2 AtMYB30 : une cible de SUMOylation ?

Des données récentes montrent qu'AtMYB30 est **SUMOylé chez *E. coli*** (Okada et al., 2009). En effet, les auteurs ont reconstitué la cascade de SUMOylation chez *E. coli* en utilisant AtMYB30 comme substrat. Les 4 isoformes de SUMO (AtSUMO 1, 2, 3 et 5) testés ont permis de mettre en évidence la SUMOylation d'AtMYB30. De plus, des analyses LC-MS/MS ont permis de caractériser les sites de SUMOylation d'AtMYB30 : un site majeur (K283), localisé dans une séquence non conservée de la protéine, et plusieurs sites mineurs (K224, K228, K232, K246 et K250). Ces expériences montrent donc qu'AtMYB30 serait SUMOylé chez *E. coli*, mais il est possible que les sites de SUMOylation d'AtMYB30 *in planta* soient différents. De plus, aucune validation fonctionnelle *in planta* n'a été effectuée et le rôle de la SUMOylation d'AtMYB30 sur sa fonction reste donc indéterminé.

Ces résultats sont à mettre en relation avec l'expérience d'immunoprécipitation d'AtMYB30 produit *in planta*, ayant conduit à l'identification de 3 bandes de poids moléculaires différents, représentant probablement des formes modifiées d'AtMYB30 (voir Résultats III.2.2). En effet, 3 peptides d'AtMYB30, identifiés dans la bande non modifiée, n'ont pas été identifiés dans les bandes supposées modifiées. C'est le cas des peptides contenant les lysines K66, K113, K228 et K232, ce qui suggère que ces lysines pourraient être des cibles de SUMOylation *in vivo*. De façon intéressante, la lysine K232 a été identifiée comme site mineur de SUMOylation *in vitro* (Okada et al., 2009). Quant à la lysine K66, elle possède une forte probabilité de SUMOylation d'après le programme SUMOplot (www.abgent.com/doc/sumoplot). Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse que ces peptides soient modifiés par une MPT autre que la SUMOylation, ou que leur absence d'identification soit simplement due à des raisons techniques.

Par ailleurs, **AtMYB30 est SUMOylé *in vitro*** par des enzymes d'Arabidopsis purifiées (Stuible H.P., données non publiées), et des expériences de co-immunoprécipitation d'AtMYB30 et SUMO ont permis de montrer qu'**AtMYB30 est modifié par SUMO *in vivo*** (Rivas S., données non publiées). Afin d'étudier si les résidus lysines identifiés comme sites du SUMOylation dans l'approche *in vitro* chez *E.coli* sont identiques à ceux réellement SUMOylés *in planta*, deux approches sont en cours. Tout d'abord, AtMYB30 sera produite *in planta*, purifiée et analysée par LC-MS/MS. Par ailleurs, une approche basée sur l'utilisation des formes d'AtMYB30 mutées dans certains sites de SUMOylation candidats, sera utilisée pour identifier un mutant d'AtMYB30 qui n'est plus SUMOylé *in planta*.

L'effet de la SUMOylation sur l'activité biologique d'AtMYB30 est encore mal connu. Afin de mieux comprendre le rôle de cette modification, les résultats de la mutagenèse permettront d'étudier l'effet de la SUMOylation sur plusieurs aspects de l'activité d'AtMYB30 : sa localisation subcellulaire, son activité transcriptionnelle, ses interactions avec ses partenaires et son rôle de régulateur positif de la HR et de la défense. La construction mutée dans la lysine K283, identifiée comme SUMOylée *in vitro*, ainsi que d'autres constructions similaires, sont actuellement en cours d'étude. Des données préliminaires obtenues pour certains mutants déjà disponibles suggèrent que ces mutations n'affectent pas la localisation subcellulaire d'AtMYB30. A l'inverse, elles affecteraient négativement l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30. Ceci suggère que, si ces lysines sont cibles de SUMOylation, cette MPT aurait un effet positif sur l'activité d'AtMYB30 comme décrit précédemment pour d'autres FT (Goodson et al., 2001; Miura et al., 2007b).

Toutes ces données montrent donc qu'AtMYB30 est SUMOylé *in vitro* et *in vivo* et que cette modification pourrait affecter son activité transcriptionnelle. Les conséquences de la SUMOylation d'AtMYB30 sur la régulation de la HR sont actuellement à l'étude.

II.3 AtMYB30 : une cible d'ubiquitination ?

Plusieurs observations laissent penser qu'AtMYB30 pourrait être une cible d'ubiquitination.

- Il a été montré que la **SUMOylation** pouvait bloquer certaines modifications affectant les lysines, telle l'ubiquitination (Nasr et al., 2006), et que la **phosphorylation** était impliquée dans l'activation (Lin et al., 2002) ou l'inhibition (Huang et al., 2009; Kaunisto et al., 2009) de l'ubiquitination. AtMYB30 étant SUMOylé et potentiellement phosphorylé, ces deux modifications pourraient influencer sur son éventuelle ubiquitination.
- Nous avons pu observer que la délétion du **domaine acide de transaction** (TAD) d'AtMYB30 stabilisait l'expression de cette protéine chez *N. benthamiana*. Cependant, on ne peut exclure qu'AtMYB30 soit la cible de protéases végétales, ou que la délétion de son TAD modifie sa conformation et rende la protéine plus stable, par exemple. Ces données pourraient suggérer un rôle de ce domaine dans la dégradation d'AtMYB30 par le protéasome. En effet, certains facteurs de transcription animaux sont ubiquitinés au niveau de leur TAD acide, permettant leur activation avant leur dégradation par le protéasome (Salghetti et al., 2001; Conaway et al., 2002).
- La recherche sans *a priori* d'interacteurs d'AtMYB30 par une approche protéomique a conduit à l'identification de plusieurs protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome (voir Résultats III.4.1.1). En effet, une **sous-unité du protéasome** et 3

enzymes de conjugaison de type E2, ont été identifiées comme partenaires putatifs d'AtMYB30. Ceci suggère qu'AtMYB30 serait ubiquitiné *in planta* puis dirigé vers le protéasome.

➤ Des résultats préliminaires montrent que le niveau protéique d'AtMYB30 est augmenté en présence d'inhibiteur du protéasome, après expression transitoire chez *N. benthamiana* ou stable chez Arabidopsis (voir Résultats II). Ces données suggèrent que l'éventuelle ubiquitination d'AtMYB30 aurait pour conséquence sa **dégradation par le protéasome**.

➤ AtMYB30 interagit *in planta* avec **MIP1**, une E3 ligase putative qui affecte négativement l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 (voir Résultats II). Dans ces essais, AtMYB30 et MIP1 sont co-exprimés chez *N. benthamiana* et on pourrait imaginer que cette diminution de l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 provient de sa dégradation par le protéasome, après ubiquitination *via* MIP1. L'analyse du niveau d'expression d'AtMYB30 sous le contrôle d'un promoteur 35S n'a pas permis de détecter une diminution de celle-ci en présence de MIP1, laissant envisager une **régulation directe de son activité transcriptionnelle**. Cependant, des résultats préliminaires obtenus récemment indiqueraient que MIP1 aurait un effet négatif sur l'accumulation d'AtMYB30, lorsque celui-ci est sous le contrôle de son propre promoteur. L'effet négatif de MIP1 sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30 pourrait donc être dû à une dégradation protéique dépendante du protéasome.

Par ailleurs, le mutant *mip1* d'Arabidopsis est plus résistant après inoculation par un agent pathogène avirulent. Ceci indiquerait que l'ubiquitination d'AtMYB30 serait abolie dans ce mutant, conduisant à une accumulation de la protéine qui conférerait un phénotype de résistance accrue similaire à celui des lignées transgéniques surexprimant AtMYB30.

➤ AtMYB30 interagirait *in planta* avec une autre E3 ligase putative, **MIP1-L**, le plus proche homologue de MIP1 chez Arabidopsis. Le mutant *mip1-L* d'Arabidopsis présente une résistance similaire à celle du sauvage Col-0. Cependant, des résultats préliminaires montrent que le double-mutant *mip1/mip1-L* présente une résistance accrue par rapport au mutant *mip1*. MIP1 et MIP1-L auraient donc un rôle redondant dans le contrôle de la résistance, *via* leur interaction avec AtMYB30 et son éventuelle ubiquitination.

Tous ces résultats suggèrent qu'AtMYB30 pourrait être ubiquitiné *in vivo* par les E3 ligases putatives MIP1 et MIP1-L. Les données obtenues montrent que cette modification pourrait avoir deux rôles distincts sur l'activité d'AtMYB30. En effet, les données montrant (i) un rôle du TAD d'AtMYB30 dans sa stabilité, (ii) l'accumulation d'AtMYB30 en présence d'inhibiteur du protéasome, (iii) l'identification d'une sous-unité du protéasome comme interacteur putatif d'AtMYB30, ainsi que (iv) les données préliminaires montrant l'effet négatif de MIP1 sur l'accumulation d'AtMYB30 exprimé sous contrôle de son propre promoteur, soutiennent l'hypothèse d'une **dégradation d'AtMYB30 par le protéasome**. Cependant, l'ensemble de ces résultats ne nous permettent pas d'exclure que l'ubiquitination d'AtMYB30 pourrait avoir un effet direct sur son **activité transcriptionnelle**. Cette modification pourrait en effet avoir un rôle négatif sur l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30, comme décrit pour le FT animal MET4, dont l'ubiquitination conduit à sa répression transcriptionnelle (Kaiser et al., 2000; Flick et al., 2004).

Le phénotype de résistance accrue des mutants *mip1* et *mip1/mip1-L* s'expliqueraient par une absence, ou une baisse de l'ubiquitination d'AtMYB30, conduisant à (i) une accumulation de la protéine et/ou (ii) une augmentation de son activité transcriptionnelle. Ainsi,

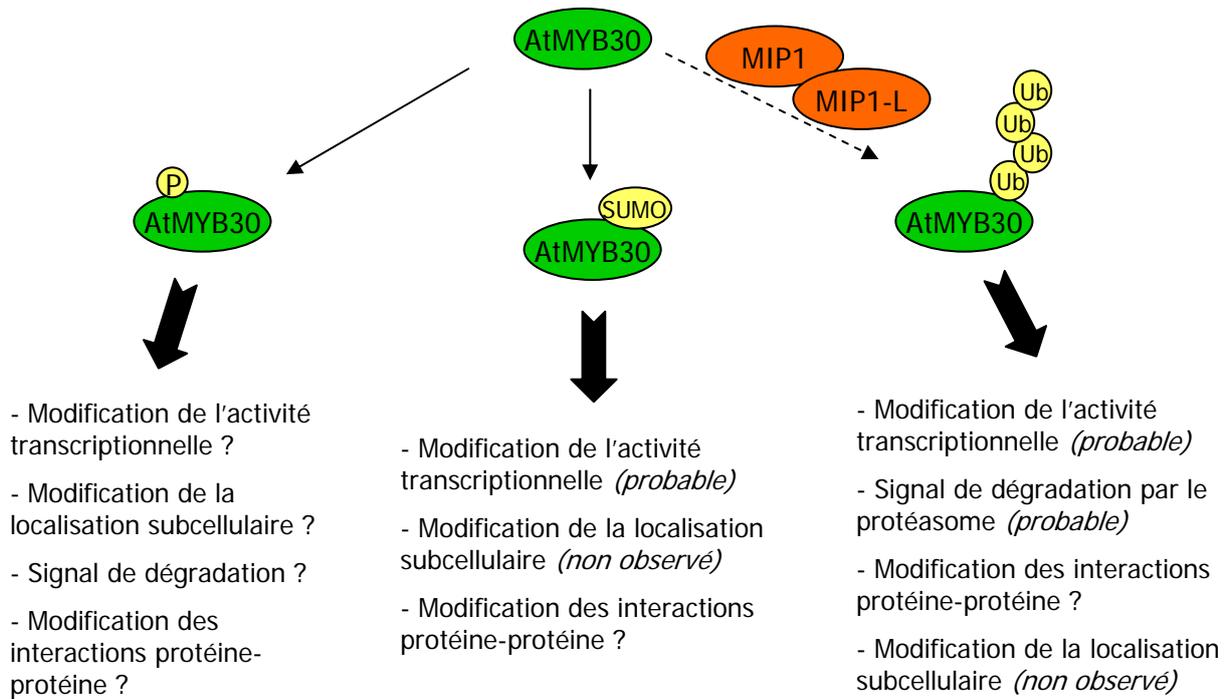


Figure 48. Les différentes MPT potentiellement portées par AtMYB30 et leurs conséquences éventuelles.

