



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par  
Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)  
Discipline ou spécialité :  
Interactions Plantes-Microorganismes

---

Présentée et soutenue par

Amaury NARS

le : 19 Février 2013

Titre :

Caractérisation structurale et perception par la plante hôte *Medicago truncatula* des chitosaccharides pariétaux d'*Aphanomyces euteiches*, parasite de légumineuses

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, LRSV (UMR5546 CNRS-UPS)

Directeurs de Thèse :

Directeur: Arnaud BOTTIN, Maître de Conférences, UT3, Toulouse

Co-directeur: Judith FLIEGMANN, Chargé de Recherche contractuel, INRA, Toulouse

Membres du jury :

Frédéric BRUNNER, Independent Research Group Leader, Eberhard-Karls University, Tuebingen

Jean-Paul LATGE, Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

Franck PANABIERES, Directeur de Recherche, INRA, Sophia-Antipolis

Christophe ROUX, Professeur des Universités, UT3, Toulouse

Arnaud BOTTIN, Maître de Conférences, UT3, Toulouse

Judith FLIEGMANN, Chargé de Recherche Contractuel, INRA, Toulouse

*“Every adventure requires a first step. Trite, but true, even here.”*

*The Cheshire Cat*

## **REMERCIEMENTS**

*Je remercie Bernard Dumas pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses encouragements et son soutien.*

*Je remercie mes directeurs de thèse, Arnaud Bottin et Judith Fliegmann, pour la patience dont ils ont fait preuve à mon égard au cours de ces quelques années, leur disponibilité et le soutien qu'ils m'ont apportés en particulier lorsque nous nous sommes retrouvés dans des impasses.*

*Mes remerciements vont plus spécialement à Claude Lafitte pour tout ce qu'il m'a appris, les discussions que nous avons eues, et son importante participation à ce projet.*

*Je remercie Vincent Bulone du Royal Institute of Technology de Stockholm (Suède) et Laurent Heux du CERMAV de Grenoble ainsi que leurs équipes pour leur collaboration dans ce projet, et en particulier Tinaïg Lecostaouec, qui ont permis de faire des avancées significatives dans cette étude.*

*Je remercie Jean-Jacques Bono du LIPM (INRA) pour la coordination du projet ANR SymPaSignal auquel j'ai pu participer, ainsi que pour son soutien personnel.*

*Je remercie tous mes stagiaires (François, Anne, Laurent et Salona et aussi ceux qui n'étaient pas les miens : Julie, Elodie et Marine) avec lesquels j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.*

*Merci à Thomas avec qui j'ai partagé de très bons moments depuis que nous avons intégré l'équipe il y a cinq ans et merci à Catherine, Cécilia, Daniel, Diana, Donia, Sophie et Valérie dont l'amitié m'est précieuse et qui m'ont aidé à traverser les difficultés.*

*Merci aussi à toutes les personnes du LRSV pour leur bienveillance à mon égard et leur implication de près ou de loin dans mon projet.*

*Enfin je remercie toute ma famille qui m'a toujours soutenu et poussé à atteindre mes objectifs, malgré les épreuves que nous avons traversées.*

*Merci à toi Marine pour avoir toujours cru en moi et m'avoir soutenu quelle que fut la distance qui nous a séparés.*

## RESUME

*Aphanomyces euteiches* est un oomycète parasite racinaire des légumineuses causant des pertes de rendement récurrentes. La paroi d'*A.euteiches* contient 10% de *N*-acétylglucosamine (NAG) sous la forme de chitosaccharides non cristallins, associés aux glucanes pariétaux. Afin de pouvoir étudier leur activité biologique, un bioessai d'élicitation du système racinaire de la plante hôte *Medicago truncatula* a été mis au point en utilisant une préparation de fragments de chitine comme éliciteur témoin. La purification de fractions de parois hydrolysées, enrichies en NAG, a donné des fragments de glycanes composés de glucose et de NAG. Ces hétéropolymères présentent une structure nouvelle jamais décrite à ce jour. Le bioessai d'élicitation racinaire a révélé une activité biologique des fractions de paroi différente de celle des fragments de chitine chez *M.truncatula*. De façon intéressante, l'une des fractions induit des oscillations calciques nucléaires dans les cellules épidermiques de cultures de racines de *M.truncatula*, qui sont différentes de la réponse provoquée par des chitotétramères purs.

## ABSTRACT

The oomycete *Aphanomyces euteiches* is a root pathogen infecting legumes which causes important yield losses. The cell wall of *A.euteiches* contains 10% *N*-acetylglucosamine (NAG) in the form of non-crystalline chitosaccharides, which are associated to cell wall glucans. To study their biological activity, a root elicitation bioassay on the host plant *Medicago truncatula* has been set up using a preparation of chitin fragments as a control elicitor. The purification of hydrolysed cell wall fractions enriched in NAG yielded glycan fragments which were composed of glucose and NAG. These heteropolymers possess a novel structure, which has never been described before. The root elicitation bioassay showed a biological activity of the cell wall fractions different from the one of chitin fragments, on *M.truncatula*. Interestingly, one fraction induced nuclear calcium oscillations in epidermal cells of *M.truncatula* root cultures, which are different from the response evoked by pure chitotetramers.

## ABREVIATIONS

<b>AM</b>	« Arbuscular Mycorrhizae »	<b>LysM</b>	« Lysin Motif »
<b>CAT</b>	Catalase	<b>MAMP</b>	« Microbe-Associated Molecular Pattern »
<b>CBEL</b>	« Cellulose Binding Elicitor Lectin »	<b>MAPK</b>	« Mitogen-Activated Protein Kinase »
<b>CBM</b>	« Carbohydrate Binding Motif »	<b>MtGEA</b>	« The Medicago truncatula Gene Expression Atlas »
<b>CBM1</b>	« Carbohydrate Binding Module family 1 »	<b>MurNAc</b>	Acide <i>N</i> -acétylmuramique
<b>CCaMK</b>	“Calcium and Calmodulin-dependent MAP-Kinase”	<b>NAG</b>	<i>N</i> -acétylglucosamine
<b>CDPK</b>	« Calcium-Dependent Protein Kinase »	<b>NF</b>	« Nodulation Factor »
<b>CO4</b>	Chitooligosaccharide de DP 4	<b>NFR</b>	« Nod Factor Receptor »
<b>COs</b>	Chitooligosaccharides	<b>PAL</b>	Phénylalanine ammonia lyase
<b>COs DP 7</b>	Fragments de chitine de crabe de degré de polymérisation moyen 6.8	<b>PAMP</b>	« Pathogen-Associated Molecular Pattern »
<b>CP/MAS</b>	« Cross Polarization/Magic Angle Spinning »	<b>PAW</b>	« Phenol Acetic acid Water »
<b>CSC</b>	« Crab Shell Chitin »	<b>PCR</b>	« Polymerase Chain Reaction »
<b>DAMP</b>	« Danger-Associated Molecular Patterns »	<b>PGN</b>	Peptidoglycane
<b>DP</b>	Degré de Polymérisation	<b>PNAG</b>	« Poly- $\beta$ -1,6-linked <i>N</i> -acetylglucosamine »
<b>DPI</b>	Diphenyleneiodonium	<b>PR-protein</b>	« Pathogenesis-Related Protein »
<b>EFR</b>	« EF-Tu Receptor »	<b>PRR</b>	« Pattern-Recognition Receptor »
<b>FLS2</b>	« Flagellin-Sensing 2 »	<b>RLK</b>	« Receptor-Like Kinase »
<b>FRET</b>	« Fluorescence Resonance Energie Transfert »	<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>GBP</b>	« Glucan-Binding Protein »	<b>RLP</b>	« Receptor-Like Protein »
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol	<b>ROS</b>	« Reactive Oxygen Species »
<b>HPAEC-PAD</b>	« High-Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection »	<b>RT-qPCR</b>	« Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction »
<b>HRP</b>	« Horseradish Peroxidase »	<b>SOD</b>	Superoxyde Dismutase
<b>LCO</b>	« Lipo-chitooligosaccharide »	<b>WGA-FITC</b>	« Wheat Germ Agglutinin-Fluorescein Isothiocyanate »
<b>LRR</b>	« Leucine-Rich Repeat »	<b>YE</b>	« Yeast Extract »

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>La reconnaissance précoce des microorganismes par les plantes.....</b>	<b>2</b>
1. Nature et origine des MAMPs et signaux symbiotiques .....	4
1.1. Les MAMPs.....	4
1.2. Les signaux symbiotiques.....	7
2. Perception des MAMPs et signaux symbiotiques .....	8
3. Transduction des signaux .....	13
3.1. Les flux ioniques.....	13
3.2. La production d'espèces réactives de l'oxygène.....	15
3.3. La phosphorylation des protéines.....	17
4. Réponses d'acceptation ou de rejet du microorganisme.....	18
4.1. La production de métabolites secondaires.....	18
4.2. La production de Pathogenesis-Related Proteins .....	20
4.3. Les modifications de la paroi .....	20
5. Relations entre les signalisations symbiotique et défensive.....	22
<b>Présentation du pathosystème <i>Aphanomyces euteiches-Medicago truncatula</i> et des objectifs de la thèse .....</b>	<b>25</b>
1. Introduction aux Oomycètes.....	25
2. La pourriture des racines causée par <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	26
3. Le pathosystème <i>Aphanomyces euteiches-Medicago truncatula</i> .....	28
4. Découverte de composés à NAG dans la paroi d' <i>A.euteiches</i> .....	28
5. Projet de recherche.....	29
<b>Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de <i>M.truncatula</i> aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens .....</b>	<b>31</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>32</b>
1. Résultats préliminaires concernant la mise au point du bioessai .....	36
2. Publication décrivant le système expérimental .....	39
2.1. Introduction .....	42
2.2. Materials and methods.....	46
2.2.1. Chitin oligomer preparation .....	46
2.2.2. NMR characterization of chitin oligomers.....	47
2.2.3. Preparation and characterization of <i>A. euteiches</i> culture filtrates.....	48
2.2.4. Plant biological material .....	48
2.2.5. Elicitation assays and ROS measurement .....	49
2.2.6. Measurement of gene expression by qRT-PCR.....	50
2.3. Results.....	52
2.3.1. Preparation and characterization of CO fractions from crab shell chitin .....	52
2.3.2. <i>CERK1</i> -dependent responses to COs in <i>A.thaliana</i> .....	54
2.3.3. <i>M. truncatula</i> elicitation assay .....	56
2.3.4. Activity of COs on <i>M. truncatula</i> roots .....	57
2.3.5. Detection of elicitors in <i>Aphanomyces euteiches</i> culture filtrates .....	58

2.4. Discussion.....	59
2.5. Acknowledgements.....	63
2.6. References .....	64
3. Résultats complémentaires concernant l'exploitation du bioessai.....	69
4. Développement de constructions rapportrices de la défense .....	70
<b>Discussion .....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides d'<i>A.euteiches</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>79</b>
1. Caractérisation structurale : .....	82
1.1. Préparation et caractérisation des parois mycéliennes .....	82
1.1.1. Culture d' <i>Aphanomyces euteiches</i> en milieu synthétique.....	82
1.1.2. Extraction et purification de la paroi .....	83
1.1.3. Caractérisation de la paroi.....	85
1.1.3.1. Approche par Résonance Magnétique Nucléaire du solide .....	85
1.1.3.2. Approche par hydrolyse enzymatique .....	87
1.2. Préparation et caractérisation des chitosaccharides .....	88
1.2.1. Extraction et purification .....	88
1.2.2. Caractérisation structurale .....	95
1.2.2.1. Approche par perméthylation des sucres .....	95
1.2.2.2. Approche par Résonance Magnétique Nucléaire du liquide.....	97
1.2.2.3. Approche par spectrométrie de masse .....	98
2. Activité biologique :.....	100
2.1. Activité biologique chez <i>M.truncatula</i> .....	100
2.1.1. Mesure de la production de ROS extracellulaires .....	100
2.1.2. Analyse de l'expression génique .....	101
2.1.3. Mesure des variations calciques nucléaires .....	103
2.2. Etude de l'activité biologique des chitosaccharides chez <i>A.thaliana</i> .....	106
<b>Discussion .....</b>	<b>107</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>115</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>121</b>
<b>Matériel biologique .....</b>	<b>122</b>
1. <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	122
1.1. Maintien de la souche.....	122
1.2. Production de zoospores .....	122
1.3. Culture en milieu liquide .....	123
2. <i>Medicago truncatula</i> .....	124
3. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	125
<b>Méthodes.....</b>	<b>126</b>
1. Techniques de biochimie.....	126
1.1. Techniques de biochimie des protéines.....	126
1.1.1. Dosage des protéines .....	126
1.1.2. Mesure d'activité glycohydrolase.....	127
1.1.3. Purification de glycohydrolases .....	128
1.1.3.1. Purification de chitinases et glucanases de tabac.....	128



1.1.3.2. Purification de $\beta$ -1,6-endoglucanase de Westase™ .....	128
1.2. Techniques de biochimie des sucres .....	130
1.2.1. Techniques de quantification .....	130
1.2.2. Techniques analytiques .....	131
1.2.2.1. Spectrométrie de masse.....	131
1.2.2.2. Résonance Magnétique Nucléaire .....	131
1.2.2.2.1. RMN du liquide .....	131
1.2.2.2.2. RMN du solide.....	131
1.2.2.3. Analyse de liaisons .....	132
1.3. Préparation de fractions pariétales et matériel éliciteur .....	132
1.3.1. Préparation de chitooligosaccharides de chitine de crabe.....	132
1.3.2. Préparation de $\beta$ -1,3-glucanes linéaires .....	133
1.3.3. Préparation des parois d' <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	134
1.3.3.1. Préparation de parois brutes .....	134
1.3.3.2. Purification des parois.....	134
1.3.4. Purification des chitosaccharides d' <i>A.euteiches</i> .....	135
1.3.4.1. Hydrolyse enzymatique des parois .....	135
1.3.4.2. Analyse chromatographique .....	136
2. Techniques de biologie moléculaire .....	137
2.1. Extraction d'ADN.....	137
2.2. Analyse électrophorétique des acides nucléiques .....	138
2.3. Analyse d'expression génique par PCR quantitative en temps réel.....	138
2.4. Génération de construction rapportrice de la défense .....	139
3. Bioessais .....	141
3.1. Dosage d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracellulaire par chimioluminescence et fluorescence .....	141
3.1.1. Mesure en cinétique.....	141
3.1.2. Mesure en point final .....	141
3.2. Révélation de l'expression des constructions promoteur-luciférase par imagerie .....	142
3.3. Mesure des variations de la concentration en calcium cytoplasmique par chimioluminescence ..	143
3.4. Mesure des variations de calcium nucléaire par Fluorescence Résonance Energy Transfer (FRET)143	

**Références Bibliographiques .....**145

# **INTRODUCTION**

## **LA RECONNAISSANCE PRECOCE DES MICROORGANISMES PAR LES PLANTES**

Les plantes, comme la plupart des êtres vivants, vivent en permanence au contact de nombreux microorganismes. Il s'établit dès la formation du fruit qui libère la graine, se poursuit lorsque la graine tombe au sol, puis au cours de la germination et de la croissance de la plante, et ne se termine qu'à la mort de celle-ci. Le sol présente une densité de population microbienne très importante, d'origine bactérienne, fongique ou encore oomycète. La rhizosphère est un lieu de rencontre privilégié entre les microorganismes et les végétaux, car elle représente aussi une très grande surface de contact. La plupart de ces microorganismes vivent en saprophytes, d'autres exercent un effet néfaste et sont des agents pathogènes, et d'autres encore peuvent, au contraire, protéger le végétal et favoriser son développement en réalisant une interaction commensale, dite symbiotique.

On distingue plusieurs types d'interactions suivant les couples plante-microorganisme considérés. Lorsque le microorganisme est capable de se multiplier au sein du végétal et de coloniser les tissus de l'hôte, provoquant les symptômes de la maladie ou conduisant à la formation de structures symbiotiques, l'interaction est dite compatible. Dans le cas d'interaction pathogène, le microorganisme est virulent et la plante sensible. *A contrario*, une interaction est qualifiée d'incompatible, lorsque les mécanismes de défense de l'hôte limitent ou bloquent l'installation du microorganisme. Dans le cas d'interaction pathogène, le microorganisme est « avirulent » et la plante résistante. Lorsque l'ensemble des variétés d'une espèce végétale sont résistantes à toutes les races d'un agent pathogène l'interaction est dite non-hôte. Ainsi, plantes et microorganismes peuvent coexister pacifiquement ou se livrer bataille pour leur survie et leur développement. Les plantes doivent déterminer si les microorganismes rencontrés sont ennemis ou amis de façon à donner une réponse appropriée soit de défense soit d'acceptation, tandis que les microorganismes tentent de manipuler la plante hôte afin d'accéder à des nutriments et échapper à ses défenses. Le terme «défense des plantes» englobe l'ensemble des mécanismes mis en place par le végétal pour lutter contre les microorganismes. Elles sont généralement classées en deux groupes : Les défenses préformées qui correspondent aux barrières physiques comme la cuticule ou la paroi, ou encore aux molécules antimicrobiennes produites constitutivement. Les défenses induites encore appelées

## *Introduction*

«réponses immunitaires» sont activées suite à la reconnaissance des microorganismes et englobent un ensemble de modifications physiologiques de l'hôte qui visent à limiter leur installation. Quelle que soit la nature de l'interaction, elle implique un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, dès les étapes les plus précoces de l'interaction. C'est ce dialogue et les réponses qu'il va engendrer, qui vont déterminer le devenir de l'interaction. Au cours de cette présentation, nous porterons notre attention plus en particulier sur les signaux microbiens précoces de type saccharidique qui jouent un rôle très important pour la reconnaissance des microorganismes symbiotiques et pathogènes par les légumineuses.

Le premier niveau de perception, qui intervient au cours de l'interaction entre la plupart des plantes et des microorganismes, se fait par la reconnaissance de motifs moléculaires appelés « Pathogene-Associated Molecular Pattern » (PAMP) ou « Microbe-Associated Molecular Pattern » (MAMP). La reconnaissance des MAMPs/PAMPs est le premier mécanisme à l'origine de l'induction de l'immunité végétale. A ce premier mécanisme général peut se superposer un deuxième mécanisme plus spécifique, fondé sur la perception d'effecteurs microbiens à activité d'avirulence, conduisant à la mort cellulaire programmée (réponse hypersensible, HR) chez les plantes porteuses d'un gène de résistance correspondant. Cet aspect déborde du cadre de notre travail et ne sera pas exposé.

**Tableau I.1 : Classification des éliciteurs et des MAMPs associés connus**

Nature	Eliciteur	MAMP	Sources	Fonction (a)	Récepteur	Références
Protéique	Flagelline	flg22	Bactéries	Mobilité	FLS2	Bardy et al., 2003; Chinchilla et al., 2006; Felix et al., 1999
	ET-Tu	elf18	Bactéries	Traduction des protéines	EFR	Krab and Parmeggiani, 1998; Zipfel et al., 2006; Kunze et al., 2004
	Ax21	axYS22	Bactéries <i>Xanthomonas sp.</i> , <i>Xylella fastidiosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Quorum sensing	Xa21	Park et al., 2010; Lee et al., 2009; Danna et al., 2011
	EIX	TKLGE	<i>Trichoderma viride</i>	Dégradation de la paroi végétale	LeEIX1/2	Belien et al., 2006; Ron and Avni, 2004; Bailey et al., 1990; Ron et al., 2000
	harpin	-	Bactéries Gram -	Translocation des effecteurs	-	Bocsanzy et al., 2008; He et al 1993; Wei et al., 1992
	CSP	RNP-1 motif (KGFGFITP)	Bactéries	Réponse aux stress	-	Thieringer et al., 1998; Felix and Boller, 2003
	NLP	-	Champignons, Oomycètes, Bactéries	Virulence	-	Ottman et al., 2009; Gijzen et al., 2011
	SodM	-	Bactéries <i>Xanthomonas</i> , <i>E.coli</i>	Production de ROS	-	McCord and Fridovich, 1969; Watt et al., 2006
	Elicitines	-	Oomycètes <i>Phytophthora sp.</i>	Transport de stérol	-	Mikes et al., 1998; Kamoun et al., 1993
	TG	pep13	Oomycètes <i>Phytophthora sojae</i>	Adhésion	-	Folk, 1980; Brunner et al., 2002
Glyco-protéique	CBEL	CBM1	Oomycètes <i>Phytophthora sp.</i>	Adhésion	-	Gaulin et al., 2002; Kathib et al., 2004
	Invertase	résidus mannosyl	Champignons	Catabolisme	-	Basse et al., 1992
Poly-saccharidique	Chitine	(NAG)7	Champignons	Structuration de la paroi	CERK1/CEBiP	Xie and Lipke, 2010; Petutschnig et al., 2010; Kaku et al., 2006; Felix et al., 1999
	PGN	-	Bactéries	Structuration de la paroi	-	Silhavy et al., 2010; Erbs and Newman, 2011
	GE	Hepta-glucane	Oomycètes <i>P.megasperma</i>	Structuration de la paroi	GBP	Umemoto et al., 1997; Sharp et al., 1984
	β-glucans	Penta-glucanes	Champignons <i>Magnaporthe grisea</i>	Structuration de la paroi	-	Xie and Lipke, 2010; Yamaguchi et al., 2000
	LPS/LOS	Antigen-O et Core-oligosaccharide	Bactéries Gram -	Structuration de l'enveloppe	-	Silhavy et al., 2010; Erbs and Newman, 2011
Lipidique	Acide arachidonique	-	Oomycètes	Structuration des membranes	-	Goldenberg and Pavia, 1981
	Ergostérol	-	Basidiomycètes	Structuration des membranes	-	Granado et al., 1995

(a) Démontrée ou supposée

Seuls les éliciteurs exogènes ont été listés. (-) : information non disponible. **FLS2** : Flagelline Sensitive 2, **EFR** : EF-Tu Receptor, **EIX** : Ethylene-Inducing Xylanase, **CSP** : Cold Shock Protein, **NLP** : Nep1-like, **TG** : Transglutaminase, **CBEL** : Cellulose-Binding Elicitor Lectin, **CBM1** : Carbohydrate-Binding Module Family 1, **CERK1** : Chitin Elicitor Receptor Kinase 1, **CEBiP** : Chitin Elicitor-Binding Protein 1, **PGN** : Peptidoglycan, **GE** : Glucan Elicitor, **LPS** : Lipopolysaccharide, **LOS** : Lipooligosaccharide, **GBP** : Glucan-Binding Protein.

## **1. NATURE ET ORIGINE DES MAMPS ET SIGNAUX SYMBIOTIQUES**

### **1.1. LES MAMPS**

La nature des molécules émises par les microorganismes est d'une importance cruciale. En effet, ce sont leurs caractéristiques structurales qui vont permettre à la plante de percevoir ou non les microorganismes environnants, et d'interpréter la perception de ces molécules afin de déterminer si les microorganismes présents sont neutres, bénéfiques ou néfastes.

Le système le plus général de reconnaissance consiste en la reconnaissance par la plante de motifs moléculaires qui sont présents chez de nombreuses espèces différentes de microorganismes. Ces motifs moléculaires sont appelés « Microbe-Associated Molecular Patterns » (MAMPs) et induisent les défenses des plantes. Les molécules sécrétées ou exposées à la surface cellulaire, contenant des motifs MAMP sont nommées éliciteurs. Ces motifs MAMPs sont essentiels pour la fonction de molécules essentielles, dans certains contextes, pour la survie du microorganisme (Nürnberger *et al.*, 2004). Les MAMPs peuvent être de nature protéique, glyco-protéique, lipidique, ou saccharidique (**Tableau I.1**).

Parmi les MAMPs protéiques identifiés, on trouve les peptides flg22 et elf18 qui ont été identifiés chez de nombreuses bactéries (Bardy and Jarrell, 2003; Chinchilla *et al.*, 2006; Felix *et al.*, 1999; Krab and Parmeggiani, 1998; Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Le peptide flg22 est un fragment de la flagelline qui est impliqué dans la mobilité des bactéries, et elf18 est un fragment du facteur d'élongation EF-Tu, impliqué dans la traduction des protéines chez les bactéries.

Le CBM1 (Carbohydrate-Binding Module family 1) est un MAMP glycoprotéique identifié chez les oomycètes du genre *Phytophthora* (Gaulin *et al.*, 2006; Khatib *et al.*, 2004). C'est un domaine qui fait partie de la protéine CBEL (Cellulose-Binding Elicitor Lectin) identifiée chez *Phytophthora parasitica*, qui est impliquée dans l'adhésion aux supports celluloses et dans la structuration de la paroi (Gaulin *et al.*, 2002).

## Introduction

Les MAMPs protéiques et glycoprotéiques sont des motifs appartenant à des molécules impliquées dans des fonctions cellulaires variées, tandis que les MAMPs saccharidiques sont des fragments de composés beaucoup plus grands qui font partie des parois des microorganismes. Les parois des champignons et des oomycètes sont présentées classiquement en deux couches. Une couche cristalline constituée de cellulose chez les oomycètes ou de chitine chez les champignons, et complétée par des  $\beta$ -1,3-glucanes, constitue le squelette rigide. Un composant amorphe est constitué de polysaccharides ramifiés, dans lequel on trouve des  $\beta$ -1,3/16-glucanes ramifiés.

Les oligomères de *N*-acétylglucosamine (NAG) liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,4, appelés chitooligosaccharides (COs), de degré de polymérisation (DP) d'environ 7 ou 8 sont des MAMPs que l'on attribue aux champignons (Boller and Felix, 2009; Shibuya and Minami, 2001; Stacey and Shibuya, 1997; Xie and Lipke, 2010). La chitine est la molécule à l'origine des oligomères de NAG. Les champignons unicellulaires peuvent ne contenir qu'un faible pourcentage de chitine dans leurs parois, comme *Saccharomyces cerevisiae*, dont la paroi n'en contient que 1 à 2% (Osmond *et al.*, 1999), tandis que chez les champignons filamenteux, elle peut représenter jusqu'à 60% du contenu pariétal (Ruiz-Herrera *et al.*, 1992). Chez certains oomycètes, de la chitine a pu être mise en évidence et représente entre 0,7 et 3,4% des parois sèches (Bulone *et al.*, 1992; Sietsma *et al.*, 1975). La chitine est un polysaccharide constitué de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 résidus de NAG liés par des liaisons  $\beta$ -1,4. De 20 à 400 chaînes de chitine s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes inter- et intra-moléculaires. Cela leur confère une structure cristalline et une propriété hydrophobe, donnant naissance à des microfibrilles dont le rôle est structural (Ruiz-Herrera and San-Blas, 2003). La dégradation ou la modification en chitosan de la chitine se fait par voie enzymatique, par des chitinases et hexosaminidases, ou par des chitine déacétylases, respectivement (Adams, 2004). Les chitinases sont des glycohydrolases qui reconnaissent spécifiquement les liaisons  $\beta$ -1,4 entre les résidus NAG, et les dégradent. Ces enzymes ont une activité soit exo, ce qui signifie que l'hydrolyse du polymère se fera par son extrémité non-réductrice et il en résultera uniquement des monomères, soit endo, ce qui signifie que l'hydrolyse s'effectuera au sein du polymère, et il en résultera des chitooligosaccharides (COs) de DP variés. Il existe des chitinases produites par les plantes mais aussi par les microorganismes.

## Introduction

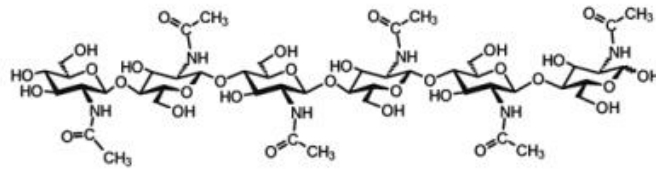
Les  $\beta$ -1,3-glucanes sont composés de longs polymères linéaires de glucose en liaisons  $\beta$ -1,3, pouvant présenter des ramifications en  $\beta$ -1,6. Les chaînes de  $\beta$ -1,3-glucanes sont constituées d'environ 1500 unités de glucose, qui, en l'absence de ramification, peuvent adopter une structure microfibrillaire qui participe à la rigidité des parois cellulaires (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003; Bartnicki-Garcia, 1966). On en trouve 30 à 45% dans les parois de *Candida albicans* et *S.cerevisiae*. De 48 à 68% de  $\beta$ -1,3-glucanes ont été révélés dans les parois de plusieurs espèces de *Phytophthora* (Lippman *et al.*, 1974; Zevenhuizen and Bartnicki-Garcia, 1969). Ils sont hydrolysés par les  $\beta$ -1,3-glucanases produites par les microorganismes et les plantes (Cid *et al.*, 1995; McLeod *et al.*, 2003; Okinaka *et al.*, 1995).