La modification d'AtMYB30 par phosphorylation et SUMOylation a été validée *in planta* (flèche en trait plein). De plus, de nombreuses données laissent penser qu'AtMYB30 serait ubiquitiné par MIP1 et/ou MIP1-L (flèche en trait pointillé). Les conséquences générales de ces MPT sont indiquées. Les données disponibles sur leur effet sur AtMYB30 sont indiquées entre parenthèses.

selon la lysine ciblée et le type d'ubiquitination, l'une ou l'autre de ces voies pourrait être utilisée pour réguler l'activité d'AtMYB30. Cependant, le lien entre MIP1 ou MIP1-L et l'ubiquitination d'AtMYB30 n'a pas encore été démontré à ce jour. Les effets observés pourraient donc être simplement dus à l'interaction physique entre AtMYB30 et MIP1 ou MIP1-L. Des expériences d'ubiquitination *in vitro* sont en cours afin d'étudier si MIP1 ou MIP1-L sont capables d'ubiquitiner AtMYB30.

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle de l'ubiquitination d'AtMYB30, différentes expériences sont envisagées. Tout d'abord, des tests d'ubiquitination *in vitro*, en présence de MIP1 ou MIP1-L, seront réalisés afin de produire des formes d'AtMYB30 ubiquitinées, analysables par spectrométrie de masse. Ceci pourrait permettre d'identifier les résidus lysine ciblés et de déterminer le type d'ubiquitination impliqué. Dans ces tests *in vitro*, il sera intéressant d'utiliser, parmi les 37 enzymes E2 annotées chez Arabidopsis, les 3 (UBC5, 13 et 18) identifiées comme partenaires putatifs d'AtMYB30 par l'approche protéomique (voir Résultats III.4.1.1). L'identification des formes d'AtMYB30 ubiquitinées par spectrométrie de masse sera également effectuée après production de la protéine *in planta*. Une fois les résidus lysines cibles d'ubiquitination identifiés, ceux-ci pourront être mutés. L'effet de ces mutations sur les phénotypes conférés par AtMYB30 sera alors analysé. Des expériences d'inhibition du protéasome pourraient également être répétées avec ces mutants et avec tous les contrôles adaptés.

Les données obtenues dans cette thèse ont donc permis de formuler des hypothèses sur les conditions de mise en place et les conséquences de l'ubiquitination d'AtMYB30. Ces hypothèses devront être validées par des expériences complémentaires.

II.4 Conclusion et perspectives

AtMYB30 semble donc être un facteur de transcription multi-modifié par phosphorylation, SUMOylation et ubiquitination. Cette caractéristique a été décrite précédemment pour des MYB animaux, tel c-Myb (Sramko et al., 2006), mais très peu d'exemples sont disponibles pour les MYB végétaux. AtMYB30 représente donc un modèle intéressant pour étudier les conséquences des différentes MPT ainsi que leurs interconnexions chez les plantes. Le rôle de ces MPT individuelles sur l'activité d'AtMYB30 commence à être appréhendé, mais l'effet combiné de ces différentes MPT est encore inconnu (Figure 48). Cependant, il est fréquent que ces MPT entrent en compétition, en particulier lorsqu'elles ciblent les mêmes résidus. C'est le cas pour la SUMOylation, l'ubiquitination et l'acétylation qui ciblent toutes trois des résidus lysines. On peut donc supposer que la SUMOylation et l'ubiquitination d'AtMYB30 puissent entrer en compétition, selon le contexte biologique. D'autre part, certaines MPT sont des signaux inhibiteurs ou activateurs de la mise en place d'autres MPT (Lin et al., 2002; Hay, 2005; Huang et al., 2009).

Parmi les rôles attribués aux MPT affectant les FT, les deux majeurs sont d'**augmenter ou diminuer leur activité transcriptionnelle**. En effet, certaines MPT telles l'ubiquitination (Salghetti et al., 2001) ou la phosphorylation peuvent activer les facteurs de transcription. Par exemple, la phosphorylation du MYB CCA1 d'Arabidopsis lui permet d'acquérir une conformation nécessaire à sa fixation à l'ADN (Daniel et al., 2004). L'activation des FT peut aussi passer par des modifications des interactions entre le FT et ses partenaires. Ainsi, la phosphorylation de B-MYB le libère de son complexe inhibiteur (Joaquin and Watson, 2003). A l'inverse, la SUMOylation est plus fréquemment impliquée dans la régulation négative de l'activité des FT

(Kaiser et al., 2000; Zhong et al., 2000; Baba et al., 2005; Yang and Sharrocks, 2006; Jang et al., 2007). La fixation de ces différentes MPT sur AtMYB30 peut donc avoir différentes conséquences, augmentant ou diminuant son activité transcriptionnelle selon les conditions biologiques.

Les perspectives concernant l'étude des MPT d'AtMYB30 sont donc, tout d'abord, d'identifier les différents sites de modifications dans la séquence d'AtMYB30, ainsi que les mécanismes par lesquels ces modifications sont mises en place. Le rôle de ces MPT sur la fonction d'AtMYB30 pourra alors être étudié par mutagenèse de ces sites de modification.

L'hypothèse de la présence de **plusieurs isoformes de certains FT**, modifiés par différentes MPT en fonction du contexte biologique, a été formulée récemment (Benayoun and Veitia, 2009). Les différents isoformes pourraient avoir : (i) différentes spécificités de fixation à l'ADN, (ii) différentes affinités pour une même séquence d'ADN, et/ou (iii) différents partenaires protéiques. Cette hypothèse s'appliquerait tout particulièrement aux FT impliqués dans plusieurs processus biologiques, tel AtMYB30. En effet, on peut supposer que ce sont des isoformes d'AtMYB30 différents qui sont capables d'activer les gènes de biosynthèse des lipides, impliqués dans la défense, ou les gènes de réponse aux brassinostéroïdes. Ceci éviterait, par exemple, que ces gènes de réponse aux BR soient activés lors d'une infection par un agent pathogène, et *vice-versa*. Cela permettrait donc à la cellule d'utiliser un seul gène pour accomplir plusieurs fonctions, *via* les différentes MPT portées par la protéine correspondante. Cette stratégie évolutive permettrait à la plante d'augmenter le nombre de signaux de sortie possibles en utilisant un nombre limité de réactions.

III. AtMYB30 : un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux processus biologiques ?

AtMYB30 est exprimé à des **stades développementaux précoces** de la plante (embryogénèse et développement des plantules), mais son rôle dans ces étapes est encore inconnu (voir Introduction IV.1.4). Par ailleurs, chez des plantes adultes, *AtMYB30* est un régulateur positif de la **défense** *via* l'activation de gènes impliqués dans la biosynthèse des VLCFA (voir Introduction IV.1.3), mais il est également impliqué dans la régulation de l'expression de gènes brassinostéroïdes-dépendants, importants pour la **différenciation vasculaire, la sénescence ou les réponses aux stress** (voir Introduction IV.1.4). On peut donc envisager qu'AtMYB30, comme nombre d'autres FT, puisse être recruté dans différents processus biologiques et donc posséder des MPT et des interacteurs différents en fonction du processus biologique régulé.

III.1 AtMYB30 impliqué dans la régulation de la défense

Lors d'une interaction incompatible, l'expression d'*AtMYB30* est très rapidement induite, dans la zone inoculée, par un mécanisme encore inconnu. Afin d'obtenir des informations sur les facteurs qui contrôlent l'induction d'*AtMYB30*, des expériences de simple-hybride pourraient être réalisées afin d'identifier les protéines se fixant sur le promoteur d'*AtMYB30*, et induisant son expression. L'expression d'*AtMYB30* est nécessaire à l'induction de l'expression de gènes appartenant à la voie de biosynthèse des **VLCFA** (Raffaele et al., 2008). Une augmentation de la teneur en VLCFA de la fraction sphingolipidique a pu être mise en évidence dans les lignées

AtMYB30ox, en comparaison avec les lignées sauvage et *AtMYB30ko*. De plus, cet effet est amplifié au cours d'une interaction incompatible. Les VLCFA pourraient donc être utilisés pour produire un signal lipidique de type **sphingolipide**, molécules impliquées dans l'activation de la mort cellulaire chez les plantes et dans la régulation des interactions plantes-pathogènes (Gechev and Hille, 2005; Towney et al., 2005; Raffaele et al., 2009). Par exemple, la toxine produite par le champignon *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* déclenche la mort cellulaire en interrompant le métabolisme des sphingolipides (Spassieva, 2002). D'autre part, le mutant d'*Arabidopsis acd5 (accelerated cell death5)*, qui est affecté dans un gène codant une céramide kinase (CERK), présente un phénotype de mort cellulaire spontanée et une sensibilité accrue lors d'une infection par un agent pathogène (Liang et al., 2003). Enfin, on peut citer l'exemple du gène *ERH1* qui agit comme régulateur négatif de la HR dépendante du gène de résistance *RPW8*, en réponse au Mildiou. Ce gène code une enzyme impliquée dans la biosynthèse des sphingolipides (inositolphosphorylceramide synthase) et est rapidement induit après une infection par un agent pathogène, suggérant que cette enzyme est utilisée pour augmenter la biosynthèse des sphingolipides, en lien avec leur fonction dans la défense (Wang et al., 2008). La mort cellulaire programmée et la défense sont donc souvent associées à la voie de biosynthèse des sphingolipides, celle-ci étant activée par l'infection par un agent pathogène (Raffaele et al., 2009). L'identification du **signal lipidique** putatif, produit par l'action d'*AtMYB30* et régulant la HR, est actuellement en cours dans l'équipe.

Pour accomplir sa fonction de régulateur de la défense et activer ses gènes cibles, *AtMYB30* interagirait avec *MIP1*, *AtSPLA₂-α* et *AtMYB96* et, potentiellement, avec *MIP1-L*, *BAK1* et *SOBER1*. On peut supposer qu'*AtMYB30* n'interagirait pas de façon simultanée avec toutes ces protéines mais plutôt de manière séquentielle, dans le temps ou dans l'espace. Ainsi, nos résultats concernant la régulation spatio-temporelle d'*AtMYB30* et *AtSPLA₂-α* nous laissent penser que ces deux protéines interagiraient préférentiellement dans la zone située en périphérie des lésions, afin de limiter l'extension de celles-ci. A l'inverse, *AtMYB30* et *AtMYB96* présentent des profils d'expression similaires et coopèrent pour réguler positivement la HR. Contrairement à *AtMYB30*, dont l'expression n'est induite que dans la zone inoculée, des données préliminaires montrent que l'expression d'*AtMYB96* est induite à 2hpi dans la zone inoculée mais aussi dans la zone adjacente. Il est donc probable que leur interaction se mette en place dans la zone inoculée, où les deux gènes sont co-régulés. Leur interaction pourrait alors permettre d'activer des gènes cibles communs, impliqués dans la biosynthèse des VLCFA, par exemple. De plus, des données préliminaires montrent qu'*AtMYB30* active l'expression d'*AtMYB96*, et qu'*AtMYB96* réprime l'expression d'*AtMYB30*. *AtMYB96* participerait donc à une boucle de rétro-contrôle négatif de l'expression d'*AtMYB30*. Cette régulation transcriptionnelle croisée pourrait permettre de moduler finement l'expression de ces deux gènes, assurant ainsi un contrôle étroit de la mise en place de la HR. Quant à *MIP1*, son expression dans les tissus végétaux est assez constante au cours du temps. Comme *MIP1* est un régulateur négatif de la résistance, on peut supposer qu'il interagirait avec *AtMYB30* (i) dans la zone en périphérie des lésions, pour limiter leur extension, ou (ii) dans la zone inoculée, pour réprimer *AtMYB30* une fois son action terminée. Par ailleurs, les interactions entre *AtMYB30* et ses différents partenaires pourraient également dépendre, par exemple, de l'agent pathogène impliqué. Ainsi, l'interaction avec *SOBER1* pourrait se mettre en place préférentiellement dans le cas d'une interaction entre *Arabidopsis* et *Xanthomonas*.

D'autre part, la fonction d'AtMYB30 dans régulation de la HR nécessite certainement la présence de MPT. Les différentes MPT potentiellement portées par AtMYB30 au cours de la régulation de la HR n'ont pas été clairement identifiées à ce jour, mais des données montrent qu'AtMYB30 est **phosphorylé** et **SUMOylé** *in planta*. Des données obtenues dans l'équipe montrent que la mutation de plusieurs lysines d'AtMYB30, cibles possibles de SUMOylation, diminue son activité transcriptionnelle. Enfin, l'éventuelle **ubiquitination** d'AtMYB30 par MIP1 et/ou MIP1-L jouerait un rôle important dans la régulation de son abondance et/ou son activité transcriptionnelle. Cette MPT serait donc importante pour la régulation de la HR par AtMYB30. Cependant, l'ubiquitination d'AtMYB30 *in planta* doit être validée. On peut supposer qu'AtMYB30 n'est pas simultanément modifié par phosphorylation, SUMOylation et ubiquitination, mais que ces MPT apparaissent de façon variable dans le temps et l'espace, permettant ainsi une régulation fine du fonctionnement d'AtMYB30.

L'importance d'AtMYB30 pour la régulation des réponses de défense est renforcée par des données récentes montrant qu'AtMYB30 serait ciblé par l'effecteur de *Xanthomonas* XopD (Cannonne J., Rivas S., données non publiées). En effet, en présence de XopD, AtMYB30 est relocalisé dans des speckles nucléaires où ces deux protéines interagissent (Figure 47). XopD possède une fonction de désSUMOylase et est capable de désSUMOyler AtMYB30 *in planta*, mais cette activité n'est pas nécessaire pour l'interaction entre XopD et AtMYB30. De plus, des tests de transactivation *in planta* ont permis de montrer que XopD diminue fortement l'activité transcriptionnelle d'AtMYB30. Le rôle biologique de l'interaction entre AtMYB30 et XopD est actuellement en cours d'étude dans l'équipe. Le fait qu'AtMYB30 soit ciblé par un effecteur bactérien renforce donc l'idée que ce FT possède un rôle majeur dans la régulation des réponses de défense.

III.2 AtMYB30 impliqué dans la régulation de processus développementaux

AtMYB30 est exprimé à des stades précoces du développement de la plante : **embryogénèse** et **développement des plantules**. Son rôle pendant l'embryogénèse est actuellement à l'étude, en collaboration avec M. Devic (Laboratoire Génome et Développement des Plantes, Perpignan). De façon intéressante, des données montrent que les VLCFA seraient importants pour le processus d'embryogénèse. En effet, le gène codant l'enzyme FAE1 (Fatty Acid Elongase 1), qui catalyse la biosynthèse des VLCFA, est exprimé exclusivement dans les embryons en développement, où la production de VLCFA est élevée (Rossak et al., 2001; Dietrich et al., 2005). Par ailleurs, l'une des 4 enzymes nécessaires à la biosynthèse des VLCFA, l'enzyme KCR (3-ketoacyl reductase), est codée par 2 gènes chez le Maïs : *GL8a* et *GL8b* (Rossak et al., 2001; Dietrich et al., 2005). La double mutation de ces deux gènes est létale car les embryons contenus dans les graines de ces doubles mutants présentent un développement anormal, en lien avec une composition en VLCFA fortement réduite. Ces données montrent donc que la biosynthèse des VLCFA est nécessaire au développement de l'embryon. On peut alors spéculer qu'AtMYB30 régulerait le processus d'embryogénèse *via* l'activation de ses gènes cibles appartenant à la voie de biosynthèse des VLCFA. Cette voie serait donc recrutée pour réguler deux processus biologiques distincts : embryogénèse et défense. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une analyse transcriptomique sur des graines provenant des différentes lignées d'*Arabidopsis* dérégulées pour l'expression d'*AtMYB30*. Il serait également intéressant d'étudier les MPT et les partenaires protéiques d'AtMYB30 dans ce contexte, *via* des approches similaires à celles présentées dans cette thèse.

Chez les plantes adultes, AtMYB30 a été récemment impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes liés à la voie de signalisation en **réponse aux brassinostéroïdes** (BR) (Li et al., 2009). Les BR sont des molécules régulant divers processus biologiques chez les plantes : différenciation vasculaire, sénescence ou réponses aux stress. L'expression d'*AtMYB30* est induite par un traitement BR, et *AtMYB30* a été identifié comme une cible directe de BES1, un FT qui régule des centaines de gènes impliqués dans les voies de transduction des BR. Ces résultats suggèrent donc qu'*AtMYB30*, en tant que cible directe de BES1, agirait pour amplifier le signal BR en aidant BES1 à activer ses cibles (Figure 40B).

Pour assurer sa fonction de régulateur des gènes brassinostéroïdes-dépendants, AtMYB30 interagirait potentiellement avec BAK1, situé en amont de BES1. En effet, les BR sont d'abord perçus par le récepteur-kinase BRI1, dont le domaine kinase s'active, ce qui provoque son association avec BAK1 et induit l'autophosphorylation de ces deux récepteurs (Li et al., 2002; Oh et al., 2009). Le complexe BAK1-BRI1 est alors soumis à une endocytose, ce qui permet la transduction du signal BR jusqu'au noyau où il va induire la déphosphorylation de plusieurs FT dont BES1 (Figure 40B). AtMYB30 pourrait donc agir à deux niveaux distincts de la voie de transduction des BR : dans les étapes finales, avec BES1, pour activer l'expression des gènes de réponse aux BR, et dans des étapes plus précoces, avec BAK1 pour activer la transduction du signal ou pour participer à une boucle de rétro-contrôle négatif de cette voie. BAK1 pourrait donc être un interacteur central d'AtMYB30, impliqué à la fois dans la régulation de la défense et des voies brassinostéroïdes-dépendantes. Cependant, on peut aussi émettre l'hypothèse que BAK1 interagirait avec AtMYB30 uniquement dans le cadre de la régulation des réponses de défense ou dans la régulation de la voie de transduction des BR.

De façon inattendue, AtMYB96 (Seo et al., 2009) et AtRan-BP1c (Kim et al., 2001) sont deux protéines impliquées dans la **régulation, via l'auxine, de la croissance des racines** chez Arabidopsis. En effet, *AtMYB96* est exprimé dans les racines où il contrôlerait négativement leur croissance *via* une régulation positive des voies de signalisation liées à l'auxine et à l'acide abscissique. Quant à AtRan-BP1c, il active la croissance des racines *via* la régulation de l'import nucléaire de protéines impliquées dans la transduction du signal lié à l'auxine. En parallèle, l'étude des lignées *pAtMYB30::GUS*, a permis de montrer que l'expression d'*AtMYB30* est induite dans l'apex des poils racinaires (voir Introduction IV.1.4). Toutes ces données sont en accord avec le fait qu'AtMYB30, AtMYB96 et AtRan-BP1c pourraient former un complexe protéique impliqué dans la régulation, *via* l'auxine, de la croissance des racines chez Arabidopsis. Par ailleurs, l'auxine affecte la résistance des plantes de façon variable en fonction de l'agent pathogène impliqué (Kazan and Manners, 2009). On pourrait donc émettre l'hypothèse que le complexe AtMYB30-AtMYB96-AtRan-BP1c agisse également sur la résistance en modulant un signal lié à l'auxine, en réponse à l'interaction avec un agent pathogène.

III.3 L'existence de protéines communes pour la régulation de la défense et d'autres processus biologiques

Tout comme AtMYB30, certains de ses partenaires sont impliqués dans la **défense** mais aussi dans **d'autres processus biologiques**. C'est le cas de BAK1, impliqué dans la régulation de la défense (He et al., 2007; Kemmerling et al., 2007) et des voies brassinostéroïdes-dépendantes (Li et al., 2002), et d'AtMYB96, dont l'expression est induite lors d'une interaction avec un agent pathogène (Geri et al., 1999) et des réponses au stress hydrique (Seo et al.,

2009). L'implication d'un facteur MYB dans la régulation d'un autre processus biologique, en plus de son rôle dans la défense, a été assez peu décrite chez les plantes. Cependant, on peut citer l'exemple du gène MYB atypique *AS1* qui possède un rôle dans la différenciation des cellules du méristème apical *via* les hormones gibbérellines et cytokinines. Il a été montré qu'il possédait également un rôle de régulateur négatif des défenses inductibles *via* l'activation de gènes JA- et SA-dépendants (Nurmburg et al., 2007).

En élargissant à d'autres protéines que les FT de type MYB, l'existence de protéines impliquées à la fois dans la régulation de la défense et de certains autres processus biologiques est plus fréquente. On peut citer l'exemple d'AtNUDT7, une protéine à domaine Nudix, qui module deux voies de défense distinctes, dépendantes ou non de NPR1, et qui est également impliquée dans le maintien de l'équilibre redox de la cellule (Ge et al., 2007). On peut aussi citer la protéine RING CaRFP1 du Poivron, qui fonctionne comme régulateur précoce des réponses de défense et de la tolérance au stress osmotique (Hong et al., 2007). Ces observations suggèrent que les plantes limiteraient le nombre de régulateurs impliqués dans la défense et dans d'autres processus biologiques en utilisant des **protéines régulatrices communes**. L'orientation de ces régulateurs vers tel ou tel processus pourrait s'effectuer *via* la présence d'interacteurs ou de MPT différents.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'existence de divers **partenaires protéiques** d'AtMYB30 et de suggérer la présence de plusieurs **modifications post-traductionnelles** sur cette protéine. Les nombreuses combinaisons possibles entre ces différents partenaires et modifications post-traductionnelles pourraient permettre le recrutement spécifique d'AtMYB30 dans des processus biologiques divers : régulation des réponses de défense, de l'embryogénèse, du développement des plantules, de la sénescence, de la floraison ou des voies brassinostéroïdes-dépendantes. AtMYB30 pourrait alors être utilisé, de façon similaire à c-Myb chez les animaux, comme modèle d'étude des modifications post-traductionnelles et des interactions protéine-protéine chez les MYB végétaux.

Matériel et Méthodes

Tableau 6. Primers utilisés dans cette étude.