Les  $\beta$ -1,3/1,6-glucanes, du composant amorphe des parois, sont de nature amorphe et pourraient agir comme «ciment» en formant des liaisons covalentes avec les  $\beta$ -1,3-glucanes et la chitine du squelette cristallin (Kollar *et al.*, 1997). Leur présence dans les parois des champignons unicellulaires et filamenteux a été fréquemment rapportée (James *et al.*, 1990; Lindberg and McPherson, 1954; Manners and Meyers, 1977; Monteiro *et al.*, 2000; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006; Sietsma and Wessels, 1977; Vink *et al.*, 2004). Les  $\beta$ -1,3/1,6-glucanes sont aussi connus pour faire partie intégrante de la paroi des oomycètes. Les  $\beta$ -1,6-glucanes sont hydrolysés par des  $\beta$ -1,6-glucanases provenant de microorganismes, et qui n'ont à ce jour jamais été rapportés chez les plantes (Bryant *et al.*, 2007; Lindstrom *et al.*, 1993; Moy *et al.*, 2002). C'est de l'hydrolyse chimique partielle de la paroi de l'oomycète *Phytophthora megasperma* que l'hepta-glucane a été obtenu et identifié (Ayers *et al.*, 1976; Sharp *et al.*, 1984). Cette molécule est une chaîne de cinq glucoses liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,6. Sur cette chaîne, deux résidus glucose se lient en  $\beta$ -1,3, l'un sur le glucose numéro 2 et l'autre sur le glucose numéro 4.

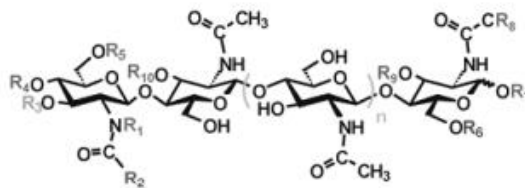
La dégradation enzymatique des glucanes de la paroi de *Magnaporthe grisea* a permis d'identifier des penta-glucanes éliciteurs (Xie and Lipke, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2000). Ce sont des tetraglucosyl glucitols qui consistent en une chaîne de quatre résidus glucoses dont trois sont liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,3 et le quatrième, lié en  $\beta$ -1,6, se positionne en première, deuxième ou troisième position. Un résidu glucitol est lié au bout de la chaîne de glucose par une liaison  $\beta$ -1,3.



**A** CO hexamer

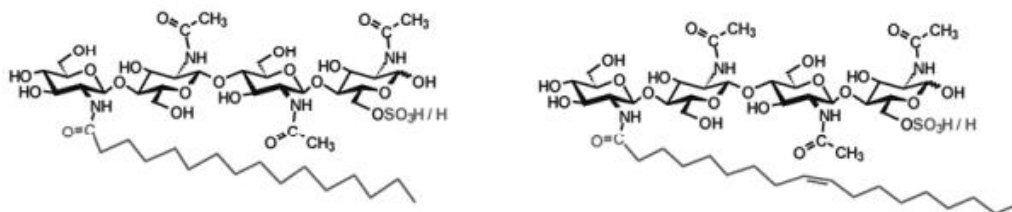


**B** Generic LCO



**C** Myc-LCO

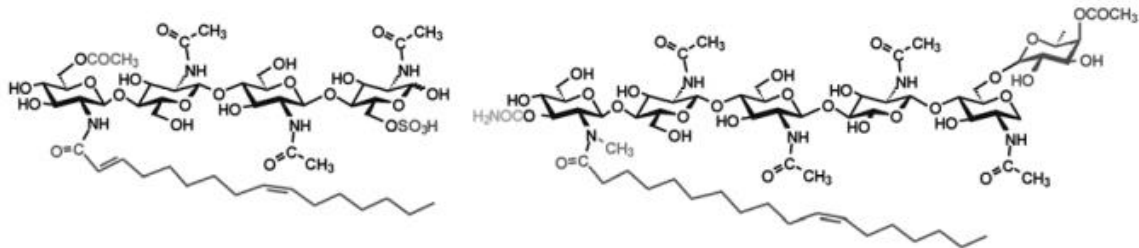
*Glomus intraradices*



**D** Nod factors

*Sinorhizobium meliloti*

*Mesorhizobium loti*



**Figure I.1 :** Structure des chitooligosaccharides (COs) et lipo-chitooligosaccharides (LCOs)

Illustration extraite de Gough and Cullimore (2011).

**A :** CO hexamère. **B :** LCO symbiotique générique. **C :** Myc-LCO identifié chez *Glomus intraradices* sulfaté et non sulfaté : LCO-IV(C16:0,+/-S) et Myc-LCO-IV(C18:1Δ9Z,+/-S). **D :** Facteur Nod majoritaire produit par *Sinorhizobium meliloti*: NodSm-IV(C16:2Δ2EΔ9Z,Ac,S), et *Mesorhizobium loti*: NodMI-V(C18:1Δ11Z,Me,Cb,AcFuc).

Enfin le O-antigène, qui est un assemblage de plusieurs sucres qui varie d'un sérotype à l'autre, a été récemment identifié comme MAMP chez les bactéries Gram – (Erbs and Newman, 2012; Silhavy *et al.*, 2010).

Pour les éliciteurs lipidiques, les deux exemples connus sont l'acide arachidonique chez les oomycètes, et l'ergostérol chez les basidiomycètes (Bostock *et al.*, 1981; Granado *et al.*, 1995). Ces deux lipides sont impliqués dans la structuration des membranes. Dans leur cas, l'éliciteur est le MAMP. Pour plusieurs autres éliciteurs, leur caractère éliciteur a été mis en évidence mais le motif MAMP est encore inconnu, comme pour le peptidoglycane (PGN) des bactéries Gram +. Celui-ci est constitué de chaînes d'acide *N*-acétylmuramique (MurNac) et de NAG alternés et liés en  $\beta$ -1,4, lesquelles sont liées par des ponts peptidiques (Glauner *et al.*, 1988; Gust *et al.*, 2012; Schleifer and Kandler, 1972).

## 1.2. LES SIGNAUX SYMBIOTIQUES

Les microorganismes symbiotiques produisent des molécules particulières destinées à induire la mise en place de l'interaction commensale. Les molécules actuellement connues sont les lipo-chitooligosaccharides (LCOs), identifiés au cours de la symbiose rhizobienne sous le nom de Facteurs Nod (NF), ainsi qu'au cours de la symbiose mycorhizienne à arbuscule (AM) sous le nom de Myc-LCOs (**Figure I.1**) (Gough and Cullimore, 2011). NF et Myc-LCOs partagent une structure très similaire. Ils partagent une structure basique d'un tétramère ou pentamère linéaire de NAG dont les résidus sont liés en  $\beta$ -1,4 avec un acide gras C16 ou C18 qui se substitue au groupement acétyle du résidu NAG à l'extrémité non réductrice.

Les Myc-LCOs ont été identifiés dans un extrait de spores germées de *Glomus intraradices* (*Rhizophagus irregularis*). Ils sont constitués d'un tétramère de NAG avec un acide oléique (LCO-IV C18:1 $\Delta$ 9Z) ou un acide palmitique (LCO-IV C16:0). La présence de sulfatation a pu être observée sur le carbone 6 du résidu NAG situé à l'extrémité réductrice (Maillet *et al.*, 2011). Des variations de la structure des Myc-LCOs ont été observées dans différents matériels végétaux colonisées par *G.intraradices*. Le squelette de NAG peut être un tétramère ou un pentamère sulfaté ou non sulfaté, avec une chaîne de C16 ou C18 avec zéro, une ou deux insaturations.

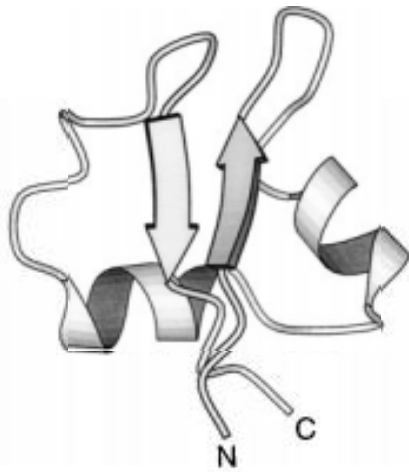
Pour les NF, chaque souche de rhizobium produit des LCOs dont les variations de structures sont caractéristiques de la souche ou de l'espèce (Dénarié *et al.*, 1996; D'Haeze *et al.*, 2003). Les variations se font dans la nature chimique des substituants de la partie saccharidique avec des groupements acétyles, carbamoyles, fucosyles, arabinosyles ou sulphuryles O-liés, et le groupement méthyl N-lié. Elles se font aussi dans la longueur et les insaturations de la chaîne grasse. Les substitutions ont un impact sur l'activité biologique et le spectre d'hôtes.

Les LCOs n'ont pas pour origine la dégradation de composés existants. Leur production est issue d'une voie de biosynthèse dédiée. Pour les NF, cette voie est bien connue chez les bactéries, elle est activée suite à la perception de signaux provenant de la plante, classiquement des flavonoïdes présents dans les exsudats racinaires (Dénarié *et al.*, 1996). Pour les Myc-LCOs, l'activation de la voie de biosynthèse pourrait faire intervenir la production de strigolactones par la plante (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006).

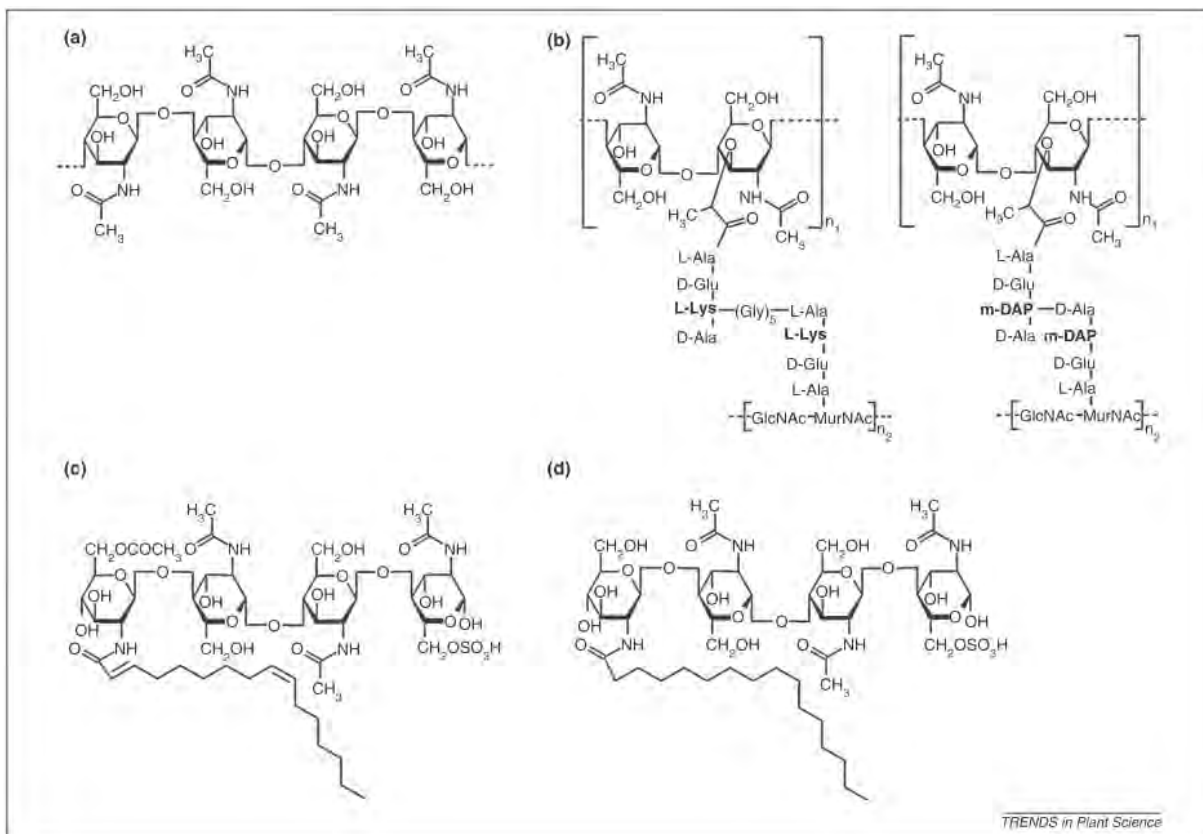
## **2. PERCEPTION DES MAMPs ET SIGNAUX SYMBIOTIQUES**

Les signaux microbiens induisent chez la plante une réaction soit de défense soit d'acceptation. Cela suggère que la plante est capable de percevoir ces signaux, impliquant ainsi l'existence de récepteurs. Ces récepteurs sont le plus souvent membranaires, à l'exception des « Glucan-Binding Proteins » (GBP), récepteurs putatifs des  $\beta$ -glucanes, qui sont extracellulaires (Fliegmann *et al.*, 2004; Leclercq *et al.*, 2008). Les MAMPs protéiques sont perçus par des récepteurs membranaires spécifiques, appelés « Pattern-Recognition Receptors » (PRRs) (Boller and Felix, 2009; Gust *et al.*, 2012). Les PRRs les mieux caractérisés, impliqués dans l'immunité des plantes contre l'infection par des microorganismes sont les « Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Proteins » (LRR-RLPs) à domaine LRR extracellulaire, et les « Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases » (LRR-RLKs) à domaine LRR extracellulaire joint par une région transmembranaire à un domaine kinase, fonctionnel ou non, du côté intracellulaire.

La flagelline bactérienne est perçue chez *Arabidopsis thaliana* grâce au LRR-RLK « Flagellin-Sensing 2 » (FLS2) (Gómez-Gómez and Boller, 2000). Des orthologues de FLS2 ont été retrouvés avec un degré de conservation important, dans le génome de toutes les plantes supérieures analysées jusqu'ici (Boller and Felix, 2009). La perception du peptide



**Figure I.2 :** Représentation de la structure tridimensionnelle du domaine LysM  
Illustration extraite de Bateman and Bycroft (2000).



**Figure I.3 :** Structure des ligands contenant de la NAG pour les protéines à domaines LysM

Illustration extraite de Gust *et al.* (2012).

(a) Chitine. (b) Peptidoglycane (PGN). (c) Facteur Nod majoritaire produit par *Sinorhizobium meliloti*: NodSm-IV(C16:2D2ED9Z,Ac,S). (d) Myc-LCO identifié chez *Glomus intraradices* : (LCO)-IV(C16:0,S).

flg22 initie l'interaction entre FLS2 et le Receptor-Like Kinase (RLK) BAK1 (Chinchilla *et al.*, 2007). C'est l'hétérodimérisation de FLS2 avec BAK1 en un complexe fonctionnel qui va permettre de transduire un signal guidant les réactions de la plante. De même que pour la flagelline, le facteur d'élongation EF-Tu est perçu chez *A.thaliana* grâce à un LRR-RLK, EF-Tu Receptor (EFR) (Zipfel *et al.*, 2006). La liaison de EF-Tu à EFR semble être suffisante pour transduire un signal sans qu'un corécepteur soit impliqué. Le peptide TKLGE provenant de la xylanase des parois des champignons est perçu par les LRR-RPs LeEIX1 et LeEIX2 (Ron and Avni, 2004; Rotblat *et al.*, 2002).

Plus récemment identifiés chez les plantes, des récepteurs protéiques et récepteurs-kinase, possédant plusieurs domaines Lysin Motif (LysM), ont été impliqués dans la reconnaissance de motifs glycaniques contenant de la NAG (Fliegmann *et al.*, 2011; Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Willmann *et al.*, 2011). Le LysM, environ 40 acides aminés de longueur, est un domaine protéique ancien et omniprésent chez les organismes vivants, à l'exception des *Archaea* (Bateman and Bycroft, 2000; Buist *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). La structure tridimensionnelle des LysM est en  $\beta\alpha\beta$  (Bateman and Bycroft, 2000; Bielnicki *et al.*, 2006; Mulder *et al.*, 2006). Les deux feuillets  $\beta$  sont agencés antiparallèlement. Chaque hélice  $\alpha$  est emboîtée sur le côté d'un feuillet  $\beta$  (**Figure I.2**) (Bateman and Bycroft, 2000). De courts peptides espaceurs séparent les différents domaines d'une même protéine LysM (Buist *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2012; Ohnuma *et al.*, 2008). Les domaines LysM ont été initialement rapportés chez des hydrolases bactériennes impliquées dans la biogénèse de la paroi cellulaire bactérienne, sa modification et sa dégradation, incluant des lysozymes, des auto-lysines et des transglycosylases. Le rôle mécanistique proposé pour les domaines LysM bactériens est de médier le contact physique entre les protéines à domaine LysM et des sucres complexes structurant les surfaces bactériennes, tels que le PGN (Glauner *et al.*, 1988; Schleifer and Kandler, 1972). Les hydrolases bactériennes contenant des domaines LysM (lysines, lysozymes et chitinases) sont capables de cliver les liaisons 1,4-O-glycosidiques entre les résidus MurNAc et NAG du PGN, aussi bien qu'entre les résidus NAG de la chitine (Buist *et al.*, 2008; Ohnuma *et al.*, 2008; Ponting *et al.*, 1999). Ainsi, les domaines LysM sont le plus généralement considérés capables de lier les glycanes contenant de la NAG (**Figure I.3**) (Buist *et al.*, 2008). Seules les plantes possèdent des protéines LysM-RLK, à domaines LysM extracellulaires associés à un domaine kinase intracellulaire (Arrighi *et al.*, 2006; Lohmann *et al.*, 2010; Shiu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*,

2007). Pour tous les LysM-RLK, trois domaines LysM sont prédits, présentant un degré de divergence important au sein d'une même protéine et entre différentes protéines (Arrighi *et al.*, 2006; Fliegmann *et al.*, 2011; Lohmann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2007). Il a été montré chez *A.thaliana* que la perception et l'induction des défenses en réponse au PGN requièrent trois récepteurs à domaines LysM, LYM1, LYM3 et CERK1 (Willmann *et al.*, 2011).

Le premier récepteur aux COs de chitine a été identifié par une approche biochimique chez *Oryza sativa*, OsCEBiP ; il porte trois domaines LysM et est dénué de domaine kinase (Kaku *et al.*, 2006). Le récepteur OsCERK1, identifié par la suite, est aussi impliqué dans la perception des COs de chitine et l'induction de l'immunité au cours de l'infection par *Magnaporthe grisea* (Shimizu *et al.*, 2010). Il présente trois domaines LysM et un domaine kinase. L'hétéro-oligomérisation d'OsCEBiP et OsCERK1 en présence de chitooctose indique que ces deux molécules coopèrent pour la réponse à la chitine, en formant un complexe récepteur. Chez *A.thaliana*, l'homologue de OsCERK1, AtCERK1 ou AtLysM-RLK1, est requis et suffisant pour l'induction de l'immunité par la chitine (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Bien qu'un homologue de OsCEBiP existe chez *A.thaliana*, biochimiquement fonctionnel en tant que protéine se liant à la chitine, les protéines CEBiP-like ne sont pas nécessaires pour la perception des COs de chitine chez cette plante (Willmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009)(Shinya *et al.*, 2012). AtCERK1 est capable de se lier à des oligomères de NAG de DP 5 à 8 (Lizasa *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Mais c'est l'oligomère de DP 8, et non celui de DP 5, qui est capable d'induire la phosphorylation de CERK1 et son homodimérisation, conduisant à l'induction des défenses de la plante (Liu *et al.*, 2012; Petutschnig *et al.*, 2010). En effet, l'étude de la structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire de CERK1 en interaction avec son ligand a permis de mettre en évidence que seuls trois résidus NAG peuvent interagir avec ce domaine, et que les chitooctamères agiraient donc comme des ligands bivalents induisant la dimérisation de CERK1, tandis que des oligomères plus courts inhibent cette dimérisation (Liu *et al.*, 2012). Ainsi, bien que les COs de chitine et le PGN partagent une structure très similaire, on observe deux mécanismes de perception différents chez *A.thaliana* : Alors que AtCERK1 est suffisant pour percevoir les COs de chitine chez cette plante, la perception du PGN requière AtCERK1, AtLYM1 et AtLYM3 (Willmann *et al.*, 2011).

La reconnaissance spécifique des facteurs Nod (Nodulation Factor, NF) chez les légumineuses implique des LysM-RLK (Parniske and Downie, 2003; Radutoiu *et al.*, 2007). Chez *Lotus japonicus*, leur perception passe par les récepteurs « Nodulation Factor Receptor » 1 (NFR1) et 5 (NFR5), dont les mutants ne sont plus capables de mettre en place au niveau racinaire une structure d'accueil et de prolifération des bactéries symbiotiques appelée nodosité, et sont insensibles au NF de *Mesorhizobium loti* (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). L'hétérodimérisation de NFR1 avec NFR5 a été montrée, suggérant ici aussi la coopération des LysM-RLK aux cours de l'interaction avec le ligand pour la transmission d'un signal (Madsen *et al.*, 2011). Très récemment, une liaison biochimique à haute affinité de NFR1 et NFR5 au NF, mais pas au chitopentaose, a été démontrée (Broghammer *et al.*, 2012).

Chez *M.truncatula*, le récepteur « Nodulation Factor Perception » (NFP) est un LysM-RLK requis pour l'établissement de la nodulation avec *Sinorhizobium meliloti*, et à la perception des NF (Ben Amor *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006). Un second LysM-RLK de *M.truncatula*, LYK3, est aussi nécessaire au processus de nodulation. Mais, contrairement aux mutants *nfp*, les mutants *lyk3* ne sont pas affectés dans les réponses précoces aux NF (Limpens *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007). Chez *M.truncatula* il n'est actuellement toujours pas déterminé si les NF se lient directement au domaine extracellulaire des récepteurs putatifs des NF, ou si ces protéines sont des intermédiaires dans la signalisation aux NF (Gust *et al.*, 2012).

La protéine Nod Factor Perception de *Parasponia andersonii* (PaNFP), est actuellement le seul récepteur putatif à être impliqué dans la médiation des symbioses AM et rhizobienne (Op den Camp *et al.*, 2011). PaNFP appartient à la famille des LysM-RLK et est structuralement proche des récepteurs putatifs aux NF des légumineuses, MtNFP et LjNFR5. Toutefois, l'implication des protéines à domaine LysM, généralement nombreuses dans les plantes AM-compétentes, dans la perception des Myc-LCOs chez les légumineuses, reste à démontrer (Gust *et al.*, 2012).

Le récepteur à l'heptaglucone de *P.megasperma* a été recherché pendant de nombreuses années. Une protéine capable de se lier à l'heptaglucone avec une forte affinité a été purifiée et clonée (Mithöfer *et al.*, 2000; Umemoto *et al.*, 1997). Cette « Glucan-

## Introduction

Binding Protein » (GBP) se trouve être une glucanase extracellulaire associée à la membrane plasmique (Fliegmann *et al.*, 2004). Il est possible que cette GBP s'associe avec un PRR au niveau de la membrane plasmique pour permettre la transduction du signal (Fliegmann *et al.*, 2004; Mithöfer *et al.*, 2000; Zipfel and Felix, 2005). Depuis, de nombreux homologues de GBP ont été identifiés, en particulier chez *Medicago truncatula*, mais leur analyse fonctionnelle reste à réaliser (Leclercq *et al.*, 2008). Enfin, aucun récepteur aux  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-oligoglucosides n'a été identifié.



### **3. TRANSDUCTION DES SIGNAUX**

Les cascades de transduction des signaux font le lien entre la perception et les réponses de défense et de symbiose à travers des seconds messagers qui sont conservés chez la plupart des eucaryotes. Ces cascades de transduction des signaux font intervenir, entre autres, des flux ioniques dans lesquels le calcium joue un rôle important, les espèces réactives de l'oxygène ainsi que l'oxyde nitreux, la phosphorylation des protéines en faisant intervenir la voie des MAP-Kinases, mais aussi, le cas échéant, la voie des octadécanoïdes, les phytohormones et les phospholipides. Dans cette partie sont présentés seulement une partie des évènements possibles de transduction de la signalisation, à laquelle nous nous sommes intéressés au cours des travaux de cette étude.

#### **3.1. LES FLUX IONIQUES**

La perception d'éliciteurs se traduit par une dépolarisation membranaire consécutive à des efflux d'anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) concomitants à des influx de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ) dès les premières minutes d'élicitation et conduit à l'alcalinisation du milieu extracellulaire (Felix *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2011; Huffaker *et al.*, 2006; Kunze *et al.*, 2004; Shibuya and Minami, 2001). L'induction rapide d'une variation calcique cytosolique, mais aussi nucléaire, a été observée après élicitation de cellules de tabac avec des éliciteurs de nature protéique ou saccharidique (Kwaaitaal *et al.*, 2011; Lecourieux *et al.*, 2005; Mithöfer *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2012). Les influx calciques sont assurés par des canaux membranaires ou endomembranaires, les pools de calcium réquisitionnés provenant essentiellement de l'apoplasme, de la vacuole et du réticulum endoplasmique. La dépolarisation membranaire conduit à l'activation de canaux ioniques voltage dépendants, et il a été montré qu'elle requiert un influx calcique initial dans le cas des réponses induites suite à la perception d'éliciteurs par EFR et FLS2 (Jeworutzki *et al.*, 2010).

L'intensité et la cinétique de l'influx calcique (signature calcium) participe à la spécificité de la réponse de la plante (Lecourieux *et al.*, 2006). Il n'est pas encore clairement établi si les efflux de calcium, conduisant au retour de la concentration calcique cytosolique à son niveau de repos, est contrôlé afin de générer une signature spécifique, ou si il est relatif à des mécanismes généraux d'homéostasie cellulaire. La cascade de signalisation est ensuite assurée par des décodeurs du signal calcique représentés par un pool de protéines capables de lier le calcium dont font partie les calmodulines (Du *et al.*, 2009), les protéine kinases dépendantes du calcium (CDPK), et la NADPH-oxydase (RBOH) (Boudsocq *et al.*, 2010; Dodd *et al.*, 2010; Ogasawara *et al.*, 2008; Singh and Parniske, 2012).

Il a aussi été mis en évidence que le calcium semble jouer un rôle important dans les mécanismes de symbiose, dès la perception des LCOs (Capoen *et al.*, 2011; Genre *et al.*, 2009; Singh and Parniske, 2012). Les LCOs symbiotiques sont capables d'induire un influx calcique précoce similaire à celui constaté en réponse à des traitements éliciteurs (Cardenas *et al.*, 2000; Felle *et al.*, 2000; Shaw and Long, 2003b). Mais le développement de techniques permettant de suivre la concentration calcique au niveau de la cellule unique (comme les sondes de type « caméléon ») a permis de mettre en évidence que les LCOs rhizobiens et mycorhiziens sont également capables d'induire de façon prolongée des oscillations calciques particulières et répétées, avec un influx rapide et un efflux plus lent provoquant des pics asymétriques (« calcium spiking »), dans le cytoplasme mais aussi le noyau des cellules de la plante hôte (Cardenas *et al.*, 2000; Chabaud *et al.*, 2011; Kosuta *et al.*, 2008; Oldroyd and Downie, 2006; Shaw and Long, 2003b; Sieberer *et al.*, 2009). Ces oscillations calciques seraient une étape précoce importante dans la mise en place des mécanismes d'acceptation de l'interaction symbiotique. Dans ce mécanisme, une protéine LRR-RLK (MtDMI2 chez *M.truncatula* et LjSYMRK chez *L.japonicus*), les composantes d'un complexe nucléoprotéique (LjNUP85, LjNUP133 et LjNENA) ainsi qu'un canal ionique localisé sur l'enveloppe nucléaire (MtDMI1 chez *M.truncatula* et LjCASTOR avec LjPOLLUX chez *L.japonicus*) sont requis en amont du calcium spiking. En aval, sont nécessaires une protéine nucléaire calcium et calmoduline-dépendante (CCaMK) (MtDMI3/LjCCaMK) ainsi qu'une protéine nucléaire à domaine coil-coil (MtIPD3/LjCYCLOPS) qui interagit avec les CCaMK pour décoder le calcium spiking et poursuivre la signalisation (Czaja *et al.*, 2012; Geurts and Bisseling, 2002; Gough and Cullimore, 2011; Singh and Parniske, 2012) permettant l'organogénèse et le processus d'infection symbiotique (Gleason *et al.*, 2006; Madsen *et al.*,

2010; Tirichine *et al.*, 2006). Il est à noter que l'étude de flux calciques au niveau de la cellule unique (à l'aide de constructions caméléon par exemple), en réponse au traitement par des éliciteurs, n'a actuellement pas été réalisée.