Nom	Séquence	Polarité	Commentaires
AttB1-MYB123	5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatggga aagagagcaactactagtgtg	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-MYB123	5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacaagtga agtctcggagccaatc	(-)	Cloning in pDONR207
AttB1-MYB96	5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatggga agaccaccttgctg	(+)	Cloning in pDONR207
AttB2-MYB96	5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgtttaaca gaacatcccttctgtcctgc	(-)	Cloning in pDONR207
MYB30-S	5'tcaagagtgatgatgggaaggagt	(+)	Q-RT-PCR
MYB30-AS	5'gtccaccagaatcctcaaaca	(-)	Q-RT-PCR
β -tubulin4-S	5'ggagctacgcagacaactaaga	(+)	Q-RT-PCR
β -tubulin4-AS	5'cccacgaggatcatagtgtgcaactga	(-)	Q-RT-PCR

Constructions

Les primers utilisés sont listés dans le Tableau 6. Les plasmides ont été générés par la technologie Gateway (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Les produits PCR, entourés des sites attB ont été recombinés dans le vecteur pDONR207 (Invitrogen) *via* une réaction BP pour créer le clone d'entrée avec les sites attL. Les inserts clonés dans les clones d'entrée (pENTR) ont ensuite été recombinés dans les vecteurs de destination *via* une réaction LR, pour créer les constructions d'expression.

AtMYB96 a été amplifié en utilisant les primers AttB1-MYB96 et AttB2-MYB96, et AtMYB123 en utilisant les primers AttB1-MYB123 et AttB2-MYB123.

AtMYB30 a été amplifié comme décrit précédemment (Froidure et al., 2010, submitted).

Les protéines étiquetées avec -TAP, -3HA, -CFP ou -YFPv ont été générées par recombinaison de la construction d'entrée correspondante avec les vecteurs de destination *pBin19-P35S-GW-TAP*, *pBin19-P35S-GW-3HA*, *pBin19-P35S-GW-CFP* ou *pBin19-P35S-GW-YFPv*, respectivement (YFPv pour YFPvenus, une forme améliorée de la YFP (Nagai et al., 2002)).

Test de dégradation *in vitro*

Une dizaine de plantules d'*Arabidopsis* (7-10 jours après semis) sont prélevées, congelées à -80°C et broyées dans l'azote liquide. Les protéines totales sont extraites dans un tampon d'extraction (50mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% Cocktail inhibiteurs de protéases (Sigma), 5mM ATP). Puis après centrifugation, le surnageant est ajouté au tampon de dégradation (3mM Phosphocréatine, 0.01U/μL créatine kinase, 0.1mM DTT, 0.1 μg/μL ubiquitine), en présence de 100μM MG132/MG115 (dans du DMSO 0.4%) ou de DMSO seul. Les échantillons sont mis à incuber 10 min dans la glace puis 1, 2 ou 6 heures à 30°C. Le tampon de charge (Invitrogen) est ajouté pour stopper la réaction et les échantillons sont placés 10 min à 70°C avant d'être congelés à -20°C.

Inhibition du protéasome *in vivo*

Une vingtaine de plantules d'*Arabidopsis* sont récoltées 10 jours après semis et infiltrées sous vide avec une solution de MG132 à 100μM dans du DMSO 0,4%. Des plantules contrôle sont infiltrées uniquement avec du DMSO 0,4%. Les plantules sont laissées à incuber pendant 5h dans la solution ayant servi à l'infiltration, puis congelées dans l'azote liquide.

Chez *N. benthamiana*, les plantes exprimant transitoirement depuis 24h les constructions nécessaires sont infiltrées avec une solution de MG132 à 100μM dans du DMSO 0,4%. Des plantes contrôle sont infiltrées uniquement avec du DMSO 0,4%. Les tissus sont récoltés et congelés dans l'azote liquide 20h après l'ajout du MG132.

Coimmunoprecipitation et gels de protéines

Les extraits protéiques ont été réalisés comme décrit précédemment (Combiere et al., 2008). Pour les expériences de coimmunoprecipitation, l'extrait protéique est alors mis à incuber à 4°C sous agitation, pendant 3h, avec des billes anti-HA (Roche), prélavées avec le tampon TE (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 10% Glycerol, 1mM PMSF, Cocktail inhibiteurs Sigma, 0.5% PVPP). Après 3 lavages avec le tampon TE, l'élution est effectuée avec le tampon de charge NuPage (Invitrogen) (2x), pendant 10 min à 70°C. Les échantillons sont chargés sur un gel 1D gradient 4-12% NuPage (Invitrogen). Pour la détection des protéines étiquetées TAP ou HA, les blots sont incubés respectivement avec l'anticorps PAP (SIGMA) ou

anti-HA rat monoclonal (clone EF10; Roche), couplés HRP, à la dilution finale 1:5,000. Les protéines sont visualisées à l'aide du kit Immobilon (Millipore) dans les conditions standards.

Plantes et inoculations bactériennes

Les plantes d'*Arabidopsis* ont poussé dans des Jiffy, dans les conditions précédemment décrites (Journot-Catalino et al., 2006). Les inoculations bactériennes s'effectuent en infiltrant les feuilles de plantes de 4 semaines, à l'aide d'une seringue sans aiguille, avec une suspension bactérienne de la souche *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*AvrRpm1*) à la concentration de 5×10^7 Cfu/mL. Les prélèvements pour des analyses par Q-RT-PCR sont ensuite réalisés aux temps indiqués, et congelés à -80°C.

Recherche des interacteurs d'AtMYB30 par une approche protéomique

Expression transitoire chez *N. benthamiana* via *Agrobacterium*

Les constructions *P35S:AtMYB30-3HA*, *P35S:AtMYB123-3HA* et *P19* ont été utilisées pour transformer la souche C58C1 d'*Agrobacterium*. La transformation transitoire de *N. benthamiana* par *Agrobacterium* a été réalisée comme décrit précédemment (Rivas et al., 2004). Les échantillons sont prélevés 3 jours après infiltration, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Immunoprécipitation et électrophorèse

Les échantillons sont broyés en présence d'azote liquide et de sable de Fontainebleau et extraits dans 80mL de tampon d'extraction (TE) pour 200g de poudre foliaire. Le tampon TE est composé de 50mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM DTT, 10% Glycerol, 1mM PMSF, 1% Cocktail inhibiteurs de protéases (Sigma), 0.5% PVPP. L'extrait protéique est filtré 2 fois au travers d'un filtre Miracloth puis centrifugé à 11000 rpm, 15 min à 4°C. Le surnageant est alors mis à incuber à 4°C sous agitation, pendant 3h, avec des billes anti-HA (Roche), prélavées avec le tampon TE. Après 3 lavages avec le tampon TE, l'élution est effectuée avec le tampon de charge NuPage (Invitrogen) (2x), pendant 10 min à 70°C. Les échantillons sont chargés sur un gel 1D gradient 4-12% NuPage (Invitrogen). Après 1h de migration à 200V, le gel est coloré overnight au bleu de Coomassie (Fermentas).

Préparation des échantillons

Les pistes de migration des gels monodimensionnels sont découpées sur toute leur longueur en une dizaine de morceaux. Chaque morceau de gel est lavé 2 fois avec 100 µL d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM, ACN 50% pendant 10 minutes sous agitation. Ils sont réduits pendant 30 min dans une solution de bicarbonate d'ammonium 25mM contenant 10 mM de DTT avant d'être soumis à une alkylation par une solution de 50mM d'iodoacétamide dans le même tampon durant 30 min à l'obscurité. Les morceaux de gels sont ensuite séchés avant d'être réhydratés avec 20 µL de trypsine modifiée (Promega ; sequencing grade) à 10 ng/µL dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium puis incubés pendant une nuit à 37°C. Le surnageant est récupéré dans un eppendorf de 0,5 mL. Afin d'extraire les peptides, les morceaux de gel sont successivement extraits par 50 µL d'une solution d'acide formique 0,1%, ACN 40%, par 25 µL d'ACN 25%, acide formique 0,1% et finalement par 25 µL d'ACN 60%. Entre chaque extraction, les échantillons sont soumis au vortex puis aux ultrasons pendant 5 min. Les surnageants sont regroupés dans l'eppendorf initial puis évaporés à sec dans un évaporateur de type speedvac.

Les échantillons peptidiques à l'état sec peuvent être conservés au congélateur (-20°C). Avant l'analyse par spectrométrie de masse, les peptides issus de la digestion protéolytique sont remis en solution dans 20 µL du mélange d'ACN 5%, TFA 0,05% dans l'eau puis introduits dans le flacon dédié à l'injecteur automatique.

Acquisition des données

5 µL de la solution peptidique sont injectés en vue de l'analyse par le système en tandem NanoLC-MS/MS. Il est composé d'une chaîne HPLC de type Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdam, Hollande) associée par l'intermédiaire d'une source nanospray à un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne). Les peptides sont d'abord concentrés sur une pré-colonne de phase inverse C18 équilibrée dans 95% de solvant A (5% acetonitrile, 0,1% d'acide formique) et 5% de solvant B (80% acetonitrile, 0,1% d'acide formique). Ensuite, l'élution et la séparation s'effectuent sur une colonne capillaire remplie de phase inverse C18 de type PepMap (Dionex, 300µm de diamètre interne et 15 cm de long) en utilisant un gradient de solvant à contre-courant de 5% à 65% de solvant B dans le solvant A pendant 60 min et sous un débit de 300 nL/min.

Le spectromètre, calibré de manière externe, est utilisé selon un mode dépendant des données. Le balayage des ions moléculaires correspondant aux peptides (signal MS) est effectué entre les rapports de 300 à 2000 m/z avec une résolution maximale de 60000 pour 400 m/z. A chaque balayage, les 5 ions plus intenses possédant des charges 2+, 3+ ou 4+ sont sélectionnés selon un intervalle de 4 m/z et envoyés dans la trappe linéaire où ils sont fragmentés par collision avec des atomes d'azote sous une énergie de 35% (signal MS/MS). Les ions qui ont subi une première fragmentation sont exclus pendant 60 secondes avant d'être à nouveau sélectionnés.

Interprétation et validation des données

Les données acquises sur le spectromètre sont analysées avec le logiciel Xcalibur (version 2.0.6, Thermo Fisher Scientific). Les signaux MS/MS issus de la fragmentation des peptides sont récupérés grâce à l'outil informatique extract_msn intégré au logiciel Xcalibur pour créer une liste de pics. Cette liste est ensuite introduite dans le moteur de recherche MASCOT par l'intermédiaire du logiciel Mascot daemon (Mascot version 2.2.03, Matrix Sciences) en prenant 5 ppm pour la tolérance sur la masse du peptide et 0,8 Da pour celle des fragments. Une omission de coupure par la trypsine vis-à-vis de la séquence protéique est tolérée. La carbamidomethylation des cystéines est considérée comme une modification fixe et l'oxydation de la méthionine comme une modification variable. Les recherches sont effectuées en confrontant les résultats à 2 bases de données :

- la banque de données de protéines Swiss-Prot associée à TRembi, limitée aux végétaux supérieurs contenant 669639 séquences protéiques.
- la banque de données concernant la famille des solanacées SGN (Sol Genomic Network), et limitée aux étiquettes de séquences de Tabac et de Tomate contenant 60227 séquences.

Les données récupérées par le logiciel MASCOT sont ensuite filtrées par le logiciel MFPAQ (Bouyssie et al., 2007). En bref, cet outil permet de créer des listes de protéines validées pour un taux de faux positifs choisi. Pour cela, il s'appuie sur le logiciel MASCOT qui fournit un premier taux de faux positifs à partir des données brutes en effectuant une recherche sur une base dont l'enchaînement des séquences a été inversé (résultats acquis de manière aléatoire).

Pour les 2 banques considérées, un taux de faux positifs inférieur à 1,6 % a été choisi dans MFPAQ pour la création des listes de protéines validées.