### 3.2. LA PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

La cascade de signalisation implique une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont font partie l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les ROS peuvent provenir de l'apoplasme, via des peroxydases pariétales et la NADPH oxydase RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homolog) qui produit l' $O_2^{\cdot-}$ , transformé en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase (SOD), ou de la mitochondrie et du chloroplaste suite à la respiration et à la photosynthèse, respectivement. Le taux de ROS est aussi régulé par des enzymes qui dégradent l' $H_2O_2$  (catalases et ascorbate peroxydases) ou des molécules antioxydantes (glutathion, tocophérol et ascorbate) (O'Brien, Daudi, Butt, *et al.*, 2012). Les ROS régulent de nombreux processus biologiques chez les plantes, tels que la croissance, le cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée, la signalisation hormonale, les réponses aux stress, et le développement (Foreman *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2002). Tous ces mécanismes peuvent potentiellement être mis à contribution au cours des interactions avec les microorganismes.

Une production de ROS biphasique est observée au cours de l'interaction avec des microorganismes pathogènes (Baker and Orlandi, 1995). La première phase est transitoire, et se produit dès le contact avec le microorganisme. Cette phase fait probablement suite à la perception des MAMP du microorganisme et est qualifiée de non spécifique. La deuxième phase est observée plusieurs heures après l'infection. Celle-ci serait associée à une reconnaissance spécifique du microorganisme (He *et al.*, 1993). La production de ROS est observée en réponse à de nombreux éliciteurs dont la flagelline, la chitine ou encore l'heptaglucone (Felix *et al.*, 1999; Kaku *et al.*, 2006; Kuchitsu *et al.*, 1995; Mithöfer *et al.*, 2001), mais aussi suite à la reconnaissance de NF (D'Haeze *et al.*, 2003; Peleg-Grossman *et al.*, 2007; Ramu *et al.*, 2002).

Les ROS peuvent agir directement sur le microorganisme de par leur caractère toxique limitant ainsi leur développement, ou indirectement en induisant l'expression de

gènes de défense ou la synthèse de composés antimicrobiens comme les phytoalexines (Averyanov, 2009; Daudi *et al.*, 2012; Desikan *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003; O'Brien, Daudi, Finch, *et al.*, 2012; Peng and Kuc, 1992; Qiu *et al.*, 2012; Thoma *et al.*, 2003). Les ROS sont des médiateurs du renforcement de la paroi végétale via la réticulation de glycoprotéines, de subérine et de callose, et une corrélation entre l'induction de l'activité de peroxydases et la formation de lignine a pu être observée (Bradley *et al.*, 1992; Hükelhoven, 2007; O'Brien, Daudi, Finch, *et al.*, 2012). Elles sont aussi associées à la réponse hypersensible, impliquant la mort cellulaire programmée, limitant la propagation du microorganisme (Lamb and Dixon, 1997; Montillet *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2008).

Les ROS ont aussi un rôle important dans les interactions symbiotiques au cours des phases précoces et tardives (Fester and Hause, 2005; Matamoros *et al.*, 2003). Tandis que l'accumulation précoce de ROS est spécifiquement modulée par les NF, et a été comparée au burst oxydatif après l'infection par des bactéries pathogènes, l'accumulation tardive de ROS est connectée au phénomène de sénescence des nodules (Puppo *et al.*, 2005; Ramu *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2001; Shaw and Long, 2003b). Dans les symbioses à AM, l'accumulation d' $H_2O_2$  a également été mise en évidence (Salzer *et al.*, 1999).

L'interconnexion entre les ROS et le calcium est forte. La production de ROS en réponse aux signaux microbiens requiert un influx calcique cytosolique (Ogasawara *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2007). Les ROS pourraient également exercer un rétrocontrôle sur les flux calciques (Pei *et al.*, 2000; Ranf *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que les RBOH sont phosphorylées par des CDPK (Boudsocq *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2007; Ogasawara *et al.*, 2008). Les ROS permettent la poursuite du signal en activant la voie des « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK), conduisant à des régulations d'expression génique (Kovtun *et al.*, 2000; Rentel *et al.*, 2004). Plusieurs « Oxidative Stress-Responsive Elements » ont été identifiés dans les promoteurs de gènes associés à la défense chez les plantes, et quelques facteurs de transcription se liant à ces éléments cis ont été trouvés. Toutefois, les mécanismes de perception des signaux redox, et les voies de signalisation qui régulent l'activité de ces facteurs de transcription restent encore obscures.

### 3.3. LA PHOSPHORYLATION DES PROTEINES

La reconnaissance des signaux produits par les microorganismes via les récepteurs de la plante déclenche une cascade de phosphorylation qui active de multiples cibles cellulaires (Benschop *et al.*, 2007; Nühse *et al.*, 2007). Cette cascade de phosphorylation est constituée de « Mitogen-Associated Protein Kinases » (MAPKs), MAPKKs (MAP2Ks) et MAPKKKs (MAP3Ks) (Gustin *et al.*, 1998; Kyriakis and Avruch, 1996). La mise en place de complexes de perception est suivie de l'activation de MAP3Ks qui, une fois activées par phosphorylation, phosphorylent à leur tours des MAP2K conduisant à la phosphorylation de MAPK. Chez de nombreux eucaryotes, la transduction du signal correspondant à un stress oxydant est contrôlée par la voie des MAPK (Gustin *et al.*, 1998; Kovtun *et al.*, 2000; Kyriakis and Avruch, 1996; Rentel *et al.*, 2004). L'action des MAPK est contrebalancée par l'activité de protéines phosphatases qui déphosphorylent les cibles des MAPK. Cette régulation indirecte de l'activité des MAPK est dépendante du calcium (Anderson *et al.*, 2011; Francia *et al.*, 2011; Lee, Song, *et al.*, 2008). Des expériences d'expression constitutive et de silencing de MAPK dans les plantes ont révélé que les MAPK peuvent aussi agir en retour sur la production de ROS en l'induisant (Asai *et al.*, 2008; Yoshioka *et al.*, 2003).

L'activation post-traductionnelle de la cascade de MAPK par des signaux microbiens a été régulièrement rapportée. Cette cascade des MAPK s'est révélée essentielle dans l'activation des réponses de défense de la plante, telles que l'expression de gènes de PR-protéines, la réponse hypersensible, ainsi que l'induction de la synthèse et la régulation d'hormones de stress : l'acide salicylique, l'acide jasmonique, et l'éthylène (Kroj *et al.*, 2003; Kumar and Klessig, 2000; Rasmussen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2001; Zhang and Klessig, 2001). La voie des MAPK est aussi impliquée dans les mécanismes de symbiose rhizobienne et mycorhizienne. Il a été observé que l'inoculation de *Lupinus albus* par *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) conduit à l'activation transitoire de MAPK et que l'utilisation d'inhibiteurs de MAPK affecte négativement la nodulation dans cette interaction (Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). L'activation de MAPK a été aussi mise en évidence dans le cadre de la symbiose mycorhizienne (Francia *et al.*, 2011; Gallou *et al.*, 2010). Néanmoins, même si de NF rhizobiens provoquent un changement du phosphoprotéome, ils ne semblent pas activer de MAPK chez *L.japonicus* (Serna-Sanz *et al.*, 2011). De plus, *Rhizobium* sp. a recourt à un

« facteur de virulence », NopL, afin de perturber les cascades de signalisation, dont les MAPK, et bloquer l'activation de l'expression de gènes de PR-protéines (Bartsev *et al.*, 2004).

## **4. REPONSES D'ACCEPTATION OU DE REJET DU MICROORGANISME**

### **4.1. LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES**

Le système racinaire est une riche source de métabolites secondaires, dont la plupart sont spécifiques à ces tissus (Flores *et al.*, 1999). Ces produits peuvent avoir des effets marqués sur les interactions bénéfiques ou néfastes entre les plantes et les microorganismes du sol, soit en ayant une activité au sein même des tissus racinaires, soit en étant sécrétés dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2006; Pedras *et al.*, 2011).

On distingue deux catégories de métabolites secondaires impliqués dans l'immunité du fait de leur action antimicrobienne. Les phytoanticipines sont produites de façon constitutive, et les phytoalexines sont synthétisées *de novo* et s'accumulent dans la zone d'interaction avec le microorganisme, ainsi qu'en réponse aux éliciteurs. Les glucosinolates des crucifères sont des phytoanticipines largement étudiées qui deviennent toxiques après leur transformation par des  $\beta$ -thioglycosidases, ou myrosinases. Cette transformation se déroule probablement suite à la décompartmentation des tissus de la plante au cours de l'interaction avec le microorganisme.

A ce jour, de nombreuses phytoalexines ont été identifiées, et la liste des enzymes et des gènes impliqués dans leur métabolisme ne cesse de s'allonger (Frag *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2012; Shimizu *et al.*, 2012). Nous pouvons mentionner la médicarpine qui est la principale phytoalexine chez *Medicago*, appartenant à la famille des ptérocarpanes (Jasiński *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2007). Nous pouvons également citer la camalexine, produite par les crucifères qui appartient à la famille chimique des indoles alcaloïdes (Pedras *et al.*, 2000; Pedras and Yaya, 2010). Pourtant, même lorsque le rôle protecteur d'une molécule en particulier a pu être clairement défini dans un contexte déterminé, une généralisation ne peut pas toujours être faite. Il est connu qu'il peut y avoir de grandes variations concernant l'activité biologique de composés structurellement similaires, au sein de la même famille de

molécules, et qu'un même composé peut avoir des activités différentes en fonction du contexte biologique (Harborne and Williams, 2000).

Les flavonoïdes sont les précurseurs de molécules de défense variées, dont les phytoalexines font partie (Ferrer *et al.*, 2008; Winkel-Shirley, 2001). Elles sont aussi des molécules de signalisation clef dans les symbioses fixatrices d'azote, en agissant notamment comme un agent activateur des gènes relatifs à la nodulation (Broughton *et al.*, 2000; Broughton *et al.*, 2003; Cooper, 2004). Il est également connu que les flavonoïdes font partie d'un groupe de signaux qui sont échangés entre les champignons mycorhiziens à arbuscules et leurs plantes hôtes, à tous les stades de la symbiose (présymbiotique, colonisation et symbiotique). Plusieurs études, revues par Larose *et al.* (2002), ont mis en évidence l'effet des flavonoïdes non seulement sur la germination des spores et la croissance des hyphes, mais aussi sur le développement de la colonisation.

**Tableau I.2 : Classification et principales propriétés des PR-proteins**Tableau extrait de Sels *et al.* (2008).

Family	Type member	Typical size (kDa)	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	15	Antifungal
PR-2	Tobacco PR-2	30	$\beta$ -1,3-Glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	25–30	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)
PR-4	Tobacco 'R'	15–20	Chitinase class I,II
PR-5	Tobacco S	25	Thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	75	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase class III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	35	Peroxidase
PR-10	Parsley 'PR1'	17	'Ribonuclease-like'
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase class I
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	5	Thionin
PR-14	Barley LTP4	9	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	20	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	20	'Oxalate oxidase-like'
PR-17	Tobacco PRp27	27	Unknown



## 4.2. LA PRODUCTION DE PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS

Les PR-protéines sont des protéines végétales définies en tant que « protéines non détectables, ou seulement à une concentration basale, dans les tissus sains, mais dont l'accumulation au niveau protéique a été démontrée dans des conditions pathologiques, dans au moins deux combinaisons plante-microorganisme pathogène, et qui sont relatives à la défense » (Sels *et al.*, 2008). Selon cette définition, les PR-protéines ne sont pas induites au cours d'interactions non pathogènes. Jusqu'à aujourd'hui, 17 familles de PR-protéines ont été identifiées à partir de différentes espèces végétales (**Tableau I.2**). Elles sont classées en fonction de leurs propriétés, qui sont connues pour la majorité, avec plus ou moins de précision. La famille des PR-1 est connue pour ses propriétés antifongiques, mais son mode d'action reste encore énigmatique (Ahmad *et al.*, 2011; Pape *et al.*, 2010). Un certain nombre de familles rassemble des hydrolases, comme les PR-2 qui font partie des  $\beta$ -1,3-glucanases, les PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11 qui sont des chitinases, les PR-6 qui sont des inhibiteurs de protéases, ou encore les PR-10 qui présentent une activité Ribonuclease-like (Antoniw *et al.*, 1980; Majeau *et al.*, 1990; Melchers *et al.*, 1994; Metraux *et al.*, 1989).

## 4.3. LES MODIFICATIONS DE LA PAROI

Un mécanisme de défense communément observé consiste en un renforcement de la paroi de la plante au site d'infection (Hückelhoven, 2007). Ce renforcement, aussi appelé « papillae » dans le cas d'appositions localisées, est constitué de callose, de lignine et d'extensines.

La formation de callose,  $\beta$ -1,3-glucanes de hauts poids moléculaires, se produit suite à une blessure ou à une attaque par un agent pathogène et participe à la réparation des dommages physiques. Cette réaction a pu aussi être observée chez *A.thaliana* suite à la perception d'éliciteurs, tels que la chitine ou la flagelline (Millet *et al.*, 2010). La synthèse de ce composé se fait chez *A.thaliana* par GLS5/PMR4 (Glucan Synthase 5/Powdery Mildew Resistant 4) et est importante pour la résistance pré-invasion (Nishimura *et al.*, 2003).

La lignine est un composant hydrophobe qui rend les parois secondaires imperméables à l'eau. Une hyperlignification est observée chez de nombreux mutants affectés dans la synthèse de cellulose et en réponse aux parasites (Hématy *et al.*, 2007). Ce

phénomène joue également un rôle dans la résistance à la colonisation par des parasites fongiques ou oomycètes, comme, par exemple, dans les feuilles de blé infectées par *Blumeria graminis* (Bhuiyan *et al.*, 2009), ou dans des racines de *M.truncatula* infectées par *Aphanomyces euteiches* (Djébali *et al.*, 2009; Djébali *et al.*, 2011).

Les extensines sont des HRGPs (Hydroxy Proline Rich Glycoproteins) qui par la formation de liaisons inter et intramoléculaires renforcent la paroi (Cannon *et al.*, 2008), ce qui explique que leur surexpression chez *Arabidopsis* augmente la résistance aux parasites (Wei and Shirsat, 2006).

Au cours des symbioses, la modification de la paroi de la plante revêt aussi un aspect crucial, et s'illustre en particulier dans les étapes précoces de l'infection, par exemple lors de la formation du cordon d'infection dans la symbiose rhizobienne ou lors de la pénétration de l'épiderme racinaire par un champignon mycorhizien. A ce moment-là, on peut observer que les cellules de la plante réorganisent leur paroi et leur structure afin de créer un passage par lequel les bactéries ou le champignon mycorhizien pourront pénétrer les cellules en les laissant intactes (Genre *et al.*, 2005; van Spronsen *et al.*, 1994). Il a récemment été montré chez *Lotus japonicus* que la pectate lyase, dont le rôle est de dégrader les pectines, est requise pour l'infection des poils absorbants et la formation des nodules (Marin-Rodriguez, 2002; Xie *et al.*, 2012). L'acceptation des microorganismes symbiotiques implique donc une fragilisation contrôlée de la paroi.

## 5. RELATIONS ENTRE LES SIGNALISATIONS SYMBIOTIQUE ET DEFENSIVE

Tous les microorganismes, bénéfiques ou néfastes, présentent potentiellement des MAMP susceptibles d'être reconnus par les plantes et d'activer leurs défenses. Les légumineuses ont la capacité de faire la différence entre les microorganismes pathogènes et symbiotiques et de mettre en place des mécanismes appropriés afin d'établir une interaction commensale ou de se défendre contre l'infection. Les COs issus de la dégradation de la chitine fongique, les NF, qui sont des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) produits par les bactéries de la nodulation *Rhizobium*, et les Myc-LCOs produits par les champignons mycorhizien, possèdent des structures proches au niveau moléculaire, mais leur reconnaissance induit des réactions opposées chez la plante. Cependant, les LCOs et les COs partagent les mêmes types de récepteurs : Leurs domaines LysM ont une structure qui permet de lier la NAG présente dans la chitine, mais aussi dans les LCOs symbiotiques (Gough and Cullimore, 2011). La perception des COs par les récepteurs à domaine LysM est de mieux en mieux comprise chez *A.thaliana* et *O.sativa*, mais reste énigmatique chez les légumineuses. En revanche, de nombreuses analyses génétiques impliquent les récepteurs à domaines LysM dans la perception des NF, voire des Mys-LCOs (Gough and Cullimore, 2011; Op den Camp *et al.*, 2011). Ainsi, l'étude des récepteurs à domaine LysM est au cœur de la problématique de la discrimination par les plantes des signaux symbiotiques et pathogènes contenant de la NAG.

Il y a une différence considérable entre les concentrations des COs et LCOs pour induire les réponses de la plante. Les NF montrent une activité à une concentration de  $10^{-13}$  M dans les essais les plus sensibles, et les Myc-LCOs à  $10^{-11}$  M, alors que dans la plupart des études sur les COs, les réponses sont obtenues à des concentrations supérieures à  $10^{-9}$  M (Gough and Cullimore, 2011). Pourtant, à des concentrations similaires, NF et COs de chitine peuvent induire les mêmes réponses. Il a été observé qu'un NF à concentration élevée ( $10^{-6}$  M) est capable d'activer des défenses de la plante, comme le fait le chitotétraose à la même concentration (Savouré *et al.*, 1997). A l'inverse, le chitopentaose à faible concentration ( $10^{-8}$  M), est capable d'induire chez le pois des oscillations calciques de la même nature que celles induites par un NF (Walker *et al.*, 2000). Les NF et le chitotétraose induisent tous deux un influx rapide de calcium (Müller *et al.*, 2000). Celui-ci nécessite une concentration en NF

supérieure à celle nécessaire aux oscillations calciques, mais cela ne semble pas perturber l'induction de la voie symbiotique (Shaw and Long, 2003a).

Suite à la perception des NF, la production de ROS extracellulaires est inhibée (Shaw and Long, 2003b). Cette inhibition est nécessaire à la déformation des poils absorbants de la plante, qui est l'une des premières étapes de la mise en place de la symbiose (Lohar *et al.*, 2007). Mais des résultats contradictoires ont été rapportés, avec un niveau de ROS élevé au cours de l'infection rhizobienne chez *M.sativa*, ou après traitement avec des NF purifiés (D'Haeze *et al.*, 2003; Ramu *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2004). Alors que la production de ROS est une étape importante dans la mise en place des défenses de la plante au cours des interactions avec des microorganismes pathogènes, les ROS cytoplasmiques sont aussi capable de supprimer l'expression de gènes relatifs à la défense, tels que des gènes de PR-protéines, au cours des interactions symbiotiques (Peleg-Grossman *et al.*, 2012). A ce constat s'ajoutent des indices indiquant que les ROS sont nécessaires à la croissance des hyphes et à la différenciation cellulaire fongique, ce qui permet de spéculer sur leur rôle favorisant les symbioses mycorhiziennes (Takemoto *et al.*, 2007).

Au sein de la famille des MAPK, la MAPK GMK1 du soja s'est révélée être un médiateur de la signalisation en réponse à un large spectre de stimuli, dont des éliciteurs fongiques et l'interaction symbiotique avec *B.japonicum*, suggérant que l'un des points de croisement entre signalisations symbiotique et pathogène peut être les MAPK (Lee, Kim, *et al.*, 2008). De façon surprenante, un fort niveau de conservation du phosphoprotéome induit par les NF et le MAMP flg22 chez *L.japonicum* a été constaté, indiquant que les réponses aux signaux symbiotiques et pathogènes conservent une collection commune de protéines pour la phosphorylation (Serna-Sanz *et al.*, 2011). Les mutants utilisés dans cette étude indiquent aussi que la convergence des voies se produit en aval des RLK spécifiques. Cette convergence des voies symbiotiques et pathogènes au sein du phosphoprotéome se reflète au niveau de la régulation de l'expression génique qui est similaire pour un certain nombre de gènes au cours des interactions symbiotiques et pathogènes (Mitra *et al.*, 2004; Serna-Sanz *et al.*, 2011). Cela concorde avec la capacité des NF à induire des gènes relatifs à la défense, et à l'inverse, des COs de chitine à activer des gènes relatifs à la symbiose (Gough and Cullimore, 2011; Nakagawa *et al.*, 2011; Savouré *et al.*, 1997).

Les flavonoïdes ont aussi un rôle versatile. Elles sont à la fois un élément crucial de la défense de la plante (Ahuja *et al.*, 2012), et sont impliquées dans le dialogue moléculaire mis

en place au cours des symbioses, contrôlant le développement des microorganismes symbiotiques (Broughton *et al.*, 2000; Cooper, 2004; Larose *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2006).

D'autres phénomènes semblent indiquer une relation proche entre les réponses symbiotiques et pathogènes, tels que le défaut de croissance cellulaire induite par les NF dans les poils absorbants, ou encore la mort cellulaire provoquée par la co-expression de récepteurs aux NF chez *Nicotiana benthamiana* (Madsen *et al.*, 2011; Shaw and Long, 2003b). Ce dernier résultat rappelle ce qui a pu être précédemment observé concernant la perception des NF comme des éliciteurs, chez le tabac (Baier *et al.*, 1999). Les microorganismes symbiotiques semblent avoir développé des stratégies afin de contourner l'activation des défenses, en ayant recours à une méthode similaire à celle utilisée par les microorganismes pathogènes, c'est-à-dire par l'injection d'effecteurs, comme cela a pu être observé pour *Rhizobium* sp NGR234 (Bartsev *et al.*, 2004). Mais dans le cas des mycorhizes les mécanismes de contrôle sont encore inconnus (Campos-Soriano *et al.*, 2010). Toutefois, contrairement aux microorganismes pathogènes, les mécanismes de contournement des défenses que les microorganismes symbiotiques emploient semblent laisser à la plante la possibilité de contrôler le degré de sa colonisation par les microorganismes (Campos-Soriano and San Segundo, 2011; Masunaka *et al.*, 2011).

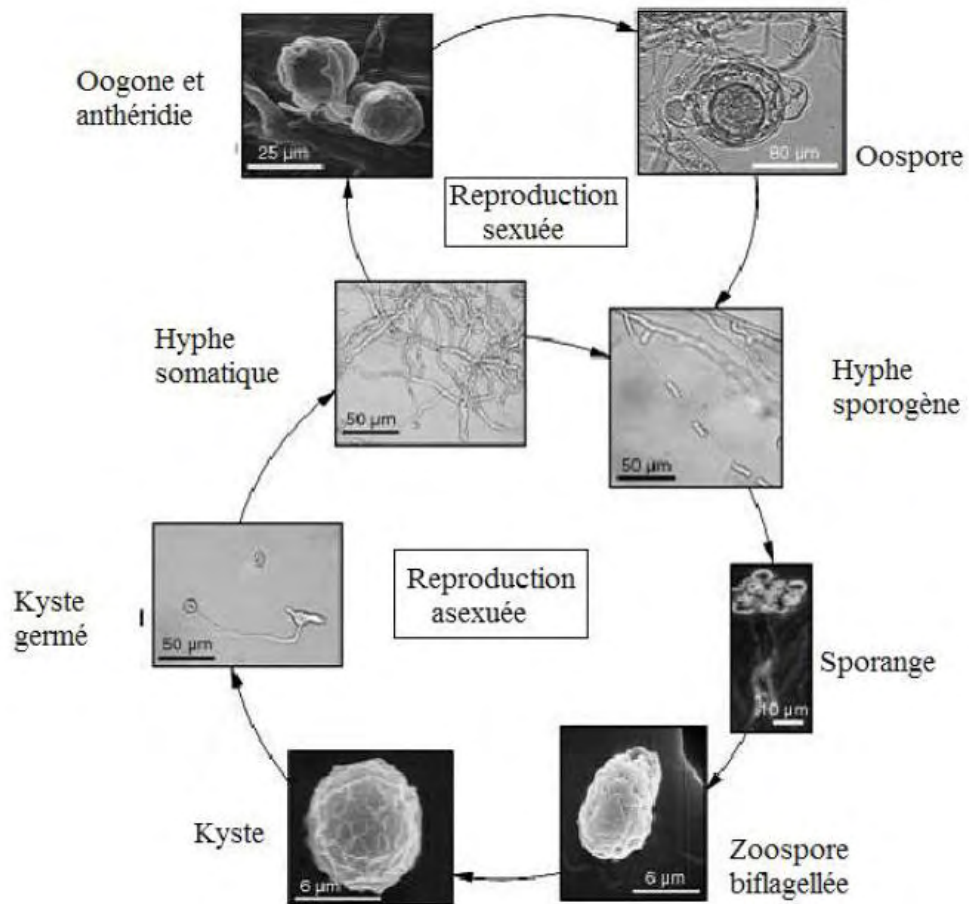
L'hypothèse selon laquelle la symbiose et la pathogénèse ne sont en définitive que des variations sur un thème commun n'est pas nouvelle (Baron and Zambryski, 1995), et a été régulièrement évoquée depuis quelques années (Fernandez-Pascual *et al.*, 2006; Genre *et al.*, 2009; Hamel and Beaudoin, 2010; Hérouart *et al.*, 2002; Lipka *et al.*, 2005; Parniske, 2000; Shaw and Long, 2003b; Soto *et al.*, 2009).

Ainsi, face à des composés provenant de microorganismes symbiotiques ou pathogènes, nous pouvons nous attendre à ce que les voies de signalisation soient fortement entrelacées. En réalité, les marqueurs précoces classiquement utilisés pour révéler ces voies de signalisation de symbiose et de défense manquent de fiabilité. Seules les études globales permettant de représenter toute la plante à un moment donné, telles que les analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques, peuvent permettre de déterminer la véritable nature de la réaction de la plante.

## **PRESENTATION DU PATHOSYSTEME APHANOMYCES EUTEICHES-MEDICAGO TRUNCATULA ET DES OBJECTIFS DE LA THESE**

### **1. INTRODUCTION AUX OOMYCETES**

Chez les microorganismes eucaryotes, la capacité à croître de façon filamenteuse est partagée par les champignons du phylum *fungi* et les oomycètes. Ces derniers présentent également d'autres caractères, comme l'hétérotrophie, la nutrition par absorption et la dissémination par des spores, qui les font souvent assimiler aux champignons (Money, 1998). Ils s'en distinguent néanmoins par de nombreuses caractéristiques originales, parmi lesquelles une reproduction asexuée par libération de zoospores mobiles biflagellées, un cycle diplophasique avec reproduction sexuée oogame (production d'oospores) et la présence de cellulose dans les parois (Alexopoulos, 1952; Cavalier-Smith, 1997; Liaud *et al.*, 2000). Les études phylogéniques récentes ont montré la grande distance évolutive qui sépare les deux groupes en plaçant les oomycètes dans le phylum des hétérokontes, ou Straménopiles, avec les diatomées et algues brunes (Baldauf, 2003). Les oomycètes regroupent plusieurs centaines d'espèces parasites d'animaux ou de plantes, dont les plus importantes au niveau économique sont les espèces phytopathogènes telles que *Phytophthora infestans*, responsable de la grande famine de 1845-1846 qui décima l'Irlande, en détruisant la production de pomme de terre; *Plasmopara viticola*, qui a fait son apparition en France en 1878 et dévasta le vignoble européen; ou encore *Phytophthora citrophthora* qui ravagea les plantations d'agrumes dans tout le Bassin Méditerranéen à la même époque. Le genre *Aphanomyces* est pour sa part, selon les espèces, responsable de maladies affectant soit des animaux, comme *Aphanomyces astaci* responsable de la peste de l'écrevisse, soit des végétaux, comme *Aphanomyces cochlioides* qui est l'une des causes de pourriture racinaire chez la betterave, ou encore *A.euteiches*, responsable de pourriture racinaire chez différentes légumineuses (Gaulin *et al.*, 2007).