Exploitation bioinformatique des résultats

Les listes ont été ensuite introduites dans le logiciel de traitement de données protéomiques Protein-Center (Proxeon Bioinformatics, Odense, Danemark) afin de déterminer les protéines spécifiquement représentées dans les différents échantillons. A l'intérieur de ces listes spécifiques, les protéines ont été regroupées soit selon un critère d'homologie de séquence dont le seuil de similarité était fixé à 60%, soit si elles présentaient des séquences identiques de longueur égale ou supérieure à 8 acides aminés. Ces regroupements permettent ensuite d'identifier les activités biologiques, les fonctions et les compartiments cellulaires définis par «Gene Ontology» (<http://www.geneontology.org>) auxquels les différents groupes se réfèrent.

Analyse par chromatographie d'exclusion stérique

Les protéines ont été extraites dans un tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% PVPP, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1% plant protease inhibitor cocktail (Sigma)) et centrifugés à 10 000g, à 4°C, pendant 10 min. La concentration protéique du surnageant a été déterminée avec le kit Bradford (Bio-Rad), en utilisant la BSA comme standard, et 1 mg de protéines ont été soumis à la chromatographie d'exclusion stérique. La filtration sur gel a été réalisée à 4°C en utilisant un système « AKTA-fast protein liquid chromatography » (Amersham) avec une colonne « HR 10/30 Superdex 200 high resolution » (Amersham). L'équilibration de la colonne et la chromatographie ont été réalisés dans le tampon d'extraction. Les fractions sont collectés tous les 0,4 mL et analysées par Western Blot.

Références

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.
- Abramovitch, R.B., and Martin, G.B.** (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 356-364.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B., and Martin, G.B.** (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J* **22**, 60-69.
- Abreu, M.E., and Munne-Bosch, S.** (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **60**, 1261-1271.
- Abuqamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R.A., and Mengiste, T.** (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *Plant J* **48**, 28-44.
- Achard, P., Renou, J.P., Berthome, R., Harberd, N.P., and Genschik, P.** (2008). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**, 656-660.
- Adie, B.A.T., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A., and Solano, R.** (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1665-1681.
- Afzal, A.J., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A.** (2008). Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 507-517.
- Aguilar, R.C., and Wendland, B.** (2003). Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 184-190.
- Aharoni, A., De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J* **28**, 319-332.
- Alfano, J.R., and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 385-414.
- Alonso, J.M., and Stepanova, A.N.** (2004). The ethylene signaling pathway. *Science* **306**, 1513-1515.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Ecker, J.R.** (2003). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2992-2997.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant. Mol. Biol.* **44**, 429-442.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3460-3479.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., and Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *Embo J* **24**, 2579-2589.
- 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**, 977-983.
- Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J., and Mischke, C.F.** (1990). Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K⁺/H⁺ and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol.* **92**, 215-221.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.F., Jones, J.D., and Parker, J.E.** (2002). Regulatory role of SGT1 in early *R* gene-mediated plant defenses. *Science* **295**, 2077-2080.
- Aviv, D.H., Rusterucci, C., Iii, B.F., Dietrich, R.A., Parker, J.E., and Dangl, J.L.** (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *lsd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant J.* **29**, 381-391.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., and Shirasu, K.** (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *Embo J* **25**, 2007-2016.
- Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugawara, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M.** (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* **435**, 979-982.
- Bahn, S.C., Lee, H.Y., Kim, H.J., Ryu, S.B., and Shin, J.S.** (2003). Characterization of Arabidopsis secretory phospholipase A2-gamma cDNA and its enzymatic properties. *FEBS Lett* **553**, 113-118.
- Bai, J.F., Choi, S.H., Ponciano, G., Leung, H., and Leach, J.E.** (2000). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1322-1329.
- Bajguz, A.** (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol Biochem* **45**, 95-107.
- Balagué, 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.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.P., Grossniklaus, U., and Chua, N.H.** (2001). LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev* **15**, 2613-2625.
- Bari, R., and Jones, J.D.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**, 473-488.
- Baudouin, E., Charpentreau, M., Roby, D., Marco, Y., Ranjeva, R., and Ranty, B.** (1997). Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family. Esterase activity towards short chain dinitrophenyl acylesters. *Eur. J. Biochem.* **248**, 700-706.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D., and Dangl, J.L.** (2004). Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* **16**, 2822-2835.
- Benayoun, B.A., and Veitia, R.A.** (2009). A post-translational modification code for transcription factors: sorting through a sea of signals. *Trends Cell Biol* **19**, 189-197.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D.C.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 266-292.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated

- resistance, is relocated to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**, 23-32.
- Blume, B., Nurnberger, 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**, 1425-1440.
- 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**, 742-744.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D., and Balague, C.** (2007). Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1*. *Plant Physiol* **145**, 465-477.
- Bouyssie, D., Gonzalez de Peredo, A., Mouton, E., Albigot, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J.P., and Monsarrat, B.** (2007). Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1621-1637.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., and Mundy, J.** (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* **47**, 532-546.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F., and Cammue, B.P.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 393-416.
- Brown, J.K.** (2003). A cost of disease resistance: paradigm or peculiarity? *Trends Genet* **19**, 667-671.
- Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R.** (2000). Biochemistry and molecular biology of plants (Rockville: American Society of Plant physiologists), pp. 1086-1094, 1115-1117, 1134-1135.
- Burch-Smith, T.M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2007). The functions of plant TIR domains. *Sci STKE* **2007**, pe46.
- Buttner, D., and Bonas, U.** (2002). Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J* **21**, 5313-5322.
- Buttner, D., and Bonas, U.** (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9**, 193-200.
- Cahill, M.A., Ernst, W.H., Janknecht, R., and Nordheim, A.** (1994). Regulatory squelching. *FEBS Lett* **344**, 105-108.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, S.A., and Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymbek, K., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2008). Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* **132**, 449-462.

- Century, K.S., Holub, E.B., and Staskawicz, B.J.** (1995). *NDR1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6597-6601.
- Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., and Staskawicz, B.J.** (1997). *NDR1*, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science* **278**, 1963-1965.
- Chao, Q., Rothemberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker, J.R.** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133-1144.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., and Kunkel, B.N.** (2007). Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20131-20136.
- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., and Peng, J.** (2009a). Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in Arabidopsis. *PLoS Genet* **5**, e1000440.
- Cheng, Y.T., Germain, H., Wiermer, M., Bi, D., Xu, F., Garcia, A.V., Wirthmueller, L., Despres, C., Parker, J.E., Zhang, Y., and Li, X.** (2009b). Nuclear Pore Complex Component MOS7/Nup88 Is Required for Innate Immunity and Nuclear Accumulation of Defense Regulators in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2503-2516.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, 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**, 497-500.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Ciardi, J.A., Tieman, D.M., Jones, J.B., and Klee, H.J.** (2001). Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene LeETR4 enhances the hypersensitive response to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 487-495.
- Ciardi, J.A., Tieman, D.M., Lund, S.T., Jones, J.B., Stall, R.E., and Klee, H.J.** (2000). Response to xanthomonas campestris pv. vesicatoria In tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression [In Process Citation]. *Plant Physiol* **123**, 81-92.
- Clark, K.L., Larsen, P.B., Wang, X., and Chang, C.** (1998). Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5401-5406.
- Clough, S.J., Fengler, K.A., Yu, I., Lippok, B., Smith, R.K., Jr., and Bent, A.F.** (2000). The Arabidopsis *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Conaway, R.C., Brower, C.S., and Conaway, J.W.** (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-1258.
- Coppinger, P., Repetti, P.P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A., and Staskawicz, B.J.** (2004). Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **40**, 225-237.
- Coquoz, J.L., Buchala, A., and Metraux, J.P.** (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol* **117**, 1095-1101.
- Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Kochner, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E.** (2002). Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim Biophys Acta* **1576**, 92-100.

- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A.** (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot* **60**, 1123-1132.
- Crawford, N.M.** (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* **57**, 471-478.
- Cunnac, S., Wilson, A., Nuwer, J., Kirik, A., Baranage, G., and Mudgett, M.B.** (2007). A conserved carboxylesterase is a SUPPRESSOR OF AVRBS1-ELICITED RESISTANCE in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 688-705.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Daniel, X., Sugano, S., and Tobin, E.M.** (2004). CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3292-3297.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B., and Roby, D.** (1999). A novel *myb* oncogene homolog in *Arabidopsis thaliana* related to the hypersensitive cell death. *Plant J.* **20**, 57-66.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., and Gallois, P.** (2000). Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 647-655.
- Davis, R.J.** (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* **103**, 239-252.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Egea, P.R., Bogre, L., and Grant, M.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo Journal* **26**, 1434-1443.
- Delaney, T.P.** (1997). Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Physiol.* **113**, 5-12.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* **330**, 115-120.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PopP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8024-8029.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R.** (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**, 2181-2191.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 457-466.
- Dietrich, C.R., Perera, M., Yandeu-Nelson, M.D., Meeley, R.B., Nikolau, B.J., and Schnable, P.S.** (2005). Characterization of two GL8 paralogs reveals that the 3-ketoacyl reductase component of fatty acid elongase is essential for maize (*Zea mays* L.) development. *Plant Journal* **42**, 844-861.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangl, J.L.** (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L.** (1995). Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A., and Ryan, C.A.** (1995). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol* **108**, 1741-1746.

- Dong, J., Chen, C., and Chen, Z.** (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* **51**, 21-37.
- Dow, M., Newman, M.A., and von Roepenack, E.** (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 241-261.
- Dreher, K., and Callis, J.** (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* **99**, 787-822.
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X.F., Yang, W.J., Wu, Y.M., Huang, Y.B., and Tang, Y.X.** (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry (Mosc)* **74**, 1-11.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.
- Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G., and Kogel, K.H.** (2004). Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Mol Biol* **55**, 1-15.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I.** (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* **70**, 879-886.
- Eulgem, T.** (2005). Regulation of the Arabidopsis defence transcriptome. *Trends Plant Sci.* **10**, 71-78.
- Eulgem, T., and Somssich, I.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Op. in Plant Biol.* **10**, 366-371.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**, 199-206.
- Fan, W., and Dong, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1377-1389.
- 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**, 265-276.
- Feng, C.P., Andreasson, E., Maslak, A., Mock, H.P., Mattsson, O., and Mundy, J.** (2004). Arabidopsis MYB68 in development and responses to environmental cues. *Plant Science* **167**, 1099-1107.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J* **20**, 5400-5411.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E.** (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell* **17**, 2601-2613.
- Fitzgerald, H.A., Chern, M.S., Navarre, R., and Ronald, P.C.** (2004). Overexpression of (At)NPR1 in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 140-151.
- Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Chern, M.S., and Ronald, P.C.** (2005). Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant J* **43**, 335-347.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J.A., Capati, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Kaiser, P.** (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**, 634-641.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.

- Flors, V., Ton, J., Doorn, R.v., Jakab, G., García-Agustín, P., and Mauch-Mani, B.** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **54**, 81-92.
- Fobert, P.R., and Despres, C.** (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 378-382.
- Froidure, S., Daniel, X., Canonne, J., Jauneau, A., Brière, C., Roby, D., and Rivas, S.** (2010, submitted). *AtsPLA₂-α* represses Arabidopsis hypersensitive cell death and defence *via* its interaction with the transcription factor AtMYB30.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.H., Durski, A.M., and Vierstra, R.D.** (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11519-11524.
- Gao, M.H., Wang, X., Wang, D.M., Xu, F., Ding, X.J., Zhang, Z.B., Bi, D.L., Cheng, Y.T., Chen, S., Li, X., and Zhang, Y.L.** (2009). Regulation of Cell Death and Innate Immunity by Two Receptor-like Kinases in Arabidopsis. *Cell Host & Microbe* **6**, 34-44.
- Gassmann, W., Hinsch, M.E., and Staskawicz, B.J.** (1999). The Arabidopsis *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.* **20**, 265-277.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G.** (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.
- Ge, X., Li, G.J., Wang, S.B., Zhu, H., Zhu, T., Wang, X., and Xia, Y.** (2007). AtNUDT7, a negative regulator of basal immunity in Arabidopsis, modulates two distinct defense response pathways and is involved in maintaining redox homeostasis. *Plant Physiol* **145**, 204-215.
- Gechev, T.S., and Hille, J.** (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* **168**, 17-20.
- Gelli, A., Higgins, V.J., and Blumwald, E.** (1997). Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279.
- Gendron, J.M., and Wang, Z.Y.** (2007). Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Current Op. in Plant Biol.* **10**, 436-441.
- Genger, R.K., Jurkowski, G.I., McDowell, J.M., Lu, H., Jung, H.W., Greenberg, J.T., and Bent, A.F.** (2008). Signaling pathways that regulate the enhanced disease resistance of Arabidopsis "defense, no death" mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1285-1296.
- Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.H., and Metraux, J.P.** (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *Plant J* **31**, 87-95.
- Geri, C., Cecchini, E., Giannakou, M.E., Covey, S.N., and Milner, J.J.** (1999). Altered patterns of gene expression in Arabidopsis elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 377-384.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.

- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**, 381-392.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- Godard, F., Lummerzheim, M., Saindrenan, P., Balagué, C., and Roby, D.** (2000). *Hxc-2*, an *Arabidopsis* mutant with altered hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant J.* **24**, 749-762.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Maldonado, J., Avila, C., Torre, F., Canas, R., Canovas, F.M., and Campbell, M.M.** (2004). Functional interactions between a glutamine synthetase promoter and MYB proteins. *Plant J* **39**, 513-526.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D.** (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* **276**, 18513-18518.
- Gopalan, S., and He, S.Y.** (1998). Disease resistance : beyond the resistance genes. *Trends Plant Sci.* **3**, 207-208.
- Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R., Loniello, A.O., He, S.Y., and Collmer, A.** (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death [see comments]. *Plant Cell* **8**, 1095-1105.
- Gou, M., Su, N., Zheng, J., Huai, J., Wu, G., Zhao, J., He, J., Tang, D., Yang, S., and Wang, G.** (2009). An F-box gene, CPR30, functions as a negative regulator of the defense response in *Arabidopsis*. *Plant J.*
- Govrin, E.M., and Levine, A.** (2002). Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Mol Biol* **48**, 267-276.
- Graumann, J., Dunipace, L.A., Seol, J.H., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Wold, B.J., and Deshaies, R.J.** (2004). Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics* **3**, 226-237.
- Greenberg, J.T.** (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094-12097.
- Greenberg, J.T., and Ausubel, F.M.** (1993). *Arabidopsis* mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J.* **4**, 327-341.
- Greenberg, J.T., and Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**, 201-211.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z.** (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**, 1122-1125.
- Guo, H., and Ecker, J.R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 40-49.
- Gutterson, N., and Reuber, T.L.** (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 465-471.
- Haglund, K., and Dikic, I.** (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* **24**, 3353-3359.
- Haglund, K., Di Fiore, P.P., and Dikic, I.** (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* **28**, 598-603.
- Hall, A.E., Findell, J.L., Schaller, G.E., Sisler, E.C., and Bleeker, A.B.** (2000). Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **123**, 1449-1458.

- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.J.** (1996). Resistance gene-dependant plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. In *Curr Opin Biotechnol*, pp. 177-193.
- Hay, R.T.** (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S.D., and Li, J.** (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Curr Biol* **17**, 1109-1115.
- He, S.Y., Nomura, K., and Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 181-206.
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Métraux, J.-P., and Nawrath, C.** (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J.* **36**, 342-352.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12217-12222.
- Heil, M.** (2002). Ecological costs of induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 345-350.
- Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R.** (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A.** (2007). Impairment of Cellulose Synthases Required for Arabidopsis Secondary Cell Wall Formation Enhances Disease Resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.
- Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D., and Saito, K.** (2007). Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6478-6483.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figeys, D., and Tyers, M.** (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-183.
- Hoerberichts, F.A., and Woltering, E.J.** (2003). Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* **25**, 47-57.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D., and Mundy, J.** (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Semin Cancer Biol* **17**, 166-187.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H., Mattsson, O., Jorgensen, L.B., Jones, J.D., Mundy, J., and Petersen, M.** (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell* **137**, 773-783.
- Hoisington, D., Neuffer, M.G., and Walbot, V.** (1982). Disease lesion mimics in maize. *Dev. Biol.* **93**, 381-388.

- Holt, B.F., 3rd, Hubert, D.A., and Dangl, J.L.** (2003). Resistance gene signaling in plants--complex similarities to animal innate immunity. *Curr Opin Immunol* **15**, 20-25.
- Holt, B.F., 3rd, Belkhadir, Y., and Dangl, J.L.** (2005). Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* **309**, 929-932.
- Hong, J.K., Choi, H.W., Hwang, I.S., and Hwang, B.K.** (2007). Role of a novel pathogen-induced pepper C3-H-C4 type RING-finger protein gene, CaRFPI, in disease susceptibility and osmotic stress tolerance. *Plant Mol Biol* **63**, 571-588.
- Hooks, S.B., and Cummings, B.S.** (2008). Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in cell growth and signaling. *Biochem Pharmacol* **76**, 1059-1067.
- Hotson, A., Chosed, R., Orth, K., and Mudgett, M.B.** (2003). Plant targets for *Xanthomonas campestris* type III cysteine protease effectors. In 11-th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (St.-Petersburg, Russia), pp. 45.
- Hu, X.Y., Neill, S.J., Cai, W.M., and Tang, Z.C.** (2004). Induction of defence gene expression by oligogalacturonic acid requires increases in both cytosolic calcium and hydrogen peroxide in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res* **14**, 234-240.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., and Meyerowitz, E.M.** (1995). Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* **269**, 1712-1714.
- Huang, C., Rajfur, Z., Yousefi, N., Chen, Z., Jacobson, K., and Ginsberg, M.H.** (2009). Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nat Cell Biol* **11**, 624-630.
- Huckelhoven, R., Dechert, C., and Kogel, K.H.** (2003). Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5555-5560.
- Innes, R.** (2003). New effects of type III effectors. *Mol Microbiol* **50**, 363-365.
- Introna, M., Luchetti, M., Castellano, M., Arsura, M., and Golay, J.** (1994). The myb oncogene family of transcription factors: potent regulators of hematopoietic cell proliferation and differentiation. *Semin Cancer Biol* **5**, 113-124.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001a). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y.** (2001b). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-4574.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Jambunathan, N., Siani, J.M., and McNellis, T.W.** (2001). A humidity-sensitive *Arabidopsis* copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell* **13**, 2225-2240.
- Jang, I.C., Yang, S.W., Yang, J.Y., and Chua, N.H.** (2007). Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochrome A signaling. *Genes & Dev.* **21**, 2100-2111.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* **19**, 4004-4014.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrstens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Embo J* **19**, 6150-6161.
- Joaquin, M., and Watson, R.J.** (2003). Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2389-2401.

- Johnson, C., Boden, E., and Arias, J.** (2003). Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of trans-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1846-1858.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D., and Kroj, T.** (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**, 3289-3302.
- Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., and Kuchitsu, K.** (2004). Identification of putative voltage-dependent Ca²⁺-permeable channels involved in cryptogein-induced Ca²⁺ transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 823-830.
- Kahn, A.** (1992). Signaling Pathways through P21(Ras) Small G-Proteins - Role of Gap. *M S-Medecine Sciences* **8**, 388-388.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S.I.** (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-314.
- Kalde, M., Barth, M., Somssich, I.E., and Lippok, B.** (2003). Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 295-305.
- Kanei-Ishii, C., Nomura, T., Takagi, T., Watanabe, N., Nakayama, K.I., and Ishii, S.** (2008). Fbxw7 acts as an E3 ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J Biol Chem* **283**, 30540-30548.
- Katagiri, F.** (2004). A global view of defense gene expression regulation--a highly interconnected signaling network. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 506-511.
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K., and Howe, G.A.** (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Op. in Plant Biol.* **11**, 428-435.
- Kaufmann, S.H., and Hengartner, M.O.** (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**, 526-534.
- Kaunisto, A., Kochin, V., Asaoka, T., Mikhailov, A., Poukkula, M., Meinander, A., and Eriksson, J.E.** (2009). PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitylation and stability. *Cell Death Differ* **16**, 1215-1226.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648-651.
- Kazan, K., and Manners, J.M.** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **14**, 373-382.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255-266.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S.A., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J.E., Mussig, C., Thomma, B.P., Albrecht, C., de Vries, S.C., Hirt, H., and Nurnberger, T.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol* **17**, 1116-1122.
- Kepinski, S., and Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Kesarwani, M., Yoo, J., and Dong, X.** (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**, 336-346.
- Kim, H.S., and Delaney, T.P.** (2002). Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell* **14**, 1469-1482.

- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6496-6501.
- Kim, K.C., Fan, B., and Chen, Z.** (2006). Pathogen-Induced *Arabidopsis* WRKY7 Is a Transcriptional Repressor and Enhances Plant Susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* **142**, 1180-1192.
- Kim, S.H., and Roux, S.J.** (2003). An *Arabidopsis* Ran-binding protein, AtRanBP1c, is a co-activator of Ran GTPase-activating protein and requires the C-terminus for its cytoplasmic localization. *Planta* **216**, 1047-1052.
- Kim, S.H., Arnold, D., Lloyd, A., and Roux, S.J.** (2001). Antisense expression of an *Arabidopsis* ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *Plant Cell* **13**, 2619-2630.
- Kirik, A., and Mudgett, M.B.** (2009). SOBER1 phospholipase activity suppresses phosphatidic acid accumulation and plant immunity in response to bacterial effector AvrBsT 10.1073/pnas.0903859106. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 20532-20537.
- Kirik, V., Lee, M.M., Wester, K., Herrmann, U., Zheng, Z., Oppenheimer, D., Schiefelbein, J., and Hulskamp, M.** (2005). Functional diversification of MYB23 and GL1 genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* **132**, 1477-1485.
- Kjemtrup, S., Nimchuck, Z., and L., D.J.** (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion of Microbiol. and Immunol.* **3**, 73-78.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., and Bishop, J.M.** (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *V-MYB* and its cellular progenitor *C-MYB* : the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**, 453-463.
- Knoth, C., Ringler, J., Dangl, J.L., and Eulgem, T.** (2007). *Arabidopsis* WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 120-128.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., and Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2940-2945.
- Kranz, H., Scholz, K., and Weisshaar, B.** (2000). *C-MYB* oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J* **21**, 231-235.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., and Weisshaar, B.** (1998). Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 263-276.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- Kurosawa, K.** (1926). Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum* on Rice plants., T.o.t.N.H. Society, ed (Formosa), pp. 213-227.
- Lacomme, C., and Roby, D.** (1999). Identification of new early markers of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **459**, 149-153.
- Lacomme, C., and Santa Cruz, S.** (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 7956-7961.
- Lam, E.** (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 305-315.
- Lam, E., del Pozo, O., and Pontier, D.** (1999). BAXing in the hypersensitive response. *Trends Plant Sci.* **4**, 419-421.