**Figure 1.4 :** Cycle de reproduction d'*A. euteiches*  
 Illustration extraite de Gaulin *et al.* (2007).

## **2. LA POURRITURE DES RACINES CAUSEE PAR *APHANOMYCES EUTEICHES***

*A.euteiches* infecte plusieurs espèces annuelles et pérennes de la famille des légumineuses: pois (*Pisum sativum* L.), fève (*Vicia faba* L.), pois chiche (*Cicer arietinum* L.), lentille (*Lens culinaris* L.), lupin (*Lupinus alba*), vesse (*Vicia sativa*), trèfle (*Trifolium repens* et *T. pratense*), haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) (Hughes and Grau, 2007; Moussart *et al.*, 2008). *A.euteiches* est une espèce homothallique, c'est-à-dire que sa reproduction sexuée peut se réaliser sans l'interaction de deux thalles différents. Le cycle de développement se déroule dans le système racinaire de la plante hôte même si le mycélium peut aussi coloniser les parties aériennes (Levenfors, 2003). Il inclut une phase de reproduction sexuée et une phase de reproduction asexuée (**Figure I.4**). Lors de la reproduction sexuée, après fécondation d'un oogone par une anthéridie, il y a production d'oospores. Ces structures peuvent persister jusqu'à 10 ans dans le sol et constituent la forme principale de conservation du parasite (Papavizas and Ayers, 1974). Lors de la reproduction asexuée, à partir du mycélium, des sporocystes filamenteux (hyphes sporogènes) produisent des kystes primaires qui vont libérer des zoospores biflagellées. Celles-ci sont mobiles dans l'eau et représentent la principale forme de dissémination à court terme du pathogène. Les zoospores sont attirées par chimiotactisme par la punetine, un flavonoïde présent dans les exsudats racinaires du Pois (Sekizaki *et al.*, 1993). Une fois en contact avec l'hôte, les zoospores perdent leurs flagelles puis s'entourent d'une paroi en formant un kyste. Les kystes germent en produisant un hyphes infectieux qui pénètre dans la racine. Les détails du mode d'infection par ce parasite restent encore mal connus. En effet, aucune structure similaire aux structures de pénétration (appressorium) ou d'invasion (haustorium) connues chez les champignons, n'a été mise en évidence à ce jour (Kjoller and Rosendahl, 1998). A l'intérieur des tissus racinaires, les hyphes coenocytiques se développent de façon majoritairement intercellulaire (Badreddine *et al.*, 2008; Djébali *et al.*, 2009) et formeront, après quelques jours, les appareils reproducteurs : l'anthéridie et l'oogone. L'anthéridie pénètre l'oogone avec les tubes de fertilisation, qui fournissent les noyaux mâles à l'oogone, ayant pour résultat la formation des oospores diploïdes.

Chez le pois, les premiers symptômes apparaissent sur les racines qui deviennent de couleur jaunâtre puis prennent une teinte brune. A un stade plus avancé de l'infection, les symptômes apparaissent au niveau des parties aériennes qui se chlorosent, flétrissent et





**Figure 1.5 :** Différents stades de dégénérescence de plantes de pois affectées par *A.euteiches*  
(photo de C. R. Grau, apsnet.org)

meurent (Gaulin *et al.*, 2007). *A.euteiches* peut infecter les plantes à n'importe quel moment de leur stade de développement. La **Figure I.5** montre différents stades de dégénérescence de plantes de pois affectées par *A.euteiches*. A l'échelle de la parcelle pour les cultures de pois, les symptômes de cette maladie se manifestent par un jaunissement des plantes, qui apparaît par foyer. La dissémination d'*A.euteiches* se fait horizontalement par l'eau à partir des foyers d'infestation. Les plantes infectées qui arrivent au terme de leur cycle végétatif produisent un nombre faible de gousses avec des petites graines. Dans le cas où le sol est fortement infesté et lorsque les conditions climatiques sont favorables, les plantes meurent avant même la production de gousses (Gilbert, 2003). Les symptômes les plus accentués ont été remarqués sur des parcelles avec un faible drainage d'eau résultant d'une texture du sol très argileuse et/ou d'une irrigation excessive. La température optimale d'infection par *A.euteiches* est entre 14°C et 18°C, cependant ce parasite est plus destructeur si la température atteint 28°C avec un temps humide ou pluvieux. Un été chaud et sec entrainera une expression des symptômes plus rapide et intense car l'altération du système racinaire amplifiera l'effet du manque d'eau (Djébali, 2008). En France, il s'est développé récemment dans les régions à grande production de pois du Bassin Parisien à cause de l'intensification de la culture depuis 1980 et des conditions climatiques favorables à son développement. Cette maladie est considérée comme la plus grande menace pour la production du pois protéagineux. Elle peut engendrer la perte totale de la récolte. A ce jour, il n'existe aucune variété résistante commercialisée. Il n'existe pas non plus de lutte chimique ou de fongicide efficace.

### **3. LE PATHOSYSTÈME *APHANOMYCES EUTEICHES*-*MEDICAGO TRUNCATULA***

Le pathosystème entre la légumineuse modèle *M.truncatula* et l'oomycète pathogène *A.euteiches* a été mise au point il y a quelques années (Nyamsuren *et al.*, 2003) et développé dans l'équipe (Djébali *et al.*, 2009). L'interaction entre *M.truncatula* et *A.euteiches* est un modèle d'étude adapté pour étudier la maladie causée par ce microorganisme et comprendre les moyens de perception de la plante. La souche d'*A.euteiches* isolée du pois a été retenue car elle affecte de manière différentielle les lignées de *M.truncatula* disponibles, contrairement aux deux autres souches isolées de la luzerne qui affectent avec des degrés similaires d'agressivité les lignées testées et ne permet donc pas de différencier les lignées. Le phénotype infectieux de différentes lignées a été évalué sur plusieurs critères comme le pourcentage de brunissement des racines, le pourcentage de plantes mortes à 21 jours après inoculation, le nombre de racines latérales apparues après inoculation. D'après ces critères, les lignées F83 et A17 montrent des différences de sensibilité à l'infection par *A.euteiches*. Ces lignées ont pu être classées comme sensible pour F83 et partiellement résistante pour A17 (Djébali *et al.*, 2009).

### **4. DECOUVERTE DE COMPOSES A NAG DANS LA PAROI D'*A.EUTEICHES***

Chez les microorganismes eucaryotes, la paroi cellulaire est principalement composée de polysaccharides et de protéines. Chez les champignons, la chitine et les  $\beta$ -glucanes en sont les polysaccharides structuraux majeurs. Les oomycètes, pour leur part, ont souvent été considérés comme des microorganismes cellulotiques dénués de chitine. Mais l'analyse des sucres des parois cellulaires a révélé de petites quantités de *N*-acétylglucosamine (NAG) chez différents oomycètes. La proportion de NAG parmi les sucres de la paroi est de 0.3 à 2.3% chez les espèces de *Phytophthora* étudiées, de 1.3% chez *Pythium ultimum*, 0.7% chez *Saprolegnia monoica*, et de 2.7 à 4% chez les espèces d'*Achlya* étudiées (Aronson, 1965; Aronson and Bertke, 1987; Bartnicki-Garcia, 1966; Bulone *et al.*, 1992; Dietrich, 1975; Sietsma *et al.*, 1969). De plus, de la chitine cristalline a été détectée sans ambiguïté chez *Achlya*, *S.monoica*, *Apodachlya*, *Leptomitus* et *Apodachlyella* (Aronson and Lin, 1978; Bertke and Aronson, 1980; Bulone *et al.*, 1992; Campos-Takaki *et al.*, 1982; Lin and Aronson, 1970). Des gènes de chitine synthase ont pu être identifiés chez *Plasmopara*

*viticola*, *A.euteiches*, *S.monoica*, et toutes les espèces de *Phytophthora* séquencées (Badreddine *et al.*, 2008; Mort-Bontemps *et al.*, 1997; Werner *et al.*, 2002). Chez *S.monoica*, l'activité chitine synthase a pu être attestée (Briolay *et al.*, 2009; Bulone *et al.*, 1992; Guerriero *et al.*, 2010).

Chez *A.euteiches*, les analyses de sa paroi, effectuées par Badreddine *et al.* (2008), ont attesté la présence de NAG à hauteur de 10%. La caractérisation du matériel contenant cette NAG, par des analyses biophysiques, a révélé qu'il correspond à des polymères non cristallins et solubles, qui ont été nommés «chitosaccharides». Le marquage par une lectine a montré qu'au moins une partie des chitosaccharides est exposée à la surface des hyphes. Deux gènes putatifs de chitine synthase ont été identifiés et l'étude de l'effet de la nikkomycine Z, un inhibiteur de chitine synthases, a mis en évidence le rôle structural des chitosaccharides dans la paroi, suggérant leur liaison avec les glucanes squelettiques typiques de la paroi des oomycètes, à savoir la cellulose et les  $\beta$ -1,3-glucanes (Badreddine *et al.*, 2008).

## **5. PROJET DE RECHERCHE**

Il a été montré que la perception de la chitine se fait par des récepteurs contenant des domaines extracellulaires de type Lysin Motif (LysM) chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que chez *Oryza sativa* (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2010). Cette perception conduit à la transduction d'un signal suite à la phosphorylation du récepteur kinase CERK1 chez *A.thaliana* (Petutschnig *et al.*, 2010). Ce signal aboutit à l'activation de la défense de la plante. Des chitooligosaccharides de chitine (COs) induisent également la défense chez les légumineuses (Day *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2011), mais le récepteur impliqué, potentiellement une protéine membranaire à domaine LysM, n'est pas encore identifié. Chez ces plantes, les LCOs rhizobien et mycorhizien induisent quant à eux des mécanismes d'acceptation du microorganisme. Or ils partagent une importante similitude avec les COs de par leur squelette de NAG (Gough and Cullimore, 2011), et la perception des NF implique également des récepteurs putatifs à domaine LysM, tels que NFP et LYK3 chez *M.truncatula*. Ceci suggère qu'il existe chez les légumineuses un jeu de récepteurs et de voies de signalisation finement régulé permettant à la plante de discriminer des signaux structurellement proches et de mettre en place des réponses opposées.

## Introduction

La mise en évidence de chitosaccharides dans les parois d'*A.euteiches* soulève de nombreuses questions concernant leur structure et leur potentielle perception par la plante hôte. Des essais d'infection de mutants du récepteur NFP de *M.truncatula* par *A.euteiches* ont révélé une tolérance diminuée de la plante mutante comparée à la lignée sauvage (Rey *et al.*, 2013). Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse que les chitosaccharides induisent l'immunité de *M.truncatula* et que NFP est impliqué soit dans leur perception soit dans l'induction des réponses de défense qu'ils élicitent. Ainsi, dans le cadre de mon projet de thèse, la caractérisation des chitosaccharides d'*A.euteiches* a été entreprise. Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont présentés en deux chapitres.

Dans le premier chapitre, la mise au point d'un système expérimental permettant d'étudier les réponses des racines de *M.truncatula* aux éliciteurs microbiens et en particulier aux COs de chitine sera exposé.

Dans le deuxième chapitre, la purification des chitosaccharides d'*A.euteiches* et leur étude structurale par des méthodes biochimiques et biophysiques complémentaires seront exposées, suivies de l'étude de leur activité biologique.

Ensuite, les matériels et les méthodes qui ont été utilisés pendant ce travail seront présentés.

**CHAPITRE 1 : UN SYSTEME EXPERIMENTAL  
POUR ETUDIER LES REPONSES DES RACINES  
DE *M.TRUNCATULA* AUX OLIGOMERES DE  
CHITINE DE DEGRE DE POLYMERISATION  
ELEVE ET AUTRES ELICITEURS MICROBIENS**

## **INTRODUCTION**

Les éliciteurs sont décrits comme des facteurs de stress qui déclenchent directement ou indirectement des changements dans le système des défenses inductibles de la plante. Cela se traduit par l'activation de signaux qui conduisent à l'induction de mécanismes de défense de la plante (Goel *et al.*, 2011). Pour mettre en évidence l'activité élicitrice d'une molécule et en étudier l'activité biologique, le développement de bioessais est nécessaire. Il est de plus en plus reconnu que l'induction des défenses des plantes par les éliciteurs est particulièrement sensible aux changements mineurs de leur environnement. Cela a été notamment rapporté dans les travaux de Luna *et al.* (2011) sur le dépôt de callose chez *A.thaliana*, montrant que l'action d'une hormone peut être stimulatrice ou inhibitrice de ce mécanisme, en fonction des conditions de culture. Les conditions de culture et de traitement dans les bioessais ont donc une importance capitale dans l'étude de l'activité biologique d'éliciteurs.

*Arabidopsis thaliana* est une plante présentant un port étalé, dont les graines et les jeunes plantes germées sont de petite taille, ce qui permet de mettre en place des essais miniaturisés sur de jeunes plantes entières. La germination d'*A.thaliana* peut se faire en milieu liquide, et sa culture en microplaque en milieu liquide est très utilisée pour les essais d'élicitation (Adams-Phillips *et al.*, 2010; Albert *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2011; Millet *et al.*, 2010; Saijo *et al.*, 2009). D'autre part, les plantes d'*A.thaliana* cultivées en terre présentent de grandes feuilles permettant de réaliser facilement des infiltrations foliaires (Fu *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Yakushiji *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). Au contraire d'*A.thaliana*, *Medicago truncatula* est une plante présentant un port érigé, dont les graines et les jeunes plantes germées sont beaucoup plus grandes, et dont les feuilles sont petites et fragiles, ce qui rend les infiltrations foliaires délicates. La majorité des essais d'élicitation sur *M.truncatula* sont faits sur des cultures cellulaires (Broeckling *et al.*, 2005; Farag *et al.*, 2008; Gokulakannan and Niehaus, 2010; Lei *et al.*, 2010; Scheidle *et al.*, 2005; Selim *et al.*, 2010; Tellström *et al.*, 2007; Trapphoff *et al.*, 2009). La génération de ces cultures cellulaires demande généralement de passer par la formation de cals à partir de tissus racinaires ou foliaires et de ce fait est assez longue, huit semaines en moyenne (Broeckling *et al.*, 2005; Farag *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2010; Scheidle *et*

*al.*, 2005; Selim *et al.*, 2010; Trapphoff *et al.*, 2009). Une fois générées, les cultures cellulaires nécessitent une agitation rotative constante ainsi qu'un repiquage régulier toutes les deux à quatre semaines. L'utilisation de ce type de matériel se fait à un stade de croissance donné ou la viabilité de la culture est optimale, ce qui nécessite une vérification régulière de l'état de la culture afin d'éviter sa dérive. L'élicitation se fait par l'ajout de l'éliciteur concentré dans le milieu de culture.

La plupart des autres systèmes de culture et d'élicitation de *Medicago* sont souvent très brièvement décrits dans la littérature, et l'âge des plantes utilisées rarement indiqué. La méthode employée par Savoré *et al.* (1997) avec *M.sativa* consiste à cultiver stérilement les plantes en boîte de Petri sur milieu gélosé durant environ une semaine et de déposer une goutte d'éliciteur sur la racine, ce qui conduit à une élicitation localisée. Pour éliciter les organes aériens, Leitner *et al.* (2008) font pousser les plantes en terre dans des conditions non stériles, coupent la plante au niveau du sol et plongent la tige sectionnée dans la solution élicitrice. Les auteurs indiquent que la blessure causée n'induit que peu l'émission des composés volatils auxquels ils s'intéressent.

La culture hydroponique a aussi été développée pour *Medicago*. Dans les travaux de Chandran *et al.* (2008), les jeunes plantes de *M.truncatula* sont placées à travers les mailles du fond de pots en polypropylène. Les pots sont placés sur un insert en plastique placé dans un bac contenant 7 L de milieu de culture. Bonfranceschi *et al.* (2009) placent les graines germées sur un tripode en plastique percé sur le haut, posé dans un pot en verre contenant le milieu liquide. Le milieu est aéré à l'aide d'une pompe à air. Fei and Vessey (2009) cultivent *M.truncatula* stérilement dans des poches placées dans un container opaque. Les poches sont alimentées en milieu par une pompe péristaltique. Wang *et al.* (2011) et Rodriguez-Celma *et al.* (2011) cultivent *M.truncatula* et *M.sativa* dans des récipients de grand volumes (10L et 25L), remplis de milieu de culture liquide avec aération par une pompe à air, ou sans aération du milieu. Tous ces systèmes demandent la réalisation artisanale de montages techniques délicats à maintenir stériles.

Ces méthodes de culture sont peu adaptées à des traitements éliciteurs dont les quantités sont souvent limitantes, ce qui implique de manipuler des plantes de petite taille, et en condition stérile de préférence. Le meilleur compromis est proposé par Selim *et al.* (2010) qui cultivent *M.truncatula* de façon hydroponique en plaque 12 puits couverte afin de limiter l'évaporation. Toutefois ce mode de culture est utilisé par les auteurs uniquement à



des fins d'inoculation avec un microorganisme pathogène. Les auteurs préfèrent effectuer les traitements d'élicitation sur des cultures cellulaires.

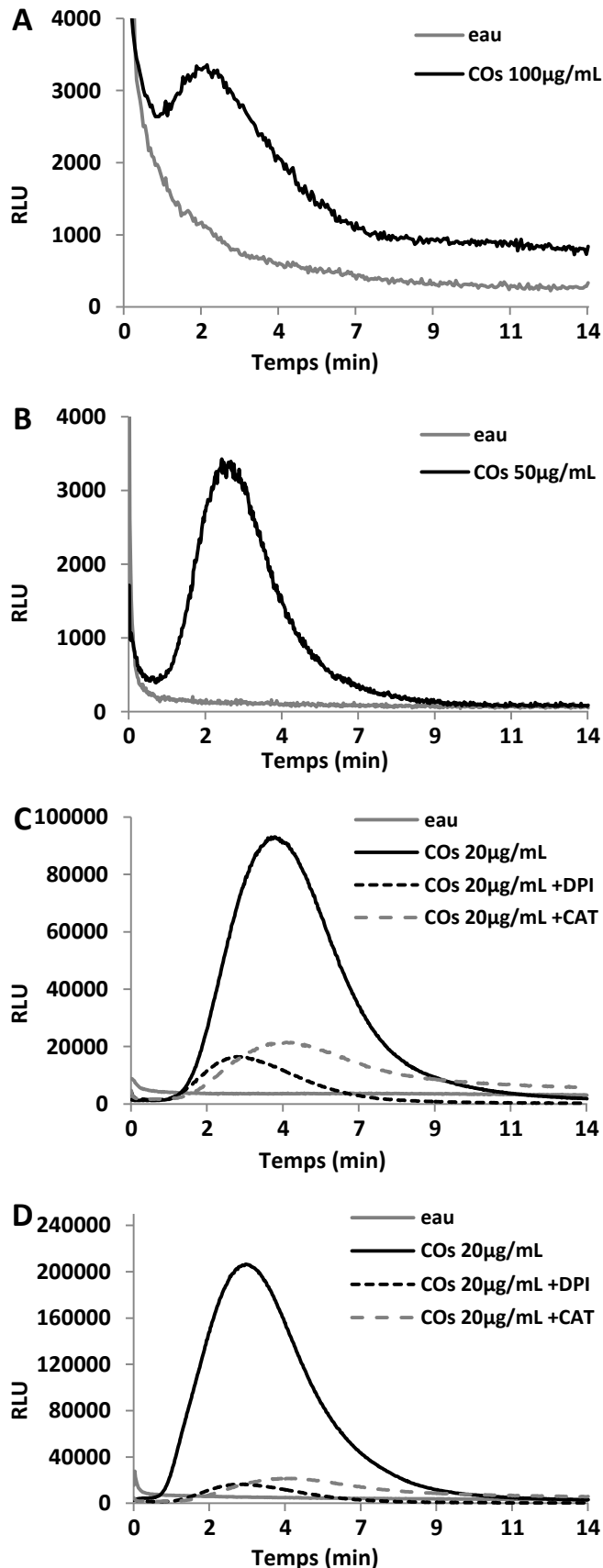
L'utilisation de bioessais est incontournable pour mettre en évidence et étudier l'activité élicitrice d'une molécule. Toutefois, un criblage établi sur la base d'une seule réponse de la plante ne saurait être suffisant pour sélectionner des molécules inductrices des défenses des plantes. En effet, de nombreux marqueurs de signalisation chez les plantes peuvent se montrer versatiles. L'absence de leur induction ne témoigne pas nécessairement de l'absence de perception. Le recours à des constructions rapportrices est un procédé lourd à développer, mais qui peut permettre d'étudier l'activité de signaux microbiens plus finement ou spécifiquement, telles que la construction 35S:NupYC2.1 de Sieberer *et al.* (2009) qui permet l'expression d'un rapporteur caméléon dépendant du calcium et adressé au noyau. Cette construction permet de déterminer une signature calcique par FRET (Chabaud *et al.*, 2011). Les constructions rapportrices peuvent aussi permettre de révéler simplement l'induction d'une voie de signalisation complète, comme la construction rapportrice promoteur *MtENOD11*-GUS, qui possède la région promotrice du gène *ENOD11* couplé au gène codant l'enzyme de la glucuronidase, ce qui permet d'étudier l'activation de la voie symbiotique en révélant l'activité de la glucuronidase (Charron *et al.*, 2004; Journet *et al.*, 2001). Les constructions promoteur-GUS permettent de mettre en évidence l'activation de l'expression de gènes associés à la défense plus rapidement, quantitativement et à moindre coût que cela serait fait par PCR quantitative en temps réel (Bahramnejad *et al.*, 2010).

Dans ce chapitre, les objectifs étaient de mettre au point un bioessai afin d'étudier l'activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches* chez la plante hôte *M.truncatula*, présenté au chapitre suivant. *A.euteiches* étant un parasite racinaire, le bioessai doit être développé sur l'appareil racinaire de la plante. La résistance à l'infection chez *M.truncatula* semble faire intervenir le récepteur NFP (Rey *et al.*, 2013). Or, dans les cultures d'organes racinaires la signalisation connue passant par NFP n'est pas fonctionnelle. Les plantes entières semblent donc être le matériel le plus indiqué, se rapprochant des conditions de l'interaction naturelle, et permettant de réaliser des comparaisons entre des plantes sauvages et mutantes *nfp*. Le bioessai doit être rapide et facile à réaliser afin d'envisager une purification des chitosaccharides pariétaux d'*A.euteiches* basée sur la révélation de l'activité

biologique. Il doit permettre dans un premier temps de révéler la perception par la plante, et dans un deuxième temps permettre la mise en évidence de l'induction de l'immunité. La perception des chitosaccharides d'*A.euteiches* étant inconnue, un marqueur de signalisation, la production de ROS extracellulaires, a été choisi pour révéler leur perception car il est rapide et présente un caractère « non spécifique », contrairement à des marqueurs de défense comme le dépôt de callose qui est beaucoup plus lent et « spécifique ». L'analyse de l'expression de gènes associés à la défense est la méthode qui a été choisie pour mettre en évidence l'induction subséquente de l'immunité.

Le développement de ce bioessai a nécessité d'avoir un éliciteur témoin abondant, potentiellement structuralement proche des chitosaccharides, comme des COs de chitine. Lorsque ces travaux ont débuté, des COs de chitine de degré de polymérisation 6, 7 et 8 n'étaient pas commercialement disponibles à des prix supportables pour le laboratoire. La préparation d'une fraction abondante de COs de chitine de degré de polymérisation supérieur ou égal à 7 a été entreprise.

Ces travaux ont conduit à une publication qui sera présentée dans ce chapitre. Des résultats complémentaires concernant l'exploitation de ce bioessai ainsi que le développement d'une construction rapportrice de la défense seront ensuite exposés.



**Figure 1.1: Mesure en cinétique de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par *M. truncatula* en réponse aux COs de chitine**

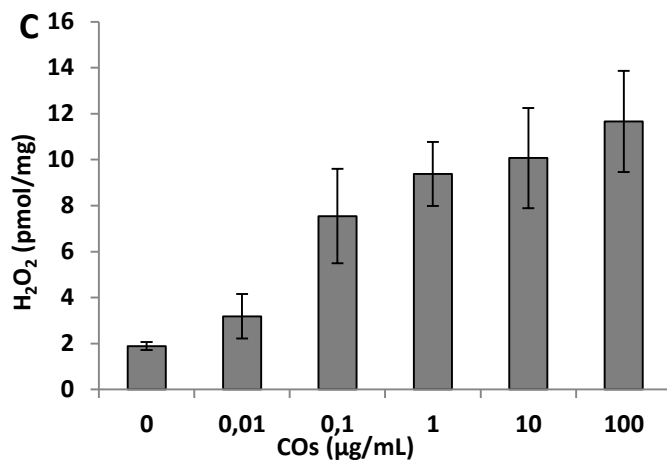
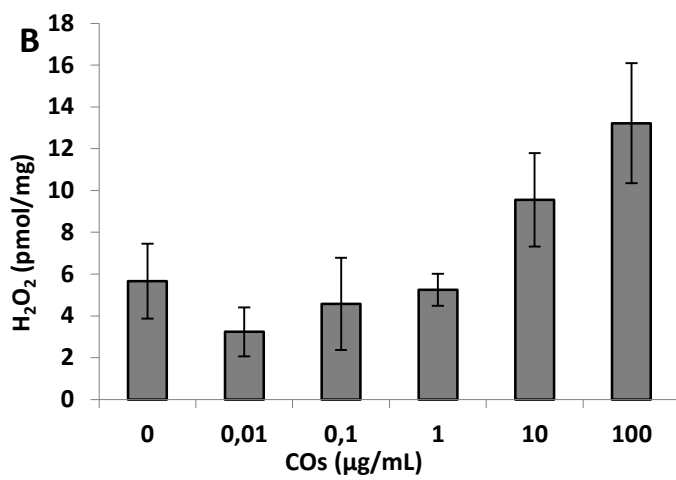
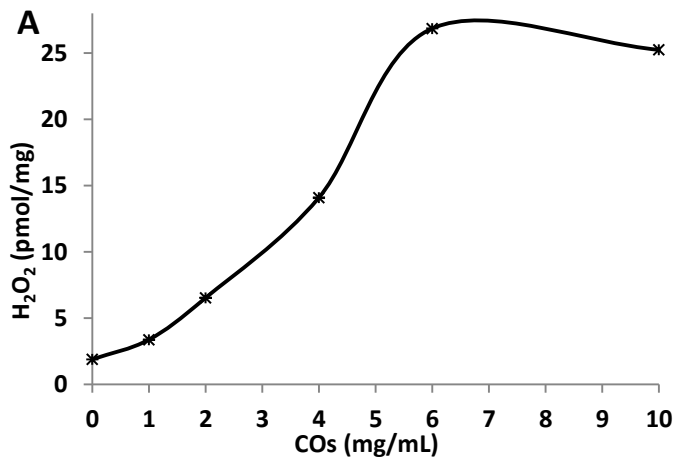
**A** : Culture cellulaire âgée de 15 jours. **B** : Graines germées âgées de 3 jours. **C** : Jeunes plantes âgées de 7 jours. **D** : Culture racinaire. DPI= chlorure de diphenyleiodonium à 50 µM ; CAT= catalase à 100 u/ml ; RLU= Relative Light Units.

## **1. RESULTATS PRELIMINAIRES CONCERNANT LA MISE AU POINT DU BIOESSAI**

Afin d'étudier l'activité biologique des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches*, il a été nécessaire d'établir un bioessai permettant de mettre en évidence la perception de molécules exogènes par *M.truncatula*. Les chitosaccharides étant constitués de NAG, des COs de chitine de crabe de degré de polymérisation moyen 6.8 (COs DP7) ont été préparés (cf. partie 2.) et utilisés comme éliciteur témoin pour déterminer les caractéristiques de la production de ROS en réponse aux traitements et pour choisir un matériel végétal présentant la meilleure sensibilité. Pour étudier l'activité biologique des molécules perçues, une sélection de gènes relatifs à la défense de la plante a été établie.

Le premier point de ce travail a consisté à déterminer la cinétique de production de ROS afin de déterminer la durée pendant laquelle le matériel végétal répondait. La quantification de l' $H_2O_2$  est fondée sur le phénomène de luminescence qui se produit suite à la réaction d'oxydation du luminol par l' $H_2O_2$ . La désexcitation électronique du luminol oxydé conduit à l'émission de lumière qui est quantifiable à l'aide d'un luminomètre. Les cinétiques de production d' $H_2O_2$  en réponse au traitement de quatre systèmes végétaux (une culture cellulaire, des graines germées, des jeunes plantes et des cultures de racines) par des COs sont présentées en **Figure 1.1**. Pour les quatre systèmes, la réponse à la chitine présente le même profil. La réponse débute après deux minutes de contact avec les COs, atteint un maximum entre trois et cinq minutes, puis s'estompe après dix minutes. Ces observations indiquent que la production d' $H_2O_2$  en réponse aux COs de chitine est terminée dans tous les cas après 15 minutes. L'ajout de chlorure de diphenyleiodonium (DPI), inhibiteur de la NADPH-oxydase, en même temps que l'éliciteur, diminue fortement la quantité d' $H_2O_2$  produite (**Figure 1.1 C et D**), indiquant que l' $H_2O_2$  produit est issu essentiellement de la dismutation des anions superoxydes. L'ajout de catalase (CAT), qui décompose l' $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ , diminue fortement la réponse (**Figure 1.1 C et D**), montrant que l'espèce réactive de l'oxygène mesurée ici à l'aide du luminol est bien de l' $H_2O_2$ .

Nous avons noté que le traitement des racines de *M.truncatula* avec des NF n'induit pas la production d' $H_2O_2$  extracellulaire dans notre système (résultats non montrés), ce que est cohérent avec les résultats publiés dans la littérature (Lohar *et al.*, 2007; Shaw and Long, 2003b).



**Figure 1.2:** Courbes dose-réponse de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par *M.truncatula* A17 traité par des COs de chitine

**A:** Culture cellulaire âgée de 15 jours. **B:** Graines germées âgées de 3 jours. **C:** Jeunes plantes âgées de 7 jours. Les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions techniques ± SE.

La quantité totale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite à un temps donné peut être mesurée en une seule fois, en réalisant le dosage sur un prélèvement du milieu. Nous appelons ce type de mesure « mesure en point final ». Il permet de traiter plus d'échantillons même si il est moins sensible que l'essai en cinétique. Pour les COs de chitine, le matériel végétal est élicité pendant 15 minutes, temps au bout duquel la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale produite dans le milieu est mesurée. Pour évaluer la sensibilité des différents systèmes, des mesures en point final ont été réalisées avec des concentrations croissantes de COs de chitine. Nous avons pu obtenir ainsi une courbe dose-réponse pour la culture cellulaire, les graines germées et les jeunes plantes de *M.truncatula* (**Figure 1.2**). Les essais d'élicitation sur les cultures cellulaires de *M.truncatula* ont été faits sur des cultures âgées de 15 jours, temps qui correspond à la fin de la phase de croissance. La culture cellulaire donne une réponse pour des quantités de COs de chitine supérieures à 1 mg/mL avec un plateau à partir de 6 mg/mL (**Figure 1.2**). Les graines germées ont une production de base d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'environ 6 pmol.mg<sup>-1</sup>, qui est trois fois supérieure à celles de la culture cellulaire et des jeunes plantes. Elles donnent une réponse supérieure à celle du témoin à partir de 10 µg/mL, et qui est augmentée à 100 µg/mL. Les jeunes plantes présentent une sensibilité aux COs de chitine plus importante que la culture cellulaire et que les plantes germées, avec une réponse intense dès 100 ng/mL. Un plateau de la réponse se profile à partir de 1 µg/mL. Dans ces essais préliminaires, les cultures de racines n'ont pas montré une sensibilité meilleure que celle des jeunes plantes (résultats non montrés). Le système « jeunes plantes » a donc été retenu pour la suite des études.

Les essais décrits dans le paragraphe précédent permettent de mettre en évidence de façon rapide la perception d'un composé. Pour aller plus loin dans les mécanismes activés chez la plante, l'analyse de l'expression de gènes est une étape importante. Les gènes sont choisis en fonction de la réponse que l'on souhaite mettre en évidence, et d'après le rôle potentiel ou confirmé des protéines prédites. Nous nous sommes intéressés ici à des gènes associés la mise en place de la défense de la plante.

**Tableau 1.1 : Sélection des gènes pour les analyses par RT-qPCR chez *M.truncatula***

ID Mt3.5.1 des gènes	Annotation		Acronyme
<b>Gènes associés aux stress biotique</b>			
Medtr4g120860	Pathogenesis-related protein 10.2		PR10.2
non déterminé	Thaumatococin		THA
Medtr5g046430/Medtr4g017050	Germin-like protein subfamily 1 member 7	PR-protéines	GLP
Medtr1g075340	Inhibitor of trypsin and hageman factor		PI
Medtr3g118390	Chitinase I		CHI I
Medtr4g083710	Peroxidase 5	équilibre RedOx	POX
Medtr7g065260	Glutathione S-transferase		GST
Medtr5g024020	Seed lipoxygenase		LOX
Medtr5g098720	Phenylalanine ammonia-lyase	biosynthèse de	PAL
Medtr4g070370	Isoflavone reductase-like protein 6	médiateurs ou	IFR
Medtr4g077100	NAD-dependent epimerase/dehydratase	composés de	EPI
Medtr7g074710	Vestitone reductase	défense	VR
Medtr4g005190	$\beta$ -amyrin synthase		$\beta$ AS
<b>Gènes de référence</b>			
Medtr4g097170	Histone H3		H H3
Medtr6g021800	Translation elongation factor 1- $\alpha$		TEF $\alpha$
Medtr3g091400	Ubiquitin family protein / Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase		UbPIK

Les gènes présentés dans le **Tableau 1.1**, ont été sélectionnés à partir d'analyses transcriptomiques réalisées au sein de l'équipe Interactions Plantes-Microorganismes (Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, CNRS/Université Paul Sabatier, Toulouse), sur des ARN de racines de *M.truncatula* infectées par *A.euteiches* à 1, 3 et 6 jours post-inoculation (Djébali et Jacquet, non publié) ou 1 jour post-inoculation (Rey *et al.*, soumis), et d'analyses transcriptomiques réalisées par (Leclercq *et al.*, 2008), sur des ARN de cultures cellulaires de *M.truncatula* traitées avec l'hepta- $\beta$ -glucoside pendant 4 heures. Les gènes notés Pathogenesis Related protein 10.2 (PR10.2), Germin Like Protein (GLP), Protease Inhibitor (PI) et Chitinase I (CHI I) ont été sélectionnés car ils codent des Pathogenesis Related-proteins (PR-proteins) pour lesquels l'analyse transcriptomique de Djébali et Jacquet indiquait que leur expression était induite à au moins deux temps sur les trois temps d'infection étudiés, à une p-value <0.05.

Les analyses transcriptomiques de Rey *et al.* (soumis), ont fourni d'autres marqueurs dont l'expression est induite à un jour d'infection par *A.euteiches*, à une p-value <0.05 : Un gène codant une PR-protein de type thaumatine (THA), un gène codant une peroxydase (POX) et un gène codant une glutathion-S-transférase (GST), impliquées dans l'équilibre redox, un gène codant une lipoxygénase (LOX) potentiellement impliquée dans la voie de défense impliquant des lipides (oxylipines), un gène codant une phénylalanine ammonia lyase (PAL) potentiellement impliquée dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes, un gène codant une isoflavone réductase (IFR) et un gène codant une epimerase/déhydratase NAD dépendante (EPI) potentiellement impliquées dans le métabolisme des flavonoïdes.

Un gène codant une  $\beta$ -amyrin synthase ( $\beta$ AS) et un gène codant une vestitone réductase (VR), enzymes impliquées dans la biosynthèse des terpenoïdes et des flavonoïdes respectivement, ont été également sélectionnés sur la base des analyses transcriptomiques de (Leclercq *et al.*, 2008) indiquant que l'expression de la VR est induite à une p-value <0.05 après 4 h de traitement avec l'hepta- $\beta$ -glucoside de *P.sojae*.



## **2. PUBLICATION DECRIVANT LE SYSTEME EXPERIMENTAL**

Le bioessai fondé sur l'utilisation de jeunes plantes cultivées en conditions hydroponiques dont on mesure les réponses en termes de production de ROS et d'expression des gènes associés à la défense a été exploité dans le cadre d'une publication, qui présente également la production et caractérisation de fragments de chitine de crabe.

La chitine de crabe commerciale est insoluble et est contaminée par des protéines. Celle-ci ne peut être utilisée en l'état pour éliciter les plantes. Pour avoir suffisamment de COs de chitine afin de mettre au point le bioessai d'élicitation, nous avons développé une méthode simple et peu coûteuse pour purifier la chitine de crabe, l'hydrolyser et en obtenir une fraction soluble d'un degré de polymérisation moyen élevé après fractionnement sur colonne de filtration moléculaire. Grâce à l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide et du liquide effectuée au CERMAV (Grenoble), nous avons montré que les fragments de chitine dans cette fraction sont entièrement acétylés et que leur degré de polymérisation moyen est de 7 (fraction appelée « COs DP7 »).

La perception de COs de chitine induit une production de ROS extracellulaire précoce chez la plante sauvage d'*A.thaliana* et l'induction de nombreux gènes associés à la défense, ce qui ne se produit pas chez le mutant *cerk1*, qui est affecté dans le récepteur CERK1 (Miya *et al.*, 2007). Nous avons obtenu le même type de résultats suite au traitement des plantes sauvages et mutantes avec les COs DP 7. Cette fraction a ainsi été validée biologiquement, et a été retenue pour la mise au point du bioessai d'élicitation sur *M.truncatula*.

Le système de culture hydroponique laissant accessible l'appareil racinaire de cette plante permet de le traiter spécifiquement et facilement. La mesure de la production de ROS extracellulaire s'effectue sur un prélèvement du milieu, conservant ainsi l'intégrité de la plante, dont l'incubation peut se poursuivre. L'appareil racinaire peut être prélevé à différents temps d'incubation pour réaliser des analyses d'expression génique. La régulation de la sélection de gènes relatifs à la défense de la plante au niveau racinaire suite au traitement par les COs DP7 a ainsi été mise en évidence. De plus, le bioessai a permis de révéler la présence de composés ayant une activité inductrice de ROS dans le filtrat de culture d'*A.euteiches*, libérés dans le milieu au cours de la croissance du microorganisme.

Le manuscrit soumis le 05/11/2012 à Plant Cell Reports est reproduit ci-après.



*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de *M.truncatula* aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

Nars A<sup>a,b\*</sup>, Rey T<sup>a,b\*</sup>, Lafitte C<sup>a,b</sup>, Vergnes S<sup>a,b</sup>, Amatya S<sup>a,b</sup>, Jacquet C<sup>a,b</sup>, Dumas B<sup>a,b</sup>, Thibaudeau C<sup>c</sup>, Heux L<sup>c</sup>, Bottin A<sup>a,b\*\*</sup>, Fliegmann J<sup>a,b,d,e\*\*</sup>

\* co-first authors

\*\* co-last authors, corresponding authors

**An experimental system to study responses of *Medicago truncatula* roots to chitin oligomers of high degree of polymerization and other microbial elicitors**

<sup>a</sup>Université de Toulouse; UPS; Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales; BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>b</sup>CNRS, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, 24 chemin de Borde Rouge, BP42617, Auzeville, F-31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>c</sup>CERMAV-CNRS, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

<sup>d</sup>INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>e</sup>CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, 31326 Castanet-Tolosan, France.

e-mail: bottin@lrsv.ups-tlse.fr; judith.fliegmann@toulouse.inra.fr

tel: +33 (0)534 323818 (AB); +33 (0)561 285513 (JF)

fax: +33 (0)534 323800 (AB); +33 (0)561 285061 (JF)



## Abstract

The root system of legume plants interacts with a large variety of microorganisms, either pathogenic or symbiotic. Understanding how legumes recognize and respond specifically to pathogen-associated or symbiotic signals requires the development of standardized bioassays using well-defined preparations of the corresponding signals. Here we describe the preparation of chitin oligosaccharide (CO) fractions from commercial chitin, and their characterization by a combination of liquid-state and solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. We show that the CO fraction with highest degree of polymerization (DP) became essentially insoluble after lyophilization. However, a fully soluble, fully acetylated fraction with a mean DP of *ca.* 7 was recovered and validated by showing its *CERK1*-dependent activity in *Arabidopsis thaliana*. In parallel, we developed a versatile root elicitation bioassay in the model legume *Medicago truncatula*, using a hydroponic culture system and the *Phytophthora*  $\beta$ -glucan elicitor as a control elicitor. We then showed that *M. truncatula* responded with high sensitivity to the CO elicitor, which caused the production of extracellular reactive oxygen species and the transient induction of a variety of defense-associated genes. In addition, the bioassay allowed detection of elicitor activity in culture filtrates of the oomycete *Aphanomyces euteiches*, opening the way to the analysis of recognition of this important legume root pathogen by *M. truncatula*.

## Keywords

Chitooligosaccharide; nuclear magnetic resonance; reactive oxygen species; defense gene activation; *Aphanomyces*

## Key message

A fully acetylated, soluble CO preparation of mean DP of *ca.* 7 was perceived with high sensitivity by *M. truncatula* in a newly-designed versatile root elicitation assay.



## 2.1. INTRODUCTION

Plants coexist with a multitude of potential pathogenic organisms in their environment against which they developed an array of concerted defense strategies. Prebuilt physical and chemical barriers constitute a first, passive mode of protection aimed at deterring the adversary from attacking. All subsequent, active defense reactions depend on the recognition of the offending microorganisms as non-self. Plants, as well as animals, take advantage of so-called microbial/pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs<sup>1</sup>) to mount a basal defense, which is part of innate immunity (Boller and Felix 2009). MAMPs are conserved, typical traits of whole classes of microorganisms, and essential for the completion of their life cycles. Many of the well-known elicitors of plant defense are now classified as MAMPs or MAMP-containing molecules, which comprise oligosaccharides derived from cell walls, extra- and intracellular proteins, peptides and glycopeptides, and lipophilic compounds like arachidonic acid or ergosterol (Boller and Felix 2009).

Chitin, a  $\beta$ -1,4-linked homopolymer of *N*-acetylglucosamine not present in plants, is an essential structural component of fungal cell walls. Chitooligosaccharides (COs) have been shown to induce a variety of defense reactions in a number of plants including wheat, barley, melon and tomato, but suspension-cultured rice cells are the best studied system to date (Shibuya and Minami 2001). In rice cells, COs with a degree of polymerization (DP) of 7 or 8 were most active for the induction of membrane depolarization, ion fluxes, production of reactive oxygen species (ROS), defense-related genes, and phytoalexin production (summarized in (Shibuya and Minami 2001)). Since the first chitin receptors, CEBiP and CERK1, have been characterized in rice and *Arabidopsis thaliana* respectively (Kaku, et al. 2006; Miya, et al. 2007; Wan, et al. 2008), major advances have been made in the understanding of chitin perception and transduction mechanisms in these plants. Both CEBiP and CERK1 are membrane-associated proteins containing extracellular Lysin motifs (LysM),

---

<sup>1</sup> Abbreviations: AM, arbuscular mycorrhizal symbiosis; CO, chitooligosaccharide; CP/MAS, cross polarization/magic angle spinning; CSC, crab shell chitin; DP, degree of polymerization; DPI, diphenyleiodonium; HPAEC-PAD, high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection; HRP, horseradish peroxidase; LCO, lipo-chitooligosaccharide; LysM, lysin motif; MAMP, microbe-associated molecular pattern; NMR, nuclear magnetic resonance; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; RL, rhizobia-legume symbiosis; RLK, receptor-like kinase; ROS, reactive oxygen species





which are necessary for CO binding (Kaku, et al. 2006; Liu, et al. 2012; Petutschnig, et al. 2010). Reverse and forward genetics approaches have confirmed that chitin perception by LysM receptors is involved in plant immunity, and that chitin-induced responses participate in basal resistance to various fungi (Kishimoto, et al. 2010; Wan, et al. 2008). The biological significance of chitin perception in plants was further strengthened by the discovery of secreted fungal LysM proteins which act as pathogenicity effectors by scavenging COs from the apoplast, thereby suppressing CO-induced immunity (Kombrink, et al. 2011).

Plant-microbe interactions might also be of mutual benefit for the partners, as for example in the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis, which more than 80% of land plants can form with diverse Glomeromycota fungi, or the rhizobia-legume (RL) root endosymbiosis (Parniske 2008). In these interactions, plants gain better access to inorganic phosphate and water or reduced nitrogen, respectively, in exchange for carbon derived from photosynthesis. The AM as well as the RL symbiosis are initiated in the rhizosphere and develop in the root system without massive elicitation of defense reactions (Oldroyd, et al. 2011; Zamioudis and Pieterse 2011). Interestingly, symbiotic factors from rhizobia and AM fungi are lipo-chitooligosaccharides (LCOs), sharing with COs a backbone of 4 or 5  $\beta$ -1,4-linked *N*-acetylglucosamine residues (Gough and Cullimore 2011). Responses of legume plants to LCOs include early cellular events such as transmembrane ion fluxes and calcium spiking, followed by activation of a symbiotic gene expression program, and morphogenetic responses such as root hair curling and initiation of nodule organogenesis. Most of these responses depend on the activity of proteins belonging to the so-called “common symbiotic pathway”, a signal transduction pathway involved in responses to both rhizobial and mycorrhizal LCOs (Gough and Cullimore 2011). During the last decade, evidence has accumulated in various legume plants that Nod-LCO receptors are LysM-RLK proteins, and a recent study suggested that the *Lotus japonicus* Nod-LCO receptor LjNFR1 evolved from an ancestral, yet uncharacterized, CO receptor to become a receptor specialized in symbiotic signaling (Nakagawa, et al. 2011).

Thus, CO signaling is well described in non-legume plants on the one hand, where it pertains to the MAMP signaling paradigm, whereas, on the other hand, LCO signaling is well described in legume plants, where it pertains to the symbiotic signaling paradigm. Meanwhile, knowledge on CO-dependent defense activation in legume plants is less comprehensive, especially in the model legume *Medicago truncatula*, a species closely



related to important crop plants, like pea, alfalfa and faba bean (Young and Udvardi 2009). Its complete genome has recently been released and a large number of expressed sequence tags and extensive transcriptomic data generated under various conditions are available (Young, et al. 2011). This highly polymorphic plant is amenable to direct, reverse and association genetic studies, facilitating the analysis of various phenotypic traits, including interactions with microorganisms. Besides its symbiotic ability, *M. truncatula* interacts with a broad range of pathogens, from parasitic plants, nematodes, fungal, and oomycete pathogens to bacterial pathogens (Ameline-Torregrosa, et al. 2008; Samac, et al. 2011; Uppalapati, et al. 2009; Vaillau, et al. 2007). In particular, it is a host for *Aphanomyces euteiches* (Djebali, et al. 2009), an oomycete pathogen that causes root rot in various legumes, and has the striking peculiarity to contain abundant chitosaccharides in its cell wall (Badreddine, et al. 2008). Despite its importance as a model plant, responses of *M. truncatula* to COs have been addressed in only two studies: hydrolyzed crab shell chitin was shown to induce intracellular ROS production in root hairs (Kim, et al. 2006), whereas chitotetraose induced nitric oxide and jasmonic acid (JA) accumulation in shoot cuttings (Leitner, et al. 2008). These studies not only differ in the nature of the organ and of the responses that were investigated, but also in the nature of the CO preparation that was used.

The solubility and biological properties of COs depend on their degree of polymerization (DP) and degree of acetylation (Aam, et al. 2010). Whereas a sharp decrease of water solubility of fully acetylated COs is observed above a DP of 7, the most active COs in rice, *A. thaliana* or soybean, are fully acetylated molecules of DP 7 or 8 (Day, et al. 2001; Shibuya and Minami 2001; Zhang, et al. 2002). CO preparations can be obtained from crustacean shell chitin either directly by partial acid hydrolysis (Shahidi and Abuzaytoun 2005), or indirectly by alkaline hydrolysis producing chitosan fragments that are subsequently reacylated (Ito, et al. 1997). The latter approach allows the preparation of pure individual COs of DP up to 8 but is laborious. The former approach includes procedures using hydrofluoric (HF) or hydrochloric (HCl) acid. HCl needs thorough control of hydrolysis conditions to avoid substantial deacetylation and total depolymerization (Einbu and Vårum 2008) whereas HF allows better control of hydrolysis but is hazardous and not usable in most laboratories. Alternative methods for either chemical or enzymatical syntheses of COs are available, but these methods are complex and the yields are generally low (Aam, et al. 2010).



Thus preparation of pure fully acetylated individual COs of high DP is usually not feasible in plant science laboratories, which prepared instead crude water slurries or acid hydrolyzates, or obtained COs from commercial sources in many cases (Kim, et al. 2006; Millet, et al. 2010; Ramonell, et al. 2002; Zhang, et al. 2002). Whereas individual COs of DP of 7 or 8 might be purchased at high cost from a limited number of companies, their presence in cheaper commercial CO mixtures is not documented. In this context, we have initiated this work with two objectives: (1) to prepare large amounts of a purified, fully acetylated, yet soluble, CO preparation containing chitin fragments of high DP, and (2) to develop a bioassay for the study of defense-associated responses of *M. truncatula* roots to biotic elicitors, with special emphasis on COs.



## **2.2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.2.1. Chitin oligomer preparation**

Crab shell chitin (CSC, Sigma C3387) was used as a starting material. The 50 ml hardened steel grinding bowl of a vibratory disc mill RS200 (Retsch) was pre-cooled in liquid nitrogen, then 10 grams of crab shell chitin were added to the bowl and ground 3 times for 15 sec at 1500 rpm. The powder was passed through a 100 µm sieve to eliminate the largest particles. At this stage, the hexosamine content was measured after hydrolysis in 6 M HCl at 120°C for 1 h followed by analysis of the neutralized hydrolysate by High-Performance Anion-Exchange Chromatography coupled to Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) as described in (Badreddine, et al. 2008). The fine powder was then deproteinized by resuspension in 1 M NaOH (10 ml.g<sup>-1</sup> of powder) and incubation at room temperature for 1 h under constant agitation. The residue was pelleted by centrifugation at 3000 x g for 10 min at 15°C, and then washed by repeated resuspension in water and centrifugation until the pH of the supernatant reached neutrality. The proteins were measured in the first supernatant according to (LOWRY, et al. 1951), giving an indication of the protein contamination of the original CSC sample. The pellet was then washed 3 times in 80% ethanol, once in 100% ethanol, and finally lyophilized. The dry residue was solubilized by resuspension in 12 M HCl (10 ml.g<sup>-1</sup> of powder, pre-cooled at -20°C) and further incubation at -20°C for 30 min. Partial hydrolysis was performed by transferring the solution to a 40°C water bath and incubating for 100 min under constant agitation. The hydrolysate was cleared by centrifugation at 3000 x g for 10 min at 4°C, and then poured into an ice-cold beaker. After addition of 400 ml of ice-cold distilled water, the hydrolysate was neutralized by slow addition of ice-cold 5 M KOH. The neutralized hydrolysate was cleared by centrifugation at 1000 x g for 10 min at 4°C, concentrated in a rotary evaporator (Rotavapor, Büchi Labortechnik) at 30°C until it reached a volume of 50 ml, then dialyzed 6 h against distilled water in dialysis tubes with a 1 kDa molecular weight cut-off. The dialysate was ultrafiltered in a Sartorius Vivaspin 15RH11 tube, and the fraction of less than 5 kDa molecular weight was lyophilized, resulting in ca. 800 mg of dry material. Twenty mg-aliquots of this fraction were analyzed by size-exclusion chromatography on a Bio-Gel P-4 fine column (24x250 mm, Biorad) calibrated with dextran standards of 1.1, 5 and 50 kDa in 100 mM ammonium formate (pH 6.8). Fractions





corresponding to apparent molecular weights between 3 and 4 kDa, 2 and 3 kDa, 1 and 2 kDa, and 0.2 to 1 kDa were pooled, resulting in 4 pools of decreasing molecular weights.

### **2.2.2. NMR characterization of chitin oligomers**

The different chitooligosaccharide fractions were lyophilized and analyzed by  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR. Depending on the samples, approximately 20 to 50 mg of each fraction was inserted into tightly sealed 4-mm BL type  $\text{ZrO}_2$  rotors. The spectra were recorded with a Bruker Avance spectrometer equipped with a 4-mm BL type probe and operated at 100 MHz. The spectra were acquired at room temperature with a 80 kHz proton dipolar decoupling field, matched cross-polarization (CP) fields of 80 kHz, a proton  $90^\circ$  pulse of 2.5  $\mu\text{sec}$  and magic angle spinning (MAS) at a spinning speed of 12 kHz. The cross-polarization transfer was achieved using a ramped amplitude sequence for an optimized total time of 2 msec. The sweep width was of 50 000 Hz with 2994 TD points, and the Fourier transformation was achieved over 8k points. The baseline was corrected using the Polynomial Fit routine of the MestReNova software (Version 6, Mestrelab Research S.L.). The repetition time was 4 sec and an average number of 20 000 scans was acquired for each spectrum. The  $^{13}\text{C}$  chemical shifts were calibrated with respect to the chemical shift of the carbonyl carbon signal of glycine at 176.03 ppm. The quantitative analysis was made by integration of the corresponding signals using the same NMR software. The liquid NMR spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer operated at a  $^1\text{H}$  frequency of 400 MHz and equipped with a QNP or a BBIZ probe. The  $90^\circ$  pulse length was 12.3  $\mu\text{sec}$ . Temperature in the probe was kept constant at 298 K with a SHAKE temperature controller. The total running transient time (relaxation delay and acquisition time) was set to 10 sec. The quantitative analysis was made by integration of the signals of the anomeric protons using the following equation:  $\text{DP}_n = (\int\text{H1}\alpha + \int\text{H1}\beta + \int\text{H1c})/(\int\text{H1}\alpha + \int\text{H1}\beta)$ ,  $\int\text{H1}\alpha$  and  $\int\text{H1}\beta$  being the integrals of the H1 protons of the *N*-acetylglucosamine terminal reducing ends with  $\alpha$  and  $\beta$  configuration, respectively, and  $\int\text{H1c}$  the sum of integrals of the H1 protons of all the central units.



### 2.2.3. Preparation and characterization of *A. euteiches* culture filtrates

*Aphanomyces euteiches* (Drechsler) strain ATCC201684, kindly provided by Dr. F. Krajinski (Hannover University, Germany), was maintained and induced to sporulate as described in (Badreddine, et al. 2008). Culture filtrate was prepared by inoculating 50,000 zoospores into 100 ml of synthetic medium (SM, containing 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 197 µM FeCl<sub>3</sub>, 30 µM MnCl<sub>2</sub>, 24 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 9.2 µM ZnSO<sub>4</sub>, 4.5 µM KI, 0.52 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.01 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 69.4 mM glucose, 20 mM L-glutamate, and 4 mM L-methionine, the pH was adjusted to 6.2 with NaOH before sterilization). After 21 days of growth in Roux culture flasks in the dark at 24°C, the medium was harvested by filtration on a sintered glass filter. The hexosamine and glucose contents were measured after hydrolysis of 5 ml of the dialysate in 6 M HCl at 120°C for 1 h followed by analysis of the neutralized hydrolysate by HPAEC-PAD as described above, and the proteins were measured according to (LOWRY, et al. 1951).

### 2.2.4. Plant biological material

The line *Medicago truncatula* (Gaertn.) Jemalong A17 was used. Seeds were surface sterilized with sulfuric acid, sown onto 0.5% water agar and kept in the dark at 4°C for 3 days followed by 25°C for 6 hours. The seedlings (radicles between 3 and 10 mm long) were transferred into 35 mm petri dishes (3 seedlings per plate) containing 2.5 ml minimal medium (Bécard and Fortin 1988) omitting sucrose, kept in a large plastic translucent box and incubated under a 16-hour illumination period at 22°C and an 8-hour night period at 20°C, for 7 to 8 days.