- 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.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E.** (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J* **16**, 223-233.
- 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 glauca* cells. *Plant Cell* **14**, 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.
- Lee, H.Y., Bahn, S.C., Shin, J.S., Hwang, I., Back, K., Doelling, J.H., and Ryu, S.B.** (2005). Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants. *Prog Lipid Res* **44**, 52-67.
- Lee, J., Nam, J., Park, H.C., Na, G., Miura, K., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Baek, D., Kim, D.H., Jeong, J.C., Kim, D., Lee, S.Y., Salt, D.E., Mengiste, T., Gong, Q., Ma, S., Bohnert, H.J., Kwak, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Yun, D.J.** (2007). Salicylic acid-mediated innate immunity in Arabidopsis is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant J* **49**, 79-90.
- Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (2002). Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**, 611-618.
- Lee, M.W., Qi, M., and Yang, Y.** (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice *MYB* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 527-535.
- Leyser, O.** (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biol.* **16**, R424-R433.
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.M., and Shao, F.** (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **315**, 1000-1003.
- Li, J., and Nam, K.H.** (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* **295**, 1299-1301.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**, 319-331.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., and Tapio Palva, E.** (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* **46**, 477-491.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., and Walker, J.C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213-222.
- Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., and Yin, Y.** (2009). Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* **58**, 275-286.
- Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X., and Zhou, J.M.** (2005). Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12990-12995.
- Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H., and Greenberg, J.T.** (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* **17**, 2636-2641.
- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwajri, S., and Chang, C.S.** (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *Embo Journal* **21**, 4037-4048.

- Lippold, F., Sanchez, D.H., Musialak, M., Schlereth, A., Scheible, W.R., Hinch, D.K., and Udvardi, M.K.** (2009). AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**, 1761-1772.
- Lipsick, J.S.** (1996). One billion years of MYB. *Oncogene* **13**, 223-235.
- Liu, J., and Coaker, G.** (2008). Nuclear trafficking during plant innate immunity. *Mol Plant* **1**, 411-422.
- Llorente, F., Muskett, P., Sanchez-Vallet, A., Lopez, G., Ramos, B., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L., Parker, J., and Molina, A.** (2008). Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol Plant* **1**, 496-509.
- Lopez, M.A., Bannenberg, G., and Castresana, C.** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 420-427.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- 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**, 263-271.
- Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balagué, C., and Roby, D.** (2004). VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell* **16**, 2217-2232.
- Ludwig, A.A., Romeis, T., and Jones, J.D.** (2004). CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot* **55**, 181-188.
- Lund, S.T., Stall, R.E., and Klee, H.J.** (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**, 371-382.
- Luo, M., Dennis, E.S., Berger, F., Peacock, W.J., and Chaudhury, A.** (2005). MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17531-17536.
- Luo, Y., Caldwell, K.S., Wroblewski, T., Wright, M.E., and Michelmore, R.W.** (2009). Proteolysis of a Negative Regulator of Innate Immunity Is Dependent on Resistance Genes in Tomato and *Nicotiana benthamiana* and Induced by Multiple Bacterial Effectors. *Plant Cell* **21**, 2458-2472.
- Ma, W., and Berkowitz, G.A.** (2007). The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology* **9**, 2571-2585.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-754.
- Mackey, D., Belkadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence Effector avrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., and Frohlich, K.U.** (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* **9**, 911-917.
- Mandaokar, A., and Browse, J.** (2009). MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**, 851-862.
- Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). Myb transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**, 67-73.
- Matarasso, N., Schuster, S., and Avni, A.** (2005). A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase gene expression. *Plant Cell* **17**, 1205-1216.

- Matsui, K., Umemura, Y., and Ohme-Takagi, M.** (2008). AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* **55**, 954-967.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 409-414.
- May, M.J., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.J.** (1996). Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* **110**, 1367-1379.
- Mayer, B., and Hemmens, B.** (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **22**, 477-481.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., and Kazan, K.** (2005). Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiol* **139**, 949-959.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.-H., and Staskawicz, B.J.** (1998). Guccorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J.* **14**, 247-257.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., and Weisshaar, B.** (2005). The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 1083-1096.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., and He, S.Y.** (2008). A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J* **55**, 979-988.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., and Dietrich, R.** (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE 1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2551-2565.
- 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**, 1027-1034.
- Millar, A.A., and Gubler, F.** (2005). The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **17**, 705-721.
- Mittler, R., and Rizhsky, L.** (2000). Transgene-induced lesion mimic. *Plant. Mol. Biol.* **44**, 335-344.
- Mittler, R., Shulaev, V., and Lam, E.** (1995). Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plant expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* **7**, 29-42.
- Miura, K., Jin, J.B., and Hasegawa, P.M.** (2007a). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 495-502.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.J., and Hasegawa, P.M.** (2007b). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1403-1414.
- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G., Baek, D., Koo, Y.D., Jin, J.B., Bressan, R.A., Yun, D.J., and Hasegawa, P.M.** (2005). The

- Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7760-7765.
- Mizushima, N.** (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Dev.* **21**, 2861-2873.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R., and Salgado, I.** (2005). Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* **579**, 3814-3820.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., and Baulcombe, D.C.** (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *Embo J* **21**, 4511-4519.
- Molinari, E., Gilman, M., and Natesan, S.** (1999). Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *Embo J* **18**, 6439-6447.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J.F., and Martin, C.** (1996). Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-1532.
- Mudgett, M.B.** (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 509-531.
- Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., and Parker, J.E.** (2002). Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of *R* gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* **14**, 979-992.
- Mussig, C., Lisso, J., Coll-Garcia, D., and Altmann, T.** (2006). Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biol.* **8**, 291-296.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., and Yoshida, S.** (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* **33**, 887-898.
- Nasr, R., Chiari, E., El-Sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., de The, H., Pique, C., and Bazarbachi, A.** (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappa B activation. *Blood* **107**, 4021-4029.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**, 650-655.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436-439.
- Nawrath, C., and Métraux, J.-P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Metraux, J.P.** (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**, 275-286.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2001). The *Arabidopsis TT2* gene encodes an R2R3-MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.
- Ness, S.A.** (1999). Myb binding proteins: regulators and cohorts in transformation. *Oncogene* **18**, 3039-3046.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C.** (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**, 969-972.

- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**, 220-223.
- Noutoshi, Y., Ito, T., Seki, M., Nakashita, H., Yoshida, S., Marco, Y., Shirasu, K., and Shinozaki, K.** (2005). A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant J* **43**, 873-888.
- Nurmburg, P.L., Knox, K.A., Yun, B.W., Morris, P.C., Shafiei, R., Hudson, A., and Loake, G.J.** (2007). The developmental selector AS1 is an evolutionarily conserved regulator of the plant immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18795-18800.
- Oh, M.H., Wang, X., Kota, U., Goshe, M.B., Clouse, S.D., and Huber, S.C.** (2009). Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 658-663.
- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Tanaka, K.** (2009). Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO pathways in *E. coli*: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* **50**, 1049-1061.
- Onate-Sanchez, L., and Singh, K.B.** (2002). Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol* **128**, 1313-1322.
- Overmyer, K., Brosche, M., and Kangasjarvi, J.** (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**, 335-342.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., and Kangasjärvi, J.** (2000). Ozone-sensitive Arabidopsis *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* **12**, 1849-1862.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A., and Palme, K.** (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**, 321-337.
- Park, C.Y., Lee, J.H., Yoo, J.H., Moon, B.C., Choi, M.S., Kang, Y.H., Lee, S.M., Kim, H.S., Kang, K.Y., Chung, W.S., Lim, C.O., and Cho, M.J.** (2005). WRKY group IIId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett* **579**, 1545-1550.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J.** (1996). Characterization of *eds1*, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.
- Parry, G., and Estelle, M.** (2006). Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 152-156.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., and Saedler, H.** (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J* **6**, 3553-3558.
- Peck, S.C.** (2006). Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J* **45**, 512-522.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.

- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A., and Stanley, J.** (2007). Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* **362**, 428-440.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., and Delledonne, M.** (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 1094-1105.
- Pontier, D., Balagué, C., and Roby, D.** (1998). The hypersensitive response . A programmed cell death associated with resistance. *C. R. Acad. Sci. Paris* **321**, 721-734.
- Pontier, D., Miao, Z.H., and Lam, E.** (2001). Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.* **27**, 529-538.
- Pontier, D., Mittler, R., and Lam, E.** (2002). Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. *Plant J* **30**, 499-509.
- 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**, 507-521.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R.M., Roby, D., and Lam, E.** (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol Biol* **39**, 1243-1255.
- Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **40**, 979-995.
- Quattrocchio, F., Wing, J., van der Woude, K., Souer, E., de Vetten, N., Mol, J., and Koes, R.** (1999). Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433-1444.
- Raffaele, S.** (2006). Analyse fonctionnelle d'AtMYB30, un régulateur transcriptionnel impliqué dans le contrôle du programme de mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*. (Thèse: Toulouse III), pp. 165.
- Raffaele, S., Rivas, S., and Roby, D.** (2006). An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett* **580**, 3498-3504.
- Raffaele, S., Leger, A., and Roby, D.** (2009). Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant signaling & behavior* **4**, 94-99.
- Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E., Mongrand, S., Domergue, F., and Roby, D.** (2008). A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 752-767.
- Ramsay, N.A., and Glover, B.J.** (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* **10**, 63-70.
- Rentel, M.C., and Knight, M.R.** (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1471-1479.
- Reyes, J.L., and Chua, N.H.** (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* **49**, 592-606.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.
- Rivas, S., and Thomas, C.M.** (2005). Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 395-436.

- Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2001). A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J* **28**, 123-133.
- Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* **16**, 1139-1149.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 537-542.
- 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.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, Klessig, D.F., Hirt, H., and Jones, J.D.G.** (1999). Rapid Avr9 and Cf9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves. Convergence of resistance gene, elicitors, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-288.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., and Paz-Ares, J.** (1998). More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 273-284.
- Ronald, P.C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K.S., McCouch, S., and Tanksley, S.D.** (1992). Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa21. *Mol Gen Genet* **236**, 113-120.
- Rooney, H.C., Van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., and de Wit, P.J.** (2005). Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783-1786.
- Rossak, M., Smith, M., and Kunst, L.** (2001). Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* **46**, 717-725.
- Runyon, J.B., Mescher, M.C., and De Moraes, C.M.** (2008). Parasitism by *Cuscuta pentagona* attenuates host plant defenses against insect herbivores. *Plant Physiol* **146**, 987-995.
- Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., and de Vries, S.C.** (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* **16**, 3216-3229.
- 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**, 885-891.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M.** (1998). *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5812-5817.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P.** (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-1653.
- Sattar, A.A., and Haque, R.** (2007). Cytosolic PLA2 in zymogen granule fusion and amylase release: inhibition of GTP-induced fusion by arachidonyl trifluoromethyl ketone points to cPLA2 in G-protein-mediated secretory vesicle fusion. *J Biochem* **141**, 77-84.
- Schaller, G.E., Ladd, A.N., Lanahan, M.B., Spanbauer, A.B., and Bleecker, J.** (1995). The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **270**, 12526-12530.
- Schrammeijer, B., Risseuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., and Hooykaas, P.J.** (2001). Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr Biol* **11**, 258-262.
- Schulze-Lefert, P., and Bieri, S.** (2005). Plant sciences. Recognition at a distance. *Science* **308**, 506-508.
- Semsey, S., Virnik, K., and Adhya, S.** (2005). A gamut of loops: meandering DNA. *Trends Biochem Sci* **30**, 334-341.