*Arabidopsis thaliana* L. wild type or *cerk1* (GABI-Kat mutant 096F09) seedlings of the Col-0 accession were prepared as follows: seeds were soaked in water for 40 min, then treated for 30 min in 2.4% sodium hypochlorite solution, followed by 4 washings in sterile water. The surface-sterilized seeds were transferred either into 35 mm petri dishes (3 seeds per plate) for ROS measurements or into wells of 24-well microtiter plates (2 seeds per well) for gene expression analysis, containing either 1 ml or 300 µl of MS medium (Sigma, M5519) supplemented with 1% sucrose, respectively. The petri dishes were incubated under a 16-



hour illumination period and an 8-hour night period at 23°C on a rotary shaker at 90 rpm for 3 days, then on a static tray for 12 days.

### 2.2.5. Elicitation assays and ROS measurement

For all assays using *M. truncatula* and for ROS measurement using *A. thaliana*, seedlings grown in 35 mm petri dishes for 7 to 8 days (*M. truncatula*) or 15 days (*A. thaliana*) were first washed by substituting their medium with water and incubating them further under growth conditions for 2 to 4 h before elicitor treatment.

Real-time measurement of ROS production was performed by a luminol/peroxidase-based chemiluminescence assay according to (Kunze, et al. 2004). The washing medium was withdrawn and the washed seedlings in the petri dish were pre-incubated briefly in 900 µl of a solution containing 1 U ml<sup>-1</sup> horse radish peroxidase (HRP, Fluka-Sigma) and 22 µM luminol (Sigma). The petri dish was then placed in a Sirius luminometer (Berthold Detection Systems) before the addition of elicitor solution to give a final volume of 1 ml. Chemiluminescence was recorded for 1 h. To study the effect of diphenyliodonium chloride (DPI, Sigma-Aldrich), the peroxidase/luminol solution was supplemented with 5 µl of 10 mM DPI dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), or with 5 µl DMSO as a control.

End-point measurement of ROS production by *M. truncatula* was done using an amplex red/peroxidase-coupled fluorescence assay adapted from (Ashtamker, et al. 2007). The washing medium was withdrawn and the washed seedlings in petri dishes were treated with 1 ml of the elicitor solutions for 20 min at RT before sampling of 20 µl portions of the medium into black 96-well microplates (Greiner). Fluorescence under excitation at 530 nm was measured at 600 nm in a Berthold TriStar LB 941 multimode reader twice before and 4 times after the injection of 20 µl of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 4 U ml<sup>-1</sup> HRP and 0.2 mM amplex red (Invitrogen). In parallel, a dilution series of 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was processed. Emitted relative light units were linear for a concentration range of 0.05 to 2 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r^2 = 0.98 \pm 0.015$ ,  $n = 10$ ). To verify the nature of the ROS produced by the seedlings, a catalase solution (catalase from *Corynebacterium glutamicum*, Sigma-Aldrich) was added to the samples at a final concentration of 200 U.ml<sup>-1</sup>, and the mixtures were incubated 10 min at room temperature before fluorescence measurement.

**Table S1: Primers used for qRT-PCR analysis in *Arabidopsis thaliana***

Gene ID	Annotation	Acronym	Forward primer	Reverse primer	amplicon size (bp)	qPCR efficiency (%)
<b>Genes induced by biotic stress or stress hormone treatment</b>						
AT2G44490	penetration 2 protein, $\beta$ -glucosidase 26	PEN2	5'-TGCGCATAATCCACATTTGGTACG-3'	5'-AGTCGGATGCTGATGCCAAC-3'	109	93
AT3G45640	mitogen-activated protein kinase 3	MPK3	5'-TGGAGCTTATGGAATCGTTTGCTC-3'	5'-TCATCGCTACTAGCTCGTTTCGTC-3'	62	97
AT4G31550	WRKY transcription factor 11	WRKY11	5'-CCCACGTGGTTACTACAAAGTGC-3'	5'-TGGATCATCTAAATGCTCGTCCAC-3'	79	96
AT5G25260	hypothetical protein	HP	5'-TTGCTAAGACTAACGCGCTTGC-3'	5'-GTTCTCCACCATGGTTCCAAACG-3'	72	98
AT1G30900	vacuolar sorting receptor	VSR	5'-AACCAAAGGAGGTTGCTGGTC-3'	5'-ACATCCCCGATGCTCCCAAGTTCC-3'	78	92
AT4G31500	cytochrome P 450 monooxygenase 83B1	CYP83B1	5'-TGGATAATTGTTGTGCCGGGAAC-3'	5'-ACACTCCCTCACTTGCTTTGAGC-3'	115	99
AT4G33430	BRI1-associated receptor kinase 1	BAK1	5'-TGTCCTGACGCTACAAAGTTCTGG-3'	5'-ACAGGAAATATCTCCGGTGAGAGG-3'	60	97
AT5G46330	flagellin-sensitive 2	FLS2	5'-TCGGATTCTAGGTTCCGCCAAG-3'	5'-ACCCCTCGAAGGCTGATGTTGAAAG-3'	61	96
AT1G02920	glutathione S-transferase 11	GST11	5'-CGATGTTTACGAACACACAGGCTTGG-3'	5'-TGACATGTGGACCGCTCGTCAAAG-3'	143	92
AT1G74590	glutathione S-transferase TAU 10	GSTU10	5'-ACCAACAGGTGTTTGAGGTCATGG-3'	5'-ACAGACTTTGCTTGAGCTTCACC-3'	67	98
AT5G24430	calcium-dependent protein kinase	CDPK	5'-TGTCGTGCACCGTGATCTGAAG-3'	5'-ACAACATCATTTGAGACGCTGATCG-3'	129	93
<b>Reference gene</b>						
AT5G46630	clathrin adaptor complexes medium subunit family protein	CACP	5'-TCAGGTGCCAATGTTACACAGC-3'	5'-ACCGCTCTTCTCCCAAACCTTG-3'	67	97

For gene expression analyses in *M. truncatula*, the seedlings treated as described above for end-point measurement of ROS production were further incubated 1 to 12 h under growth conditions before the harvest of the roots, which were weighed, shock-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. For gene expression analyses in *A. thaliana*, the medium of 15 day-old seedlings grown in 24-well microtiter plates was substituted with 500 µl of a two-fold dilution of freshly prepared medium of the same composition containing in addition 1 ppm (v/v) of the wetting agent Actilandes (Action Pin, Castet des Landes, France) and 100 µg.ml<sup>-1</sup> COs DP7. Seedlings were harvested after 1 and 6 h incubation under growth conditions, weighed, shock-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

### **2.2.6. Measurement of gene expression by qRT-PCR**

For gene expression analyses in *A. thaliana*, total RNA was extracted from four seedlings using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega) following the manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with random primers in a total volume of 20 µl. Then, the cDNAs were used for qPCR using the BioMark™ HD System (Fluidigm): first, 1.3 µl of a 1:40 dilution of the synthesized cDNA were submitted to specific target amplification (STA) by PCR amplification in a 5 µl reaction containing *A. thaliana* specific primer pairs (50 nM each) and a two-fold dilution of the TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems). The PCR program consisted of 14 cycles of 15 sec at 95°C followed by 4 min at 60°C. Then, 340 nL of preamplified cDNA were used for qPCR array analysis in a 6.7 µl reaction using EvaGreen chemistry (Applied Biosystems). Data were analyzed with the BioMark Real-Time PCR Analysis Software Version 2.0 (Fluidigm). Amplification specificity for each gene was confirmed by dissociation curves generated at the end of the qPCR program, and efficiency was evaluated by performing qPCR on serial dilutions of a mixture of all cDNAs. Calculations for comparing expression data were performed using the  $\Delta\Delta$  cycle threshold method using a clathrin adaptor complex gene (AT5G46630) as a reference gene (Czechowski, et al. 2005). Significance of gene induction or repression over three biological replications was determined by a paired two samples student *t* test comparing  $2^{-\Delta Ct}$  values from the water treatment *versus* the CO treatment. Primer sequences are listed in **Table S1**.

**Table S2: Primers used for RT-qPCR analysis in *Medicago truncatula***

Mt3.5.1 gene ID	Annotation	Acronym	Forward primer	Reverse primer	amplicon size (bp)	qPCR efficiency (%)
<b>Biotic stress-associated genes</b>						
Medtr4g120860	Pathogenesis-related protein 10.2 <sup>a</sup>	PR10.2	5'-AGCGAAATTGGTTGAAGGCT-3'	5'-ATCTCCTTTGGTTTGGTATTTAACT-3'	73	97
not available <sup>b</sup>	Thaumatin	THA	5'-GGCGCAATCCACACCAGCAAC-3'	5'-ACCACCTCCACCTTGTGGCG-3'	129	92
Medtr5g046430/Medtr4g017050	Germin-like protein subfamily 1 member 7	GLP	5'-CTCTCCAAGACTTTTGTGTGCA-3'	5'-TCACGAATACACCACTTTTGGG-3'	54	110
Medtr1g075340	Inhibitor of trypsin and hageman factor	PI	5'-TGCCATCATTTGTGCCAAGAG-3'	5'-TCACAGCGGAAAGTCAAAGGG-3'	51	99
Medtr3g118390	Chitinase I	CHII	5'-GCAATGCCGTTAAACAAGCTG-3'	5'-CAACATAATCCCCCTGGGC-3'	51	94
Medtr4g083710	Peroxidase 5	POX	5'-ATGCCCTGGAGTTGTCTTGTGC-3'	5'-TGACGGACCACCCACAGCAA-3'	79	106
Medtr7g065260	Glutathione S-transferase	GST	5'-GGGGAGTAACTGGAGCACTACGA-3'	5'-GCAATCTCCACCCATGCACACA-3'	96	104
Medtr5g024020	Seed lipoxigenase	LOX	5'-TCAAAGCTTGCTCGTCCGGTCC-3'	5'-CGACCACCTTCTAACCCCTTCGAGGG-3'	70	97
Medtr4g077100	NAD-dependent epimerase/dehydratase	EPI	5'-GGTTGTGTGTAAACAGGTGCTTCA-3'	5'-AGGGTCACGAACAGTGGCTCTA-3'	100	102
Medtr5g098720	Phenylalanine ammonia-lyase	PAL	5'-GCAAGGGCCGGTGTGAAGC-3'	5'-GGCAGCACCAAGCCAGTGGT-3'	96	101
Medtr4g070370	Isoflavone reductase-like protein 6	IFR	5'-TGGCGTCAACCTAGTTTTGGGAG-3'	5'-CGGGTATGTGCAAGTAACTACCGG-3'	108	96
Medtr7g074710	Vestitone reductase	VR	5'-GCTGATCCAGAACGTAAGAGGG-3'	5'-CACCCGGGTAGATTTGTACAGGA-3'	52	94
Medtr4g005190	$\beta$ -amyrin synthase	$\beta$ AS	5'-TGCTCAAAATTGCAGGTCCCTCT-3'	5'-ACACAGAAAAACCAAGGGAGGC-3'	51	85
<b>Reference genes</b>						
Medtr4g097170	Histone H3	HH3	5'-CTTTGCTTGGTGTGTTTATGATGG-3'	5'-ATTCCAAAAGCGGGCTGCATA-3'	221	105
Medtr6g021800	Translation elongation factor 1- $\alpha$	TEF $\alpha$	5'-TAACAAGATGGATGCTACCACCC-3'	5'-GATTTTCATCGTACCTAGCCTTTGA-3'	55	99
Medtr3g091400	Ubiquitin family protein / Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase	UbPIK	5'-GCAGATAGACACCGCTGGGA-3'	5'-AACTCTTGGGCAGGCAATAA-3'	100	95

<sup>a</sup> nomenclature according to Samac *et al.* (2011)

<sup>b</sup> Primers were defined on the MTG19-TC126941 sequence



For gene expression analyses in *M. truncatula*, total RNA was extracted from approximately 100 mg ground tissue using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNAs were either synthesized, (method 1) from 2 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with random primers in a total volume of 20 µl, or (method 2) from 1 µg of total RNA in a total volume of 20 µl containing 100 ng random primers (Promega), 10 mM DTT, 1 mM dNTPs, 20 U RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega), and 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) in 1x first strand buffer (Invitrogen) after a prior digestion with TURBO DNase (Applied Biosystems). After a first denaturation of the RNA in the presence of random primers (70°C, 5 min), the remaining constituents were added and primers were annealed at 25°C for 15 min prior to RT at 37°C for 1 h, followed by denaturation at 70°C for 15 min. Real-time qPCR was performed on an ABI Prism SDS 7900HT thermocycler (Applied Biosystems) using SYBR green chemistry (Power SYBR Green, Applied Biosystems). cDNAs synthesized according to method 1 were used in 384-well plates, in a total volume of 10 µl containing 2 µl of a 1:50 dilution of the cDNA and 0.15 µM of each gene specific primer. cDNAs synthesized according to method 2 were used in 96-well plates, in total volume of 20 µl containing 4 µl of a 1:10 dilution of the cDNA and 0.3 µM of each gene specific primer. The PCR program consisted of 5 min of incubation at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. Amplification specificity for each gene was confirmed by dissociation curves generated at the end of the qPCR program, and efficiency was evaluated by performing qPCR on serial dilutions of a mixture of all cDNAs. qPCR reactions were performed in duplicate (method 2) or triplicate (method 1) for each of at least three biological repetitions. Data analysis and calculations for comparing expression data were performed using the  $\Delta\Delta$  cycle threshold method using elongation factor 1 $\alpha$ , ubiquitin carrier protein, and histone genes as reference genes. Primer sequences are listed in **Table S2**.

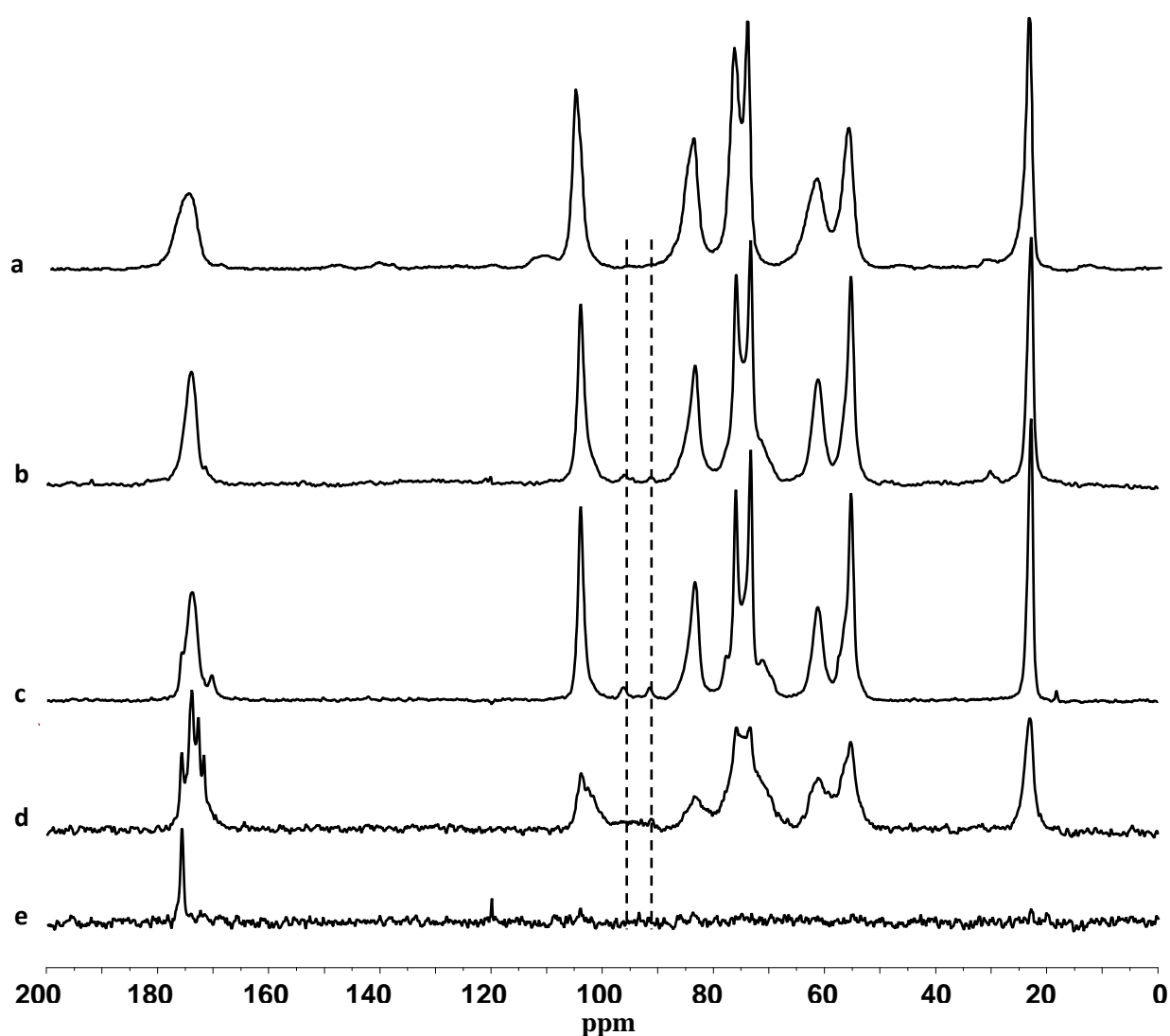
**Table 1: Yield, apparent DP range, average DP number (DPn) and average degree of acetylation (DA) of the CO fractions generated from crab shell chitin**

Fraction	CO I	CO II	CO III	CO IV
Yield (mg/g) <sup>a</sup>	15.1±4.0	14.4±7.7	54.3±17.0	3.6±2.1
DP range <sup>b</sup>	19.7-14.8	14.8-9.9	9.9-4.9	4.9-1.0
DPn <sup>c</sup>	13.7	6.8	3.8	ND
DA <sup>c</sup>	0.97	1.00	0.98	ND

<sup>a</sup> The mean yield ± SE of four independent preparations is shown

<sup>b</sup> As determined by dextran standards separated by gel filtration chromatography

<sup>c</sup> As determined by quantitative integration of <sup>13</sup>C CP/MAS NMR data according to Heux et al. (2000)



**Fig. 1** <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of (a) crab shell chitin, (b) CO I, (c) CO II, (d) CO III, and (e) CO IV fractions prepared after acid hydrolysis of crab shell chitin.

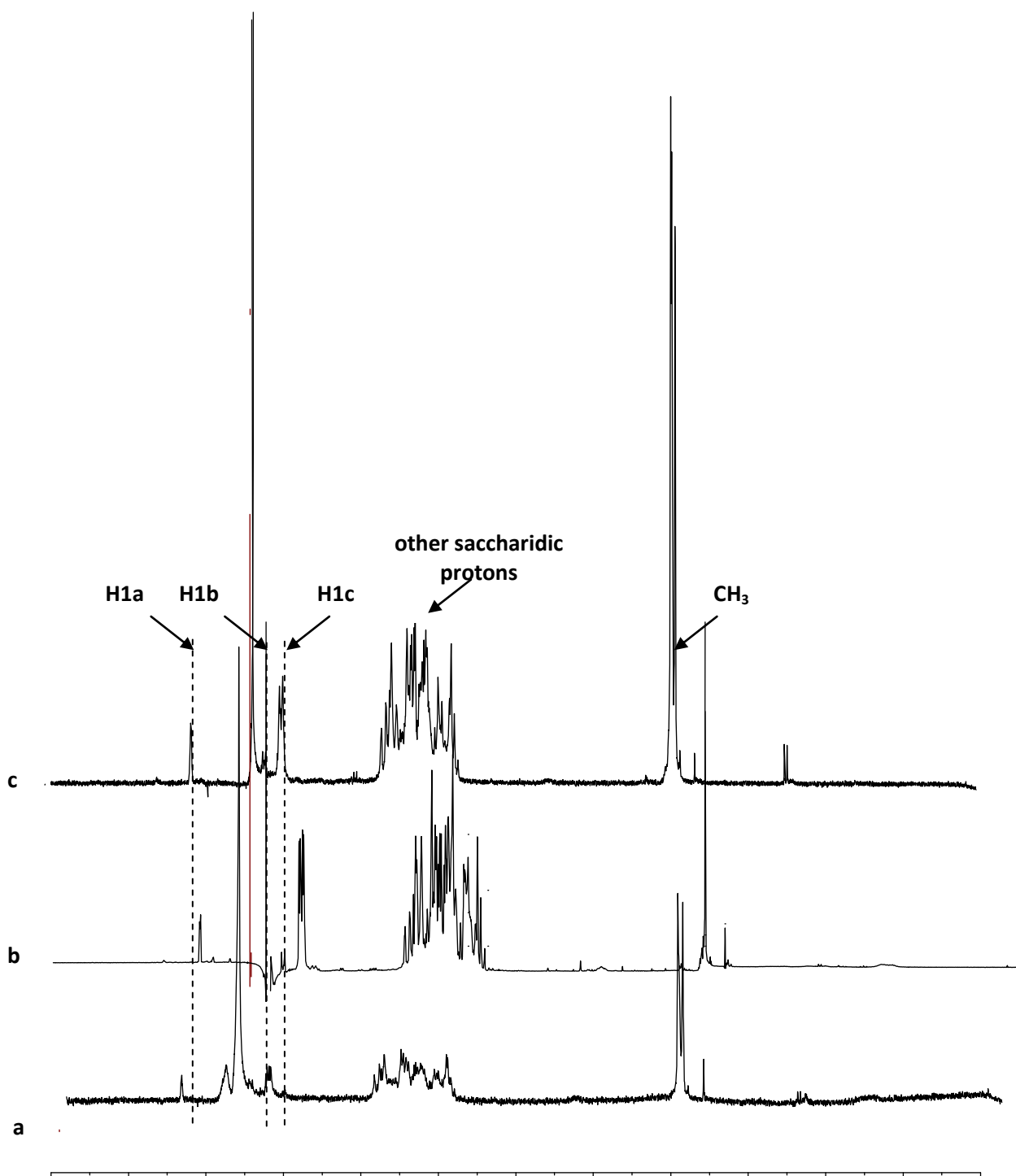
Assignment of the different carbon resonances (chemical shifts) of *N*-acetylglucosamine are following, according to (Tanner *et al.* 1990): C=O, 173.7 ppm; C1, 103.9 ppm; C4, 83.3 ppm; C5, 76.0 ppm; C3, 73.3 ppm; C6, 61.2 ppm; C2, 55.2 ppm; CH<sub>3</sub>, 22.8 ppm. The dashed lines point to the reductive ends of the *N*-acetylglucosamine signals at 96.3 and 91.5 ppm corresponding to the C1-β and C1-α of the reductive ends. The mean DPs of the CO fractions are calculated from the integration of these signals.

## 2.3. RESULTS

### 2.3.1. Preparation and characterization of CO fractions from crab shell chitin

Commercial crab shell chitin (CSC) is an insoluble product of high particle size that cannot be used as such to elicit plants. Its hexosamine content, as measured after complete acid hydrolysis, was only 655 mg g<sup>-1</sup>. Mineral salts, lipids and proteins are likely contaminants of the commercial product (Shahidi and Abuzaytoun 2005). The CSC was thus finely ground and treated with sodium hydroxide to remove alkaline-soluble contaminants. This step resulted in an insoluble residue exclusively composed of hexosamines, from which proteins, accounting for 235 mg g<sup>-1</sup> of starting material, had been eliminated, which is important in view of the elicitor activity of some proteins and peptides. Further processing involved partial acid hydrolysis under thoroughly controlled conditions (see Materials and Methods). The hydrolysate was then analyzed by low performance gel filtration chromatography in ammonium formate, which resulted in the generation of four fractions of decreasing apparent molecular weight ranges (**Table 1**). After lyophilization, the most abundant fraction was CO III, potentially containing fragments of apparent DP range from 4.9 to 9.9.

Although the solubility of fully acetylated COs in aqueous solvents is known to be very poor above a DP of 7, significant amounts of fractions of higher apparent DP ranges (CO I and II) were obtained. However, gel filtration chromatography does not allow precise determination of molecular sizes of COs, and is not adequate for assessing the degree of CO deacetylation. Thus the CO fractions were further characterized by <sup>13</sup>C solid state NMR spectroscopy, using cross polarization and magic angle spinning (CP/MAS). **Figure 1** displays the NMR spectra of the fractions of decreasing DP (**Fig. 1b to e**) together with the spectrum of a standard of  $\alpha$ -chitin from crab shell (**Fig. 1a**). The main contributions which arose from the higher molecular weight fractions CO I, II and III were typical of chitinous compounds. They were identical to those recorded with purified  $\alpha$ -chitin from crab shell, as described in the literature, including the 173.7 ppm and 22.8 ppm signals corresponding to the C=O and CH<sub>3</sub> functions of *N*-acetylglucosamine respectively (Heux, et al. 2000; Tanner, et al. 1990). In contrast, only traces of chitinous compounds were detected in the lower molecular weight fraction, CO IV (**Fig. 1e**), in which the unique large signal occurring at 175.4 ppm suggested



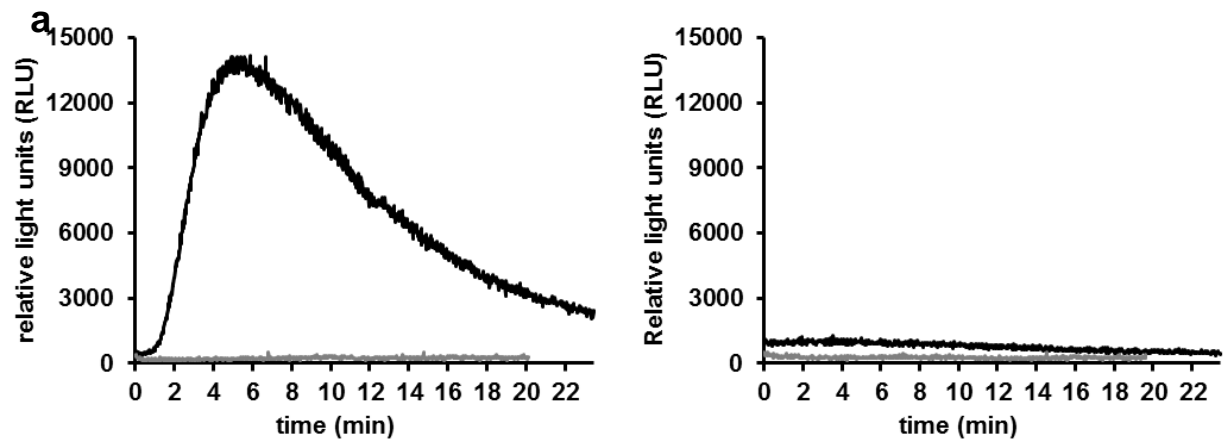
**Fig. S1:** <sup>1</sup>H liquid NMR spectra of (a) CO I, (b) CO II and (c) CO III fractions prepared after acid hydrolysis of crab shell chitin.

Assignment of the different proton resonances (chemical shifts) are following, according to Samain et al. (1997): H1a, 5.10 ppm; H1b, 4.60 ppm; H1c, (central units) 4.49 ppm; other saccharidic protons, 3.30-4.00 ppm; acetyl unit, 1.90 ppm. DP<sub>n</sub> is calculated from the relation  $DP = (J_{H1\alpha} + J_{H1\beta} + J_{H1c}) / (J_{H1\alpha} + J_{H1\beta})$ .

that it was mainly composed of formate salts eluted from the chromatography gel. In addition to the chitin signals in CO I-III, two small signals could be distinguished at 96.3 and 91.5 ppm (indicated by dashed lines in **Fig. 1**) that were absent in the chitin polymer from crab shell. These signals correspond to the C1- $\beta$  and C1- $\alpha$  of the reductive ends of COs, respectively (Samain, et al. 1997). The signal to noise ratio of the spectra, as judged by the oscillations of the baseline, decreased with decreasing molecular weight, most probably due to the increasing proportion of salts. However, at the sensitivity of the experiment (estimated at a few percents), the only organic compounds present appeared to be COs.

The average degree of polymerization number (DPn) was derived from the integration of the C1 reducing end signals compared to the main contribution of the C1 of the central units. Similarly, the degree of acetylation (DA) was calculated from the integration of the methyl signals of the acetyl groups at 22.8 ppm (Heux, et al. 2000). The results obtained on the four fractions are given in **Table 1**. They show that the DPn decreased with decreasing molecular weight, without detection of any significant deacetylation at the sensitivity of the experiment (estimated at a few percents). The resulting values were however significantly lower than those deduced from the dextran standards. Dextran, being an  $\beta$ -1,6-linked glucan, is known to be a rather flexible polymer, whereas chitin, like almost all  $\beta$ -1,4-linked polysaccharides, is rather stiff, having a relatively high persistence length. It is therefore very likely that the use of dextran standards has overestimated the DPs of COs, whereas NMR spectroscopy has given much more accurate estimations.

The molecular weight of the CO I-III fractions was also evaluated after redissolution in D<sub>2</sub>O by proton liquid state NMR spectroscopy as shown in **Fig. S1**. The signal to noise ratio of the CO I fraction was very low compared to the other fractions, indicating an incomplete dissolution of this fraction. The DPn measured from the anomeric H1 protons were 2.7, 6.4 and 3.7 for CO I, II and III respectively. These values were in very good agreement with the solid state NMR data, with the exception of the low DPn of CO I. This inconsistency most probably resulted from the limited solubility of CO I which was the highest molecular weight fraction, according to the chromatographic profile. The solubilized molecules were likely small CO fragments present as minor contaminants in this fraction, whose low abundance explains the low signal to noise ratio. This last result shows the difficulty of resolubilizing a high-DP fraction and provides a guideline to avoid artefacts and discrepancies. CO II,



**b**

Description of the genes			Response to chitin elicitation		
			qRT-PCR analysis <sup>a</sup>		DNA chip analysis <sup>b</sup>
Reported inducing signal	Identifier	nickname	WT	<i>cerk1</i>	WT
Chitin	AT2G44490	PEN2	<b><u>1.73</u></b>	0.27	<b><u>0.86</u></b>
	AT3G45640	MPK3	<b><u>1.03</u></b>	0.37	<b><u>1.93</u></b>
	AT4G31550	WRKY11	<b><u>2.30</u></b>	0.79	<b><u>2.89</u></b>
	AT5G25260	HP	<b><u>2.95</u></b>	0.29	<b><u>3.79</u></b>
Flagellin	AT1G30900	VSR	<b><u>2.07</u></b>	-0.04	-0.13
	AT4G31500	CYP83B1	<b><u>1.20</u></b>	0.57	0.21
	AT4G33430	BAK1	<b><u>1.39</u></b>	0.24	<b><u>0.52</u></b>
	AT5G46330	FLS2	<b><u>1.16</u></b>	0.67	<b><u>0.45</u></b>
Lipopolysaccharides	AT1G02920	GST11	<b><u>2.62</u></b>	1.09	<b><u>1.01</u></b>
pathogen infection	AT1G74590	GSTU10	<b><u>1.34</u></b>	-0.46	<b><u>1.20</u></b>
	AT5G24430	CDPK	<b><u>0.97</u></b>	-0.18	<b><u>0.32</u></b>

<sup>a</sup> this study

<sup>b</sup> after Ramonell, *et al.* (2005)

**Fig. 2: Validation of the CO preparation on *A. thaliana*.**

**a)** Elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Petri dishes containing 3 Col-0 wild type (WT) or *cerk1* mutant (*cerk1*) seedlings in a solution of luminol and HRP were placed in a luminometer and chemiluminescence was monitored after the addition of COs DP7 at a final concentration of 100 µg.ml<sup>-1</sup> (black curve). The control (gray curve) was mock-treated by the addition of water. **b)** Modulation of gene expression. Quantitative RT-PCR analysis of expression of genes reported to be induced by various biotic stress-related signals was performed after 1 h treatment of Col-0 wild type (WT) or *cerk1* mutant (*cerk1*) seedlings with 100 µg.ml<sup>-1</sup> COs DP7. Log<sub>2</sub> values of expression ratios calculated with respect to mock-treated seedlings are shown. Regulations that were supported by statistical analysis are reported in bold, underlined characters, whereas unsupported regulations are reported in italics (see Online Resource 4 for complete qRT-PCR data). For comparison, data from DNA chip transcriptomic analyses performed after 30 min treatment of Col-0 wild type (WT) seedlings with 100 µg.ml<sup>-1</sup> hydrolyzed crab shell chitin (Ramonell, *et al.* 2005) were extracted from the Genevestigator database (Hruz, *et al.* 2008), and regulations were reported likewise. PEN2, penetration 2 protein; MPK3, mitogen-activated protein kinase 3; WRKY11, WRKY transcription factor 11; HP, hypothetical protein; VSR, vacuolar sorting receptor; CYP83B1, cytochrome P450 monooxygenase 83B1; BAK1, BRI1-associated receptor kinase 1; FLS2, flagellin-sensitive 2; GST11, glutathione S-transferase 11; GSTU10, glutathione S-transferase TAU 10; CDPK, calcium-dependent protein kinase.

showing a relatively high molecular weight together with very good dissolution properties, was selected for further use in bioassays and referred to as “COs DP7” in accordance to its mean DP of 6.8 as determined by solid state NMR analysis.

### 2.3.2. *CERK1*-dependent responses to COs in *A.thaliana*

*CERK1* (LysM-RLK1) was demonstrated to be essential for chitin elicitor-dependent signal transduction in *A. thaliana*, including ROS production, MAP kinase activation, and gene regulation (Miya, et al. 2007; Wan, et al. 2008). We took advantage of the complete loss of chitin elicitor-dependent ROS production in the *cerk1* mutant to evaluate the purity of our CO preparation. As shown in **Fig. 2a**, the addition of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  COs DP7 to *A. thaliana* seedlings resulted in the transient increase of luminescence, indicative for the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Devlin and Gustine 1992), in wild type (WT), but not in the *cerk1* mutant (**Fig. 2a**). We next addressed whether our chitin preparation was able to modulate the transcriptome of *A. thaliana* by measuring the expression of a set of genes regulated by different biotic stress-related signals in this plant (**Fig. 2b** and **Table S3**). We chose genes which were previously shown to respond to either chitin, flagellin or lipopolysaccharide treatment, or to infection by powdery mildew (*Erysiphe orontii*), as described in the literature or in the Genevestigator database (Denoux, et al. 2008; Hruz, et al. 2008; Livaja, et al. 2008; Millet, et al. 2010; Zhang, et al. 2002). Gene expression was measured by qRT-PCR after 1 h and 6 h treatment with COs DP7; data for the 1 h treatment are summarized in **Fig. 2b** and complete data are provided in **Table S3**. In the Col-0 WT seedlings, all the genes in our selection previously reported to be up-regulated after 30 min of treatment with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  hydrolyzed CSC (**Fig. 2b**, last column), were also induced by COs DP7 after 1 h. The most highly induced gene in our experiment was AT5G25260, a gene encoding a hypothetical protein of unknown function. It was also the gene within our collection which was most highly induced in a previous study (Ramonell, et al. 2005). As observed earlier (Ramonell, et al. 2002), gene induction by chitin was transient, since the expression levels of the genes we tested were not significantly different from control levels after 6 h of chitin treatment (**Table S3**). Most interestingly, the comparison between the responses of the Col-

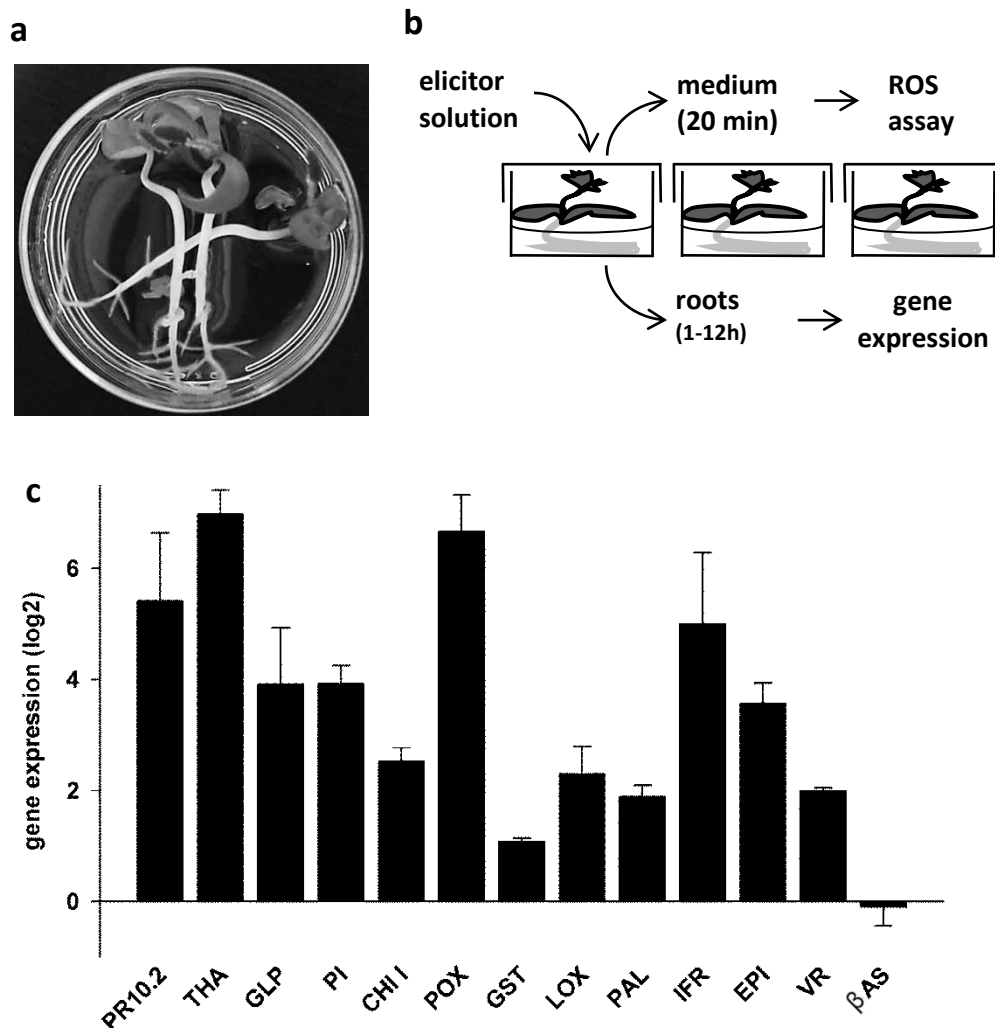
**Table S3: RT-qPCR analysis of gene expression of *A. thaliana* WT or *cerk1* mutant seedlings treated by COs DP7 for 1h or 6h**

Reported inducing signal	identifier	nickname	WT				<i>cerk 1</i>			
			1h		6h		1h		6h	
			log2 of expression ratio	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	log2 of expression ratio	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	log2 of expression ratio	<i>p</i> -value <sup>a</sup>	log2 of expression ratio	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
chitin	AT2G44490	PEN2	1.734	0.003	0.073	0.936	0.268	0.442	0.165	0.584
	AT3G45640	MPK3	1.032	0.037	0.235	0.620	0.370	0.646	0.243	0.698
	AT4G31550	WRKY11	2.298	0.034	-0.209	0.721	0.788	0.094	0.006	0.833
	AT5G25260	HP	2.945	0.004	1.979	0.968	0.289	0.313	-0.422	0.702
flagellin	AT1G30900	VSR	2.074	0.020	0.617	0.271	-0.038	0.826	0.228	0.340
	AT4G31500	CYP83B1	1.201	0.006	0.252	0.377	0.574	0.629	0.290	0.349
	AT4G33430	BAK1	1.390	0.041	0.334	0.641	0.244	0.354	0.292	0.544
	AT5G46330	FLS2	1.163	0.027	0.131	0.797	0.671	0.265	0.023	0.940
lipopolysaccharides	AT1G02920	GST11	2.619	0.005	0.372	0.756	1.091	0.463	0.416	0.336
pathogen infection	AT1G74590	GSTU10	1.335	0.030	0.350	0.218	-0.463	0.126	0.001	0.923
	AT5G24430	CDPK	0.969	0.034	-0.037	0.797	-0.177	0.371	0.340	0.186

<sup>a</sup> Significance of gene expression modulation over three biological replications was determined by a paired two samples student t test comparing  $2^{-\Delta Ct}$  values from the water treatment versus the CO treatment



0 WT and *cerk1* mutant seedlings demonstrated that the modulation of expression of all the genes responding to COs DP7 was reliant on CERK1 (**Fig. 2b** and **Table S3**).



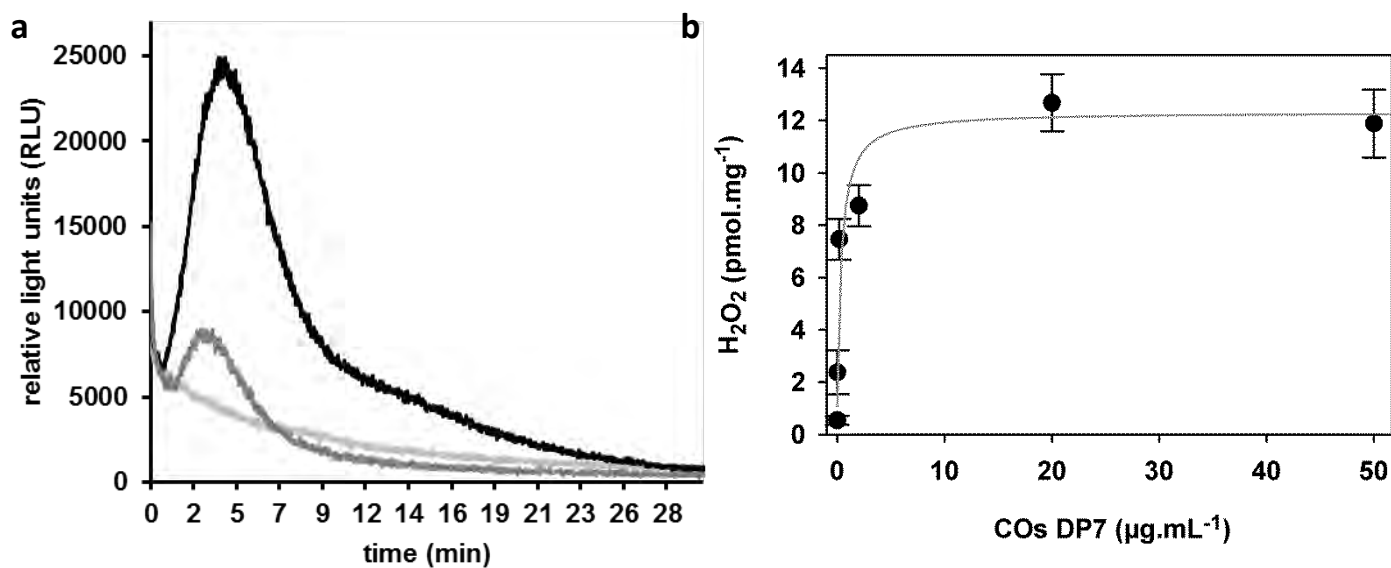
**Fig. 3** *M. truncatula* elicitation bioassay.

a) Developmental state of *M. truncatula* seedlings after 7 days growth in the hydroponic culture system: secondary leaves start to expand and the main roots are branching. b) The hydroponic test system allows the evaluation of early and late responses from the same samples; i.e. the end-point, amplex red-based, measurement of the production of ROS 20 min after elicitor treatment and the successive collection of the treated roots (1 to 12 h after elicitation) for RNA preparation and analysis of gene regulation. Only one seedling per petri dish is depicted for clarity reasons. c) Quantitative RT-PCR gene expression analysis after 4 h treatment with  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   $\beta$ -glucan elicitor from *P. sojae*. Mean values from three biological replicates (+/- standard error) are given as log<sub>2</sub> of fold-expression with respect to mock-treated seedlings. PR10.2, pathogenesis-related protein 10; THA, thaumatin; GLP, germin-like protein; PI, proteinase inhibitor; CHI I, class I chitinase; POX, peroxidase; GST, glutathione-S-transferase; LOX, lipoxygenase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; IFR, isoflavone reductase; EPI, NAD dependent epimerase/dehydratase; VR, vestitone reductase;  $\beta$ AS,  $\beta$ -amyrin synthase.

### 2.3.3. *M. truncatula* elicitation assay

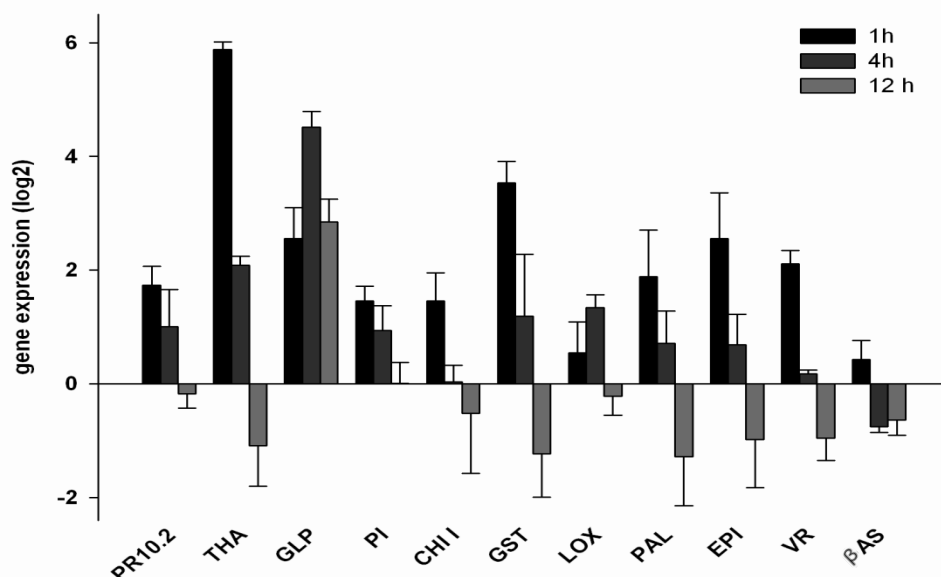
In order to assess the bioactivity of a range of elicitor molecules on *M. truncatula* roots we set up a hydroponic test system. Germinated seeds with radicles of 3 to 10 mm length were transferred to 2.5 ml of minimal medium in 35 mm petri dishes. They developed within one week into seedlings with erect hypocotyls, which pushed the cotyledons and expanding secondary leaves upwards, and with submerged roots, attached to the bottom of the petri dish via their lateral roots (**Fig. 3a**). The root fresh weight per petri dish of the *M. truncatula* line A17 at this time point was 89.5 mg (+/- 15.5). The use of small petri dishes containing three seedlings each allowed the processing of a large number of plants, whose root system could be treated with small volumes of elicitor solutions (one ml per petri dish), and for which early and late responses could be measured successively (**Fig. 3b**).

To check for the responsiveness of the roots and validate a set of genes that could be used as defense-associated markers in our hydroponic culture system, we treated the roots with a control elicitor, the  $\beta$ -1,3-linked and  $\beta$ -1,6-branched glucan elicitor of *P. sojae*, a well characterized elicitor of defense in legume plants, which was previously described to induce the biosynthesis of the phytoalexin medicarpin in *M. truncatula* roots (Côté, et al. 2000). After 4 h of incubation, we measured the expression levels of genes selected on the basis of their regulation by the pure hepta- $\beta$ -glucoside elicitor in *M. truncatula* cell cultures (Leclercq, et al. 2008) or by *A. euteiches* infection in *M. truncatula* seedlings (T. Rey and C. Jacquet, unpublished). They included genes encoding pathogenesis-related proteins (PR10.2, thaumatin (THA), germin-like protein (GLP), proteinase inhibitor (PI), and class I chitinase (CHI I)), proteins involved in redox homeostasis (peroxidase (POX), glutathione-S-transferase (GST)), as well as in defense pathways involving lipids (lipoxygenase, LOX), phenylpropanoids (phenylalanine ammonia lyase (PAL), isoflavone reductase (IFR), a predicted NAD dependent epimerase/dehydratase, presumably involved in flavonoid metabolism (EPI), and vestitone reductase (VR)), and terpenoids ( $\beta$ -amyrin synthase,  $\beta$ AS). In comparison to mock-treated roots, all these genes were highly induced by the *P. sojae*  $\beta$ -glucan elicitor, with the exception of  $\beta$ AS (**Fig. 3c**). In particular, the  $\beta$ -glucan elicitor induced the expression of PAL, IFR, and VR, which are part of the pathway leading to the production of antimicrobial isoflavonoids, whereas the absence of regulation of  $\beta$ AS suggested an inhibition of saponin biosynthesis. This resembled the pattern observed in *M. truncatula* cell cultures treated with



**Fig. 4 Elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by treatment of *M. truncatula* roots with COs.**

a) Time course of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation after addition of 20 μg.ml<sup>-1</sup> COs DP7 (black curve). Luminol/peroxidase-dependent chemiluminescence was monitored after pretreatment with DMSO (black curve) or 50 μM DPI (dissolved in DMSO, gray curve). The pretreatment with DMSO alone did not induce the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (light gray curve). b) Concentration dependency of the elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by COs. *M. truncatula* roots were incubated with increasing concentrations of COs DP7 for 20 min before collection of the extracellular medium and fluorimetric measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of amplex red and HRP. Data points are means (+/- standard error) of 2 to 7 biological replicates with 2 or 3 individual measurements, each.



**Fig. 5 Modulation of defense-associated gene expression in *M. truncatula* roots by COs.**

Seedlings were treated with 20 μg.ml<sup>-1</sup> COs DP7 or water as control and harvested after 1 h (black), 4 h (gray), or 12 h (light gray). Quantitative RT-PCR gene expression analysis was performed using the gene set defined above (Fig. 3c and Table S2). The data are shown as log<sub>2</sub> of fold-expression (+/- standard error) with respect to mock-treated seedlings, derived from three biological replicates.

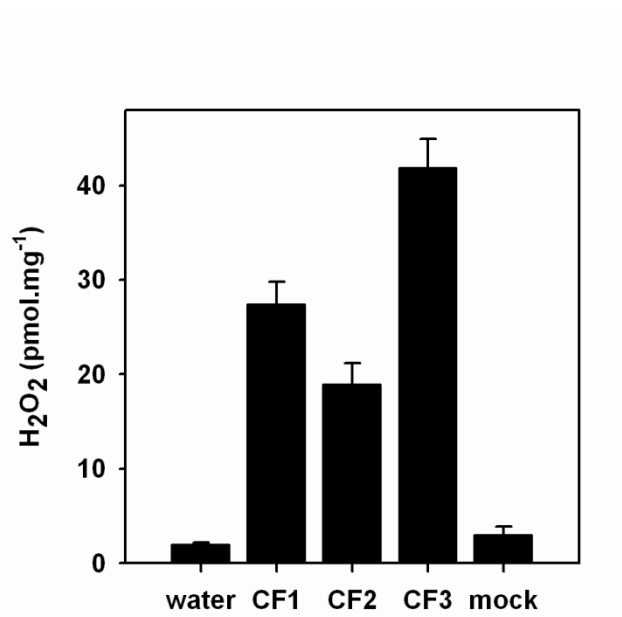
the pure hepta- $\beta$ -glucoside elicitor (Leclercq, et al. 2008). Taken together, our data validated our hydroponic growth system and our defense-associated gene set for assaying defense induction by candidate elicitors in *M. truncatula* roots.

#### 2.3.4. Activity of COs on *M. truncatula* roots

To check for the responsiveness of *M. truncatula* to chitin-derived fragments we first tested the activity of our COs DP7 preparation on the production of extracellular ROS, as measured in real-time by chemiluminescence. Application of 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  COs DP7 induced a rapid and transient increase of luminescence, which was strongly diminished by a pre-treatment of the roots with 50  $\mu\text{M}$  diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of plasma membrane-localized NADPH oxidases (**Fig. 4a**). The fact that DPI inhibition was not complete suggested that apoplastic peroxidases might participate in the generation of the MAMP-dependent oxidative burst, as shown for *A. thaliana* (Daudi, et al. 2012). The oxidative burst was completed after 20 min, which we used as the time point to collect samples of the medium for quantification of accumulated ROS in an end-point fluorescence assay using amplex red. The addition of 200 U  $\text{ml}^{-1}$  catalase to the collected medium samples prevented the oxidation of amplex red in COs-treated samples (data not shown), which indicated that the major ROS species present in the extracellular medium was  $\text{H}_2\text{O}_2$ , likely generated by rapid conversion of superoxide anions produced by NADPH oxidases. Increasing concentrations of COs DP7 induced an increase in the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which began to saturate at approximately 2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of elicitor (**Fig. 4b**).

We next checked for the ability of COs to modulate gene expression in *M. truncatula* roots.

Roots were harvested after 1, 4, and 12 h of incubation with 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  COs DP7, and the expression of the above-described set of genes was monitored by qRT-PCR. As shown in **Fig. 5**, all genes were maximally up-regulated at the earliest time point, with the exception of GLP and LOX which reached the highest level of accumulation at the 4 h time point. Only GLP stayed up-regulated even after 12h of elicitation with COs, whereas the expression level of all other genes dropped back to the level of the mock-controls, or even showed repression. The expression of POX and IFR was very low in untreated roots and induction of these genes by COs could not be determined.



**Fig. 6** Detection of elicitor activity in culture filtrates of *A. euteiches*.

CF1, CF2, and CF3 are 3 culture filtrates obtained from 3 independent cultures, and mock corresponds to the uninoculated culture medium adjusted to 2.5 mg.ml<sup>-1</sup> glucose. Roots were incubated in presence of the samples for 20 min before collection of the extracellular medium and fluorimetric measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of amplex red and HRP. Data points are means (+/- standard deviation) of 1 biological replicate with 3 individual measurements.

### 2.3.5. Detection of elicitors in *Aphanomyces euteiches* culture filtrates

We next employed the inducible ROS production of *M. truncatula* roots in the hydroponic test system for the detection of active compounds derived from *A. euteiches*, a legume root pathogen. *A. euteiches* was grown axenically in a protein-free synthetic medium containing glucose as the sole carbohydrate. Filtrates from 3 independent cultures were harvested 21 days post inoculation and their residual glucose content, as well as their content in hexosamines and proteins secreted by the microorganism, were determined. They contained 165, 130 and 2500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  glucose, 51, 47 and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  hexosamines, and 8, 17 and 19  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  protein, respectively. All three culture filtrates induced a strong oxidative burst, in contrast to the mock or water controls (**Fig. 6**).





## 2.4. DISCUSSION

In spite of recent advances on chitin perception in non-legumes, such as *A. thaliana* and rice, little is known about chitin-dependent defense activation in legumes, which are hosts of LCO-deploying endosymbioses. In this work, we developed an experimental system to evaluate the capacity of chitin to induce defense reactions in roots of *M. truncatula* by, first, preparing from crab shell chitin a purified chitooligosaccharide fraction containing high-DP COs, and second, establishing a standardized elicitation assay for medium to high-throughput applications.

The first steps of our procedure to prepare COs were derived from established protocols for purification and acid hydrolysis of CSC (Shahidi and Abuzaytoun 2005), followed by low performance gel filtration chromatography. The obtained fractions were characterized by solid, as well as liquid state NMR analysis. Compared to other techniques, solid state NMR analysis is truly quantitative and not sensitive to either response factors (as in mass spectrometry), or calibration (as in gel filtration chromatography), and does not need to dissolve the sample. Following our procedure, we were able to generate from 1 g CSC more than 10 mg of CO fractions of average DP 13.7 (CO I) and 6.8 (CO II), as evaluated by solid state RMN, which were 97 and 100% acetylated, respectively. Both fractions were thus promising as potential abundant sources of bioactive high-DP COs. However, we observed a surprising discrepancy between the DP values estimated from solid state NMR (13.7) and liquid state NMR (2.7) for the CO I fraction. This result is likely related to the ability of  $\beta$ -1,4-linked oligosaccharides to build intermolecular associations, resulting in irreversible aggregation and insolubility. After gel filtration and drying, the high-DP COs in CO I were no longer soluble, and were thus not accessible to liquid state NMR analysis anymore, yet still accessible to solid state NMR analysis, which resulted in diverging average DP estimations between the two methods. This observation illustrates the general difficulty of characterizing COs of relatively high DP and the impact of the drying protocol on the dissolution properties. To our knowledge, these aggregation issues have never been demonstrated so far for chitin oligosaccharides, and our data suggest that the concentrations of CO mixtures that have been used in many studies on chitin elicitation, ranging from  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  to  $1 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$ , might have been overestimated with regards to the actual concentration and DP of COs in solution. We thus recommend selecting the



fraction of apparent molecular weight between 2 and 3 kDa (CO II) to prepare the required CO elicitor.