- Seo, P.J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J.Y., Lee, Y.N., Kim, S.G., Lee, Y.H., Park, W.J., and Park, C.M.** (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**, 275-289.
- Seo, Y.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. and Cha, N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**, 995-999.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nurnberger, T., Martin, G.B., and Sheen, J.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* **4**, 17-27.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W.** (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- Shapiro, A.D., and Zhang, C.** (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 1089-1101.
- Shen, Q.H., and Schulze-Lefert, P.** (2007). Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *Embo J* **26**, 4293-4301.
- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P.** (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**, 1098-1103.
- Shinshi, H.** (2008). Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid. *Plant Science Ethylene Biology* **175**, 18-23.
- Shinshi, H., Mohnen, D., and Meins, F.** (1987). Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 89-93.
- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J., and Klessig, D.F.** (2002). A Gain-of-Function mutation in an Arabidopsis Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat Type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* **14**, 3149-3162.
- Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci* **8**, 252-258.
- Siewers, V., Smedsgaard, J., and Tudzynski, P.** (2004). The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3868-3876.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L., Cookson, B.T., and Aderem, A.** (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-1253.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptinal cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development* **12**, 3703-3714.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I., and Paz-Ares, J.** (1995). Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *Embo J* **14**, 1773-1784.
- Spassieva, S., Markham, J.E., Hille, J.** (2002). The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant Journal* **32**, 561-572.

- Sramko, M., Markus, J., Kabat, J., Wolff, L., and Bies, J.** (2006). Stress-induced inactivation of the c-Myb transcription factor through conjugation of SUMO-2/3 proteins. *J Biol Chem* **281**, 40065-40075.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-456.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., and Brisson, N.** (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat Biotechnol* **19**, 769-772.
- Sugimoto, K., Takeda, S., and Hirochika, H.** (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon *Tto1* and defense-related genes. *Plant Cell* **12**, 2511-2527.
- Suzuki, K., and Shinshi, H.** (1995). Transient Activation and Tyrosine Phosphorylation of a Protein Kinase in Tobacco Cells Treated with a Fungal Elicitor. *Plant Cell* **7**, 639-647.
- Takken, F.L., Albrecht, M., and Tameling, W.I.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 383-390.
- Talke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J., and Sanders, D.** (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci* **8**, 286-293.
- Tashiro, S., Sumi, T., Uozumi, N., Shimizu, T., and Nakamura, T.** (2004). B-Myb-dependent regulation of c-Myc expression by cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **279**, 17715-17722.
- The Arabidopsis Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* **279**, 26370-26377.
- Ton, J., and Mauch-Mani, B.** (2004). Beta-amino-butyric acid induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* **38**, 119-130.
- Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.** (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 27-34.
- Tornero, P., Chao, R.A., Luthin, W.N., Goff, S.A., and Dangl, J.L.** (2002a). Large-Scale Structure --Function Analysis of the *Arabidopsis* RPM1 Disease Resistance Protein. *Plant Cell* **14**, 435-450.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (2002b). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**, 1005-1015.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2002). *Arabidopsis gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 517-522.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91phox*). *Plant J* **14**, 365-370.
- Towney, H.E., McDonald, K., Jenkins, G.I., Knight, M.R., and Leaver, C.J.** (2005). Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium dependent manner. *Biological Chemistry* **386**, 161-166.

- Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y., and Roby, D.** (2001). HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of the hypersensitive cell death. *Plant J*.
- Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M.** (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J* **46**, 14-33.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693-698.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M.J., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J.M.** (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Vailleau, F.** (2002). Rôle d'AtMYB30, facteur de transcription associé à la mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis* : analyse de lignées transgéniques et recherche des cibles par analyse du transcriptome. thèse de l'université Paul Sabatier.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.L., Triantaphylides, C., and Roby, D.** (2002). A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10179-10184.
- van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998a). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biol.* **8**, 226-227.
- van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998b). Plant disease resistance proteins and the gene for gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**.
- van der Hoorn, R.A.L., and Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- van Doorn, W.G., and Woltering, E.J.** (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10**, 117-122.
- 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.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., and Linthorst, H.J.** (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat Biotechnol* **18**, 779-783.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M.** (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**, 137-142.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E.** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**, 1191-1208.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wakabayashi, T., and Karbowski, M.** (2001). Structural changes of mitochondria related to apoptosis. *Biol Signals Recept* **10**, 26-56.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X.** (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* **2**, e123.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X.** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**, 1784-1790.

- Wang, K.L., Li, H., and Ecker, J.R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14 Suppl**, S131-S151.
- Wang, W., Wen, Y., Berkey, R., and Xiao, S.** (2009). Specific Targeting of the Arabidopsis Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew 10.1105/tpc.109.067587. *Plant Cell* **21**, 2898-2913.
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J.E., Tsegaye, Y., Dunn, T.M., Wang, G.-L., Bellizzi, M., Parsons, J.F., Morrissey, D., Bravo, J.E., Lynch, D.V., and Xiao, S.** (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1-17.
- Ward, J.M., Pei, Z.M., and Schroeder, J.I.** (1995). Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *Plant Cell* **7**, 833-844.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A.** (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**, 1937-1951.
- Weston, K., and Bishop, J.M.** (1989). Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* **58**, 85-93.
- White, P.J., and Broadley, M.R.** (2003). Calcium in plants. *Ann Bot (Lond)* **92**, 487-511.
- Wiermer, M., Feys, B.J., and Parker, J.E.** (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 383-389.
- Wiermer, M., Palma, K., Zhang, Y., and Li, X.** (2007). Should I stay or should I go? Nucleocytoplasmic trafficking in plant innate immunity. *Cell Microbiol* **9**, 1880-1890.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001a). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001b). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Wulf, J., Pascuzzi, P.E., Fahmy, A., Martin, G.B., and Nicholson, L.K.** (2004). The Solution Structure of Type III Effector Protein AvrPto Reveals Conformational and Dynamic Features Important for Plant Pathogenesis. *Structure* **12**, 1257-1268.
- Xiao, F., Tang, X., and Zhou, J.M.** (2001). Expression of 35S::Pto globally activates defense-related genes in tomato plants. *Plant Physiol* **126**, 1637-1645.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). *COI1*: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Zou, X., Yang, G., Komatsu, S., and Shen, Q.J.** (2006). Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J* **46**, 231-242.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1919-1935.
- Xu, Q., and Reed, J.C.** (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* **1**, 337-346.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B., and Chen, Z.** (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* **18**, 1310-1326.
- Yamada, T.** (1993). The role of auxin in plant-disease development. *Annu Rev Phytopathol* **31**, 253-273.
- Yan, J.B., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z.Y., Zhang, W.G., Qi, T.C., Cheng, Z.W., Peng, W., Luo, H.B., Nan, F.J., Wang, Z., and Xie, D.X.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.

- Yang, S.H., and Sharrocks, A.D.** (2006). Convergence of the SUMO and MAPK pathways on the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Biochem Soc Symp*, 121-129.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., and Wu, K.** (2005). Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol Biol* **58**, 585-596.
- Yi, H.C., Joo, S., Nam, K.H., Lee, J.S., Kang, B.G., and Kim, W.T.** (1999). Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant. Mol. Biol.* **41**, 443-454.
- Yip, C.K., and Strynadka, N.C.** (2006). New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci* **31**, 223-230.
- Yoo, J.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Heo, W.D., Cheong, M.S., Park, H.C., Kim, M.C., Moon, B.C., Choi, M.S., Kang, Y.H., Lee, J.H., Kim, H.S., Lee, S.M., Yoon, H.W., Lim, C.O., Yun, D.J., Lee, S.Y., Chung, W.S., and Cho, M.J.** (2005). Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in arabidopsis. *J Biol Chem* **280**, 3697-3706.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D., and Doke, N.** (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**, 706-718.
- Yu, D., Chen, C., and Chen, Z.** (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**, 1527-1540.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J.** (2004). Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15811-15816.
- Zeng, L.R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B.H., Leung, H., and Wang, G.L.** (2004). Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* **16**, 2795-2808.
- Zhang, J., Shao, F., Cui, H., Chen, L.J., Li, H.T., Zou, Y., Long, C.Z., Lan, L.F., Chai, J.J., Chen, S., Tang, X.Y., and Zhou, J.M.** (2007). A Pseudomonas syringae effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-Induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe* **1**, 175-185.
- Zhang, S.Q., and Liu, Y.D.** (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* **13**, 1877-1889.
- Zhang, X., Garretton, V., and Chua, N.H.** (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* **19**, 1532-1543.
- Zhang, Y., Tessaro, M.J., Lassner, M., and Li, X.** (2003). Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**, 2647-2653.
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E., and Lloyd, A.** (2008). The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* **135**, 1991-1999.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., and Zhang, W.H.** (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 206-217.
- Zheng, Z., Qamar, S.A., Chen, Z., and Mengiste, T.** (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* **48**, 592-605.

- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P.** (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**, 2748-2752.
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., and Schulze-Lefert, P.** (2001). Cell-Autonomous Expression of Barley Mla1 Confers Race-Specific Resistance to the Powdery Mildew Fungus via a Rar1-Independent Signaling Pathway. *Plant Cell* **13**, 337-350.
- Zhou, J., Tang, X., and Martin, J.B.** (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* **16**, 3207-3218.
- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., and Ye, Z.H.** (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 248-266.
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca(2+)-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2751-2755.
- Zipfel, C., and Felix, G.** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**, 353-360.
- 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**, 764-767.

AUTHOR : Solène FROIDURE

TITLE : Identification and characterization of interacting partners of AtMYB30, an *Arabidopsis thaliana* transcription factor involved in the regulation of the hypersensitive response.

PhD SUPERVISORS : Dominique ROBY and Susana RIVAS

ABSTRACT :

AtMYB30, a member of the MYB-R2R3 transcription factor family, is a positive regulator of the hypersensitive cell death associated to plant response to pathogen attack. This thesis has focused on the search and characterization of AtMYB30 interacting partners. In a previous yeast two-hybrid screen, two AtMYB30 putative interacting proteins had been identified: a secretory phospholipase A2 (*At*PLA₂- α) and a RING finger protein with a putative E3 ubiquitin ligase function (MIP1). *At*PLA₂- α and MIP1 physically interact with AtMYB30 *in planta* and have been characterized as negative regulators of AtMYB30-mediated resistance responses. Finally, a proteomic approach was used to identify new AtMYB30 interacting partners. Functional validation of these AtMYB30 putative partners is in progress.

Key words : *Arabidopsis thaliana*, hypersensitive response, plant resistance, MYB transcription factor, phospholipase, ubiquitination, proteomique.

AUTEUR : Solène FROIDURE

TITRE : Identification et caractérisation d'interacteurs d'AtMYB30, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*.

DIRECTEURS DE THESE : Dominique ROBY et Susana RIVAS

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Le 8 Juillet 2010, à Toulouse

RESUME :

AtMYB30, qui appartient à la famille des facteurs de transcription de type MYB-R2R3, est un régulateur positif de la mort cellulaire hypersensible, une réponse de résistance mise en place par la plante en réponse à l'attaque par un agent pathogène. Ce travail de thèse s'est focalisé sur la recherche et la caractérisation d'interacteurs protéiques d'AtMYB30. Précédemment, dans un crible double-hybride chez la Levure, plusieurs interacteurs putatifs d'AtMYB30 avaient été identifiés : une protéine de type phospholipase A2 sécrétée (*AtsPLA₂-α*) et une protéine de type RING finger avec une fonction d'E3 ubiquitine ligase putative (MIP1). *AtsPLA₂-α* et MIP1 interagissent physiquement avec AtMYB30 *in planta* et sont des régulateurs négatifs de la résistance conférée par AtMYB30. Par ailleurs, une recherche sans *a priori* des protéines interagissant avec AtMYB30 a été effectuée par une approche protéomique. La validation fonctionnelle des partenaires putatifs identifiés est actuellement en cours.

MOTS CLEFS : *Arabidopsis thaliana*, réponse hypersensible, résistance, facteur de transcription MYB, phospholipase, ubiquitination, protéomique.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biosciences végétales

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borde Rouge, BP52627, Castanet-Tolosan Cedex, France.