Not only the actual concentration of elicitors, but also their purity, are essential parameters when studying their perception by plants. It was recently shown that COs were contaminating a laminarioligosaccharide preparation, causing confused interpretation of its elicitor activity (Desaki, et al. 2011). We selected for further characterization the fully acetylated CO II preparation with good dissolution properties and a mean DP of 6.8 (COs DP7), very likely containing a high proportion of COs of DP7 and 8 that were shown to be most active in the literature (Day, et al. 2001; Shibuya and Minami 2001; Zhang, et al. 2002). In order to prove the absence of any compound able to elicit chitin-independent defense reactions, this preparation was tested on the *cerk1* mutant of *A. thaliana* at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a concentration usually employed for elicitation of *A. thaliana* by CO mixtures (Ramonell, et al. 2005; Zhang, et al. 2002). In contrast to WT seedlings, mutant seedlings were unable to produce ROS in response to COs DP7, and all the genes that responded to COs DP7 in WT seedlings lost their responsiveness in *cerk1* seedlings (Fig. 2). The COs DP7 preparation was therefore validated as being essentially free of contaminating non-CO elicitors. It was then retained to address its activity in *M. truncatula* roots, using a standardized bioassay that we developed in the frame of this study.

Unlike *A. thaliana*, *M. truncatula* seedlings cannot be cultivated submerged. However, the use of moderate amounts of liquid medium in small petri dishes gave rise after one week to the development of seedlings with upright hypocotyls and immersed roots, which were responsive to the treatment with a well-defined elicitor of defense responses in legumes, the  $\beta$ -glucan from *P. sojae* (Ayers, et al. 1976). All but one of a set of defense-associated genes, encoding pathogenesis-related (PR) proteins, enzymes involved in the redox homeostasis, and in the biosynthesis of isoflavonoid phytoalexins, were validated as elicitation marker genes under our conditions, being upregulated in response to the control elicitor, in a pattern similar to the one reported for *M. truncatula* cell cultures treated with the pure hepta- $\beta$ -glucoside or a proteinaceous elicitor of yeast (Leclercq, et al. 2008). In addition, our experimental set up allowed measuring non-destructively the early production of extracellular ROS by analyzing small aliquots of the extracellular medium, until the harvest of the root system for destructive measurement of gene expression.



Using our bioassay, we showed that COs DP7 induced an oxidative burst (**Fig. 4**) and defense markers (**Fig. 5**) in *M. truncatula*. The perception system for COs of *M. truncatula* was found to be very sensitive, since concentrations as low as  $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  COs DP7, which corresponds to approximately 50 nM chitoheptaose equivalent concentration, induced the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , while  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  COs DP7 resulted in approximately half-maximal induction of the oxidative burst (**Fig. 4b**). Considering the yield of the COs DP7 preparation and the sensitivity of our assay, it can be calculated that 1 g of crab shell chitin allows the preparation of COs in amounts sufficient to elicit 2160 seedlings with  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of elicitor. As observed for *A. thaliana* (Ramonell, et al. 2002), the up-regulation of chitin-induced genes was rapid but transient in *M. truncatula* roots, declining after 1 h treatment for most of the genes of our selection, which were even slightly down-regulated at 12 h (**Fig. 5**). This data shows on the one hand the importance of selecting early time points to assess CO elicitor activity in *M. truncatula* roots. On the other hand, the GLP gene marker from our selection might be of special interest because of its sustained induction upon CO treatment.

Our biological assay will prove useful each time it is required that roots are readily accessible for treatment or for measurement of physiological responses, for example for the deciphering of the perception mechanisms and signaling pathways involved in responses of *M. truncatula* roots to signals from soil-borne microorganisms. As a proof of concept, we applied culture filtrates of *A. euteiches*, an important soil-borne pathogen of pea, to *M. truncatula* roots grown in the hydroponic test system. The induction of the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  strongly suggested the presence of elicitor-active compounds in the culture filtrate, which were released into the medium by the growing oomycete (**Fig. 6**). The application of the *M. truncatula* root assay will enable the bioactivity-based purification of these elicitor-active compounds, which might include chitosaccharidic fragments released from the cell wall surface (Badreddine, et al. 2008).

In conclusion, we provide a rigorous procedure to generate and to purify ample amounts of a highly active chitooligosaccharide elicitor that combines the presence of fully acetylated COs of DP higher than 6 with good solubility properties. Our procedure is accessible to most laboratories and represents a valuable alternative to commercial CO products, which are either poorly characterized, or are devoid of COs of DP higher than 6, or are expensive when they grant the presence of a pure high-DP CO. On this occasion, we illustrate how the dissolution properties of COs can be studied by a combination of liquid-



state and solid-state NMR and we show that high-DP range CO fragments aggregate after lyophilization, a property that might cause inconsistent results when exploring their biological activity. In addition, we have established a fast and versatile standardized elicitation assay for *M. truncatula*, and show that its root system responds with high sensitivity, but transiently, to the CO elicitor. This assay will be fundamental to the identification of potential chitosaccharide elicitors from *A. euteiches*. It may also be of value for studies of other physiological responses of *M. truncatula* roots, such as responses to salt stress or drought.





## 2.5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. S. Bensmihen (LIPM, UMR CNRS-INRA 2594/441, Toulouse) for supplying seeds of the *A. thaliana cerk1* GABI-KAT mutant 096F09, and Dr. H. Chanzy (CERMAV-CNRS, Grenoble) and J.J. Bono (LIPM, UMR CNRS-INRA 2594/441, Toulouse) for continuous support. This work was funded by the Région Midi-Pyrénées, the CNRS (PhD grant INEE 36 to A.N.), and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0208-01 “Sympasignal”).



## **2.6. REFERENCES**

- Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VGH (2010) Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs* 8:1482-1517
- Ameline-Torregrosa C, Cazaux M, Danesh D, Chardon F, Cannon SB, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B, Young ND, Samac DA, Huguet T, Jacquet C (2008) Genetic dissection of resistance to anthracnose and powdery mildew in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 21:61-69
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O, Fluhr R (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 143:1817-1826
- Ayers AR, Ebel J, Valent B, Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions .10. Fractionation and biological-activity of an elicitor isolated from mycelial walls of phytophthora-megasperma var sojiae. *Plant Physiology* 57:760-765
- Badreddine I, Lafitte C, Heux L, Skandalis N, Spanou Z, Martinez Y, Esquerre-Tugaye MT, Bulone V, Dumas B, Bottin A (2008) Cell Wall Chitosaccharides Are Essential Components and Exposed Patterns of the Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryotic Cell* 7:1980-1993
- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108:211-218
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139:5-17
- Côté F, Roberts KA, Hahn MG (2000) Identification of high-affinity binding sites for the hepta-beta-glucoside elicitor in membranes of the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Planta* 211:596-605
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel FM, Bolwell GP (2012) The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in *Arabidopsis* Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. *Plant Cell*
- Day RB, Okada M, Ito Y, Tsukada K, Zaghoulani H, Shibuya N, Stacey G (2001) Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiol* 126:1162-1173



*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de M.truncatula aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

- Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant* 1:423-445
- Desaki Y, Otomo I, Shibuya N (2011) Contamination of chitin oligosaccharides in a laminarioligosaccharide preparation can cause a confused interpretation of its elicitor activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:362-363
- Devlin WS, Gustine DL (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology* 100:1189-1195
- Djebali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathe C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Aouani ME, Esquerre-Tugaye M-T, Dumas B, Huguet T, Jacquet C (2009) Partial Resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Is Associated with Protection of the Root Stele and Is Controlled by a Major QTL Rich in Proteasome-Related Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:1043-1055
- Einbu A, Vårum KM (2008) Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules* 9:1870-1875
- Gough C, Cullimore J (2011) Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 24:867-878
- Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, Versali MF, Rinaudo M (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1:746-751
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008:420747
- Ito Y, Kaku H, Shibuya N (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* 12:347-356
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11086-11091
- Kim SY, Sivaguru M, Stacey G (2006) Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 142:984-992
- Kishimoto K, Kouzai Y, Kaku H, Shibuya N, Minami E, Nishizawa Y (2010) Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant J* 64:343-354
- Kombrink A, Sánchez-Vallet A, Thomma BP (2011) The role of chitin detection in plant-pathogen interactions. *Microbes Infect*



*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de M.truncatula aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16:3496-3507
- Leclercq J, Fliegmann J, Tellström V, Niebel A, Cullimore JV, Niehaus K, Küster H, Ebel J, Mithöfer A (2008) Identification of a multigene family encoding putative beta-glucan-binding proteins in *Medicago truncatula*. *J Plant Physiol* 165:766-776
- Leitner M, Kaiser R, Rasmussen MO, Driguez H, Boland W, Mithöfer A (2008) Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signalling components in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69:2029-2040
- Liu TT, Liu ZX, Song CJ, Hu YF, Han ZF, She J, Fan FF, Wang JW, Jin CW, Chang JB, Zhou JM, Chai JJ (2012) Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* 336:1160-1164
- Livaja M, Zeidler D, von Rad U, Durner J (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* 213:161-171
- Lowry Oh, Rosebrough Nj, Farr Al, Randall Rj (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Millet YA, Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D, Ausubel FM (2010) Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 22:973-990
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19613-19618
- Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, Yazaki K, Aoki T, Shibuya N, Kouchi H (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 65:169-180
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119-144
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6:763-775
- Petutschnig EK, Jones AM, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J Biol Chem* 285:28902-28911
- Ramonell K, Berrocal-Lobo M, Koh S, Wan J, Edwards H, Stacey G, 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





*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de M.truncatula aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

- Ramonell KM, Zhang B, Ewing RM, Chen Y, Xu D, Stacey G, Somerville S (2002) Microarray analysis of chitin elicitation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 3:301-311
- Samac DA, Peñuela S, Schnurr JA, Hunt EN, Foster-Hartnett D, Vandenbosch KA, Gantt JS (2011) Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Pathol* 12:786-798
- Samain E, Drouillard S, Heyraud A, Driguez H, Geremia RA (1997) Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydr Res* 302:35-42
- Shahidi F, Abuzaytoun R (2005) Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, pp 93-135
- Shibuya N, Minami E (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:223-233
- Tanner SF, Chanzy H, Vincendon M, Roux C, Gaill F (1990) High-resolution solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance study of chitin. *Macromolecules* 23:3576-3583
- Uppalapati SR, Marek SM, Lee HK, Nakashima J, Tang Y, Sledge MK, Dixon RA, Mysore KS (2009) Global gene expression profiling during *Medicago truncatula*-*Phymatotrichopsis omnivora* interaction reveals a role for jasmonic acid, ethylene, and the flavonoid pathway in disease development. *Mol Plant Microbe Interact* 22:7-17
- Vailleau F, Sartorel E, Jardinaud MF, Chardon F, Genin S, Huguet T, Gentzbittel L, Petitprez M (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:159-167
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:471-481
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M, Cheung F, De Mita S, Krishnakumar V, Gundlach H, Zhou S, Mudge J, Bharti AK, Murray JD, Naoumkina MA, Rosen B, Silverstein KA, Tang H, Rombauts S, Zhao PX, Zhou P, Barbe V, Bardou P, Bechner M, Bellec A, Berger A, Bergès H, Bidwell S, Bisseling T, Choisne N, Couloux A, Denny R, Deshpande S, Dai X, Doyle JJ, Dudez AM, Farmer AD, Fouteau S, Franken C, Gibelin C, Gish J, Goldstein S, González AJ, Green PJ, Hallab A, Hartog M, Hua A, Humphray SJ, Jeong DH, Jing Y, Jöcker A, Kenton SM, Kim DJ, Klee K, Lai H, Lang C, Lin S, Macmill SL, Magdelenat G, Matthews L, McCorrison J, Monaghan EL, Mun JH, Najar FZ, Nicholson C, Noirot C, O'Bleness M, Paule CR, Poulain J, Prion F, Qin B, Qu C, Retzel EF, Riddle C, Sallet E, Samain S, Samson N, Sanders I, Saurat O, Scarpelli C, Schiex T, Segurens B, Severin AJ, Sherrier DJ, Shi R, Sims S, Singer SR, Sinharoy S, Sterck L, Viollet A, Wang BB, Wang K, Wang M, Wang X, Warfsmann J, Weissenbach J, White DD, White JD, Wiley GB,



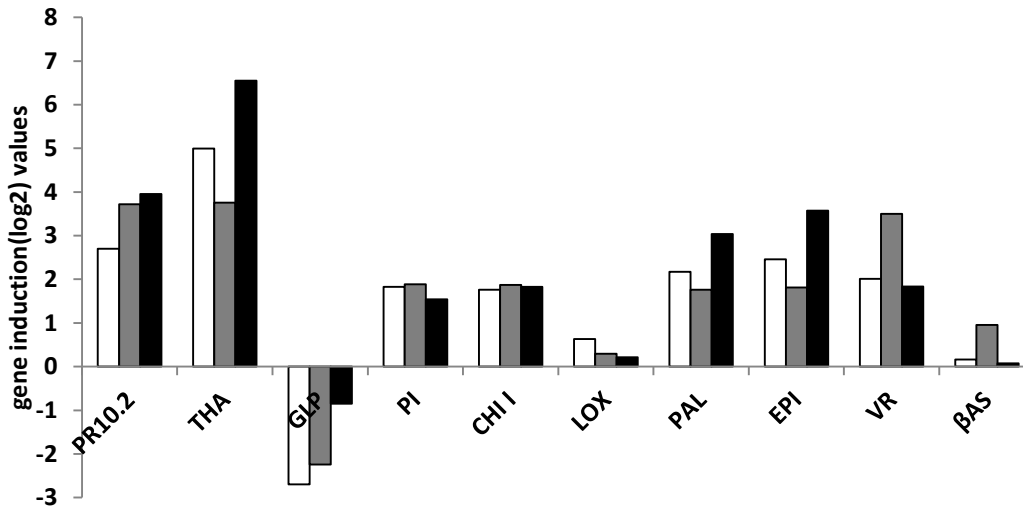
*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de M.truncatula aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

Wincker P, Xing Y, Yang L, Yao Z, Ying F, Zhai J, Zhou L, Zuber A, Dénarié J, Dixon RA, May GD, Schwartz DC, Rogers J, Quétier F, Town CD, Roe BA (2011) The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480:520-524

Young ND, Udvardi M (2009) Translating Medicago truncatula genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol* 12:193-201

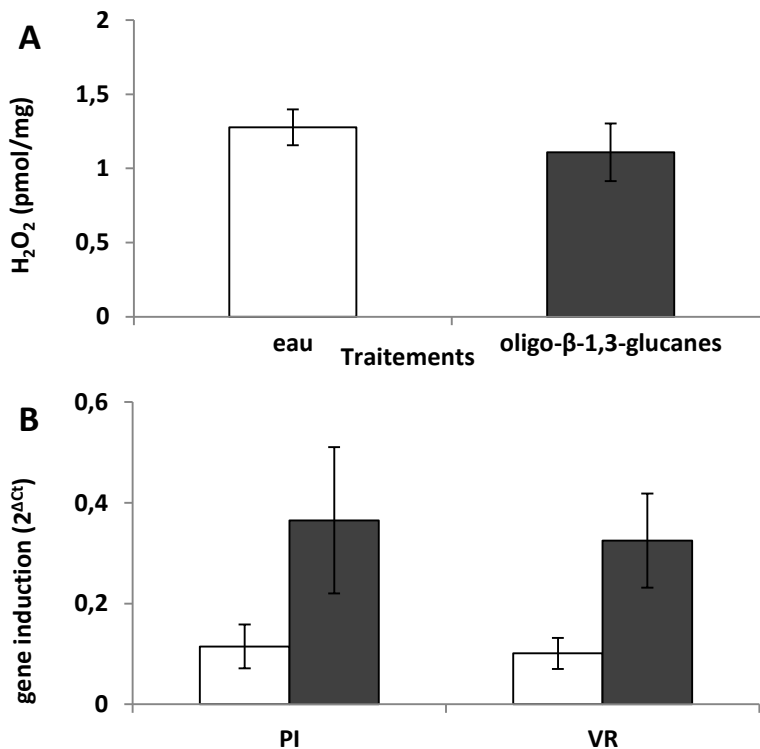
Zamioudis C, Pieterse CM (2011) Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Mol Plant Microbe Interact*

Zhang B, Ramonell K, Somerville S, Stacey G (2002) Characterization of early, chitin-induced gene expression in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 15:963-970



**Figure 1.4 :** Régulations induites par le filtrat de culture d'*A.euteiches* de l'expression de gènes associés à la défense dans les racines de *M.truncatula*

Les racines ont été traitées avec trois filtrats indépendants CF1 (□), CF2 (■) et CF3 (■), et récoltées après 4 h d'incubation. L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée par RT-qPCR. Les données présentées sont des log2 des niveaux d'expression dans les plantes traitées par les filtrats par rapport aux plantes traitées par le milieu de culture non inoculé par *A.euteiches*. Les données sont obtenues à partir d'un réplicat biologique. **PR10.2** : Pathogenesis-related protein 10.2 ; **THA** : Thaumatin ; **GLP** : Germin-like protein subfamily 1 member 7 ; **PI** : Inhibitor of trypsin and hageman factor ; **CHI I** : Chitinase I ; **LOX** : Seed lipoxygenase ; **PAL** : Phenylalanine ammonia-lyase ; **EPI** : NAD-dependent epimerase/dehydratase ; **VR** : Vestitone reductase ; **βAS** : β-amyrin synthase.



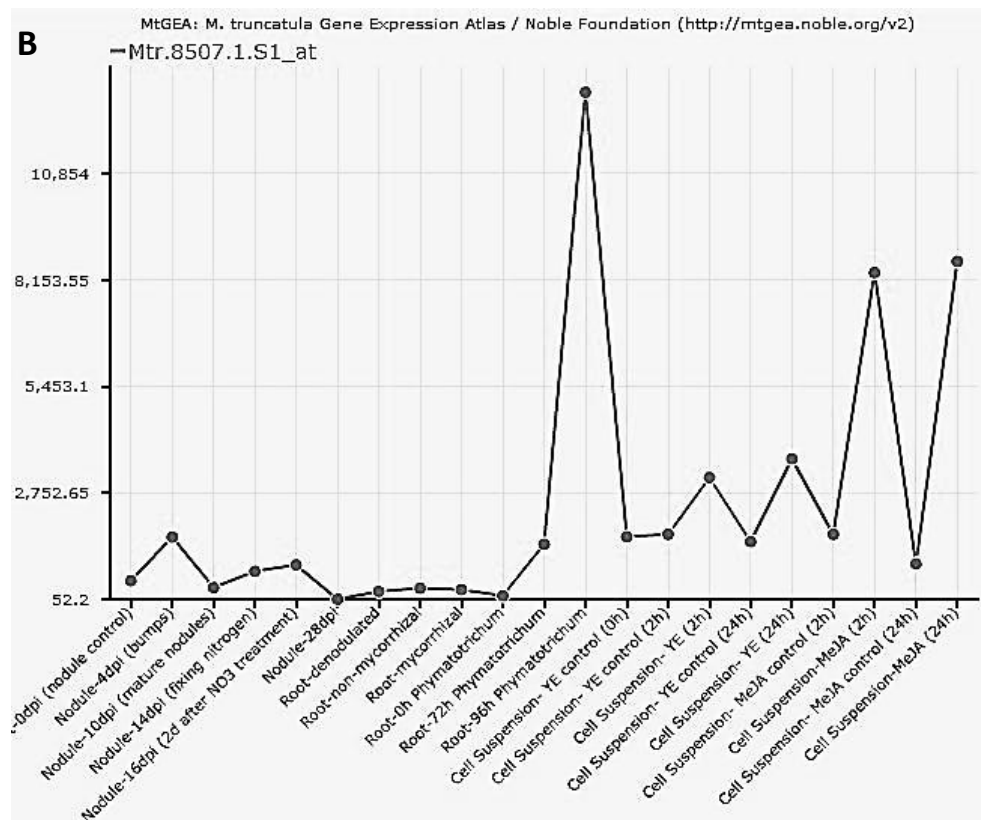
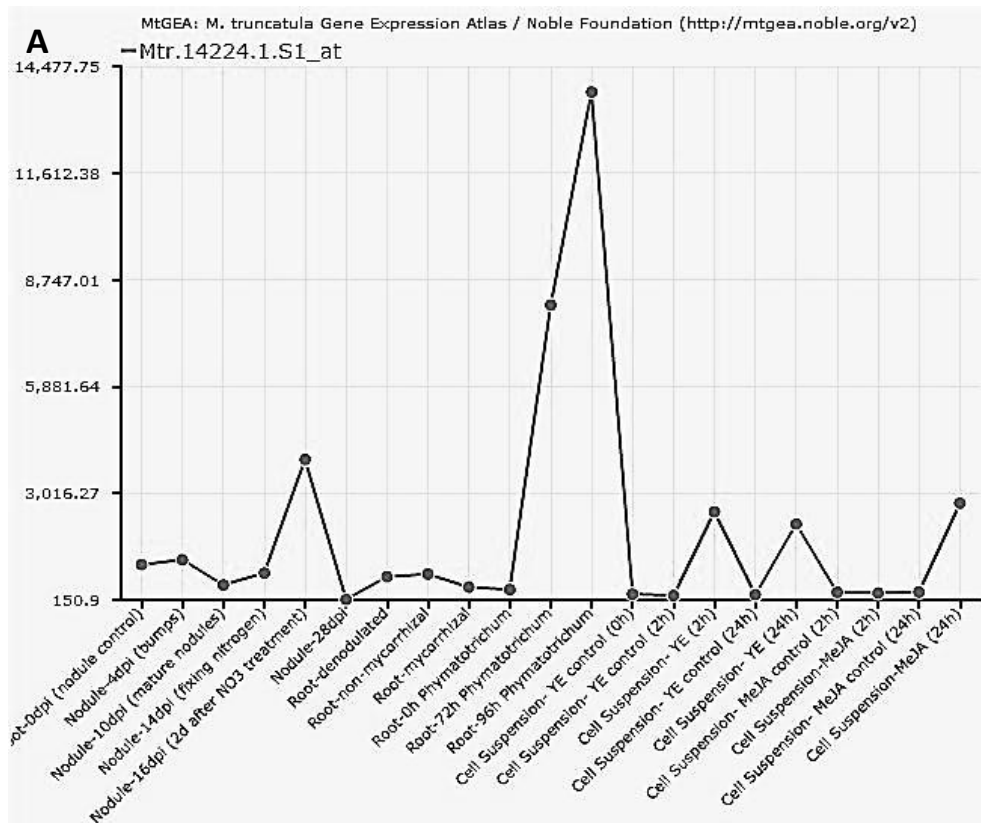
**Figure 1.5 :** Activité biologique des β-1,3-glucanes dans les racines de *M.truncatula* A17 wt

Les racines des plantes sont traitées soit avec de l'eau (□), soit avec des oligo-β-1,3-glucanes (■) à 100 μg/mL. **A** : Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire, après 20 min d'incubation. **B** : Régulation de l'expression de gènes associés à la défense, après 4 h d'incubation. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

### **3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES CONCERNANT L'EXPLOITATION DU BIOESSAI**

Dans le but de confirmer l'activité élicitrice détectée dans les filtrats de culture d'*A.euteiches* par la mesure de l'accumulation de ROS dans le milieu de racines traité (**Fig 5** de l'article soumis), nous avons mesuré l'expression de gènes de notre sélection de gènes associés à la défense dans les racines traitées. Après 4 heures d'incubation au contact des filtrats de culture CF1, CF2 ou CF3, les racines des plantes ont été prélevées et l'expression des gènes a été analysée (**Figure 1.4**). Nous constatons que la plupart de ces gènes sont nettement induits, excepté GLP qui est réprimé et  $\beta$ AS et LOX dont l'expression est peu modifiée. Ainsi, nous renforçons l'hypothèse de la présence de composés éliciteurs produits par *A.euteiches* dans son milieu de culture, perçus par *M.truncatula*.

L'activité élicitrice d'oligo- $\beta$ -1,3-glucanes linéaires issus du curdlan, de degré de polymérisation compris entre 6 et 8, a été étudiée à l'aide du bioessai. Les mesures de ROS extracellulaires n'ont pas révélé que ces composés sont capables d'induire leur production au niveau racinaire chez *M.truncatula* (**Figure 1.5.A**). En revanche, de façon intéressante, l'analyse de l'expression du gène de vestitone réductase (VR) et du gène d'inhibiteur de protéases (PI) révèle que les oligo- $\beta$ -1,3-glucanes linéaires sont capables d'induire l'expression de ces deux gènes après quatre heures d'incubation (**Figure 1.5.B**). L'induction de l'expression de gènes relatifs à la défense, sans induction de production de ROS extracellulaires, suggère que l'activation des défenses de la plante peut se faire sans passer par la production de ROS.



**Figure 1.6 :** Régulation de l'expression des gènes Medtr1g075340 et Medtr4g120860 sur *The Medicago truncatula Gene Expression Atlas*

**A :** Régulation de la sonde Affymetrix Mtr.14224.1.S1\_at correspondant au gène Medtr1g075340 (PI). **B :** Régulation de la sonde Affymetrix Mtr.8507.1.S1\_at correspondant au gène Medtr4g120860 (PR10.2).

#### **4. DEVELOPPEMENT DE CONSTRUCTIONS RAPPORTRICES DE LA DEFENSE**

Nous avons observé, à l'aide du bioessai décrit précédemment, que les oligo- $\beta$ -1,3-glucanes linéaires n'induisent pas de production de ROS extracellulaires. La perception de ces oligosaccharides n'a été révélée que par l'induction de l'expression de gènes de la plante. Nous avons donc développé deux outils complémentaires pour mettre en évidence de façon rapide une activité biologique qui n'aurait pas pu être mise en évidence par la mesure de ROS : nous avons entrepris de cloner deux constructions rapportrices de la défense, afin de générer du matériel biologique transgénique contenant ces constructions.

La région promotrice du gène d'inhibiteur de protéase (PI) a été sélectionnée pour les raisons suivantes :

L'expression du gène PI est induite chez *M.truncatula* suite à de nombreux stress biotiques. Comme présenté précédemment, son expression est induite par le  $\beta$ -glucane de *Phytophthora*, les COs de chitine, les oligo- $\beta$ -1,3-glucanes linéaires ainsi que par l'infection par *A.euteiches* à 1, 3 et 6 jours après inoculation. Dans des résultats préliminaires obtenus au cours du développement du bioessai précédent, il a été observé que le gène PI est également induit par les éliciteurs glycoprotéiques CBEL et P2 de *Phytophthora* (Roux *et al.*, 1994; Villalba Mateos *et al.*, 1997) (résultats non présentés). *The Medicago truncatula Gene Expression Atlas (MtGEA) Project* (<http://mtgea.noble.org/v2/>) indique que l'expression de ce gène est induite dans les plantes infectées par *Phymatotrichum* à 72 h et 96 h, dans les cultures cellulaires traitées avec de l'extrait de levure (YE) à 2 h et 24 h, ainsi que dans les cultures cellulaires traitées par du méthyljasmonate après 24 h, et qu'il n'y a pas d'induction au cours de la mycorhization et la nodulation (**Figure 1.6.A**). Une construction de fusion traductionnelle comprenant 2500 bases en amont du codon d'initiation ainsi que le premier exon et le premier intron de ce gène a été clonée par la méthode du Gateway dans le plasmide pKGWL7.0 contenant la séquence codante du gène de la luciférase en aval du site de recombinaison, donnant la construction nommée promPI-*luc*.

La région promotrice du gène de pathogenesis-related protein 10.2 (PR10.2) a été sélectionnée pour les raisons suivantes :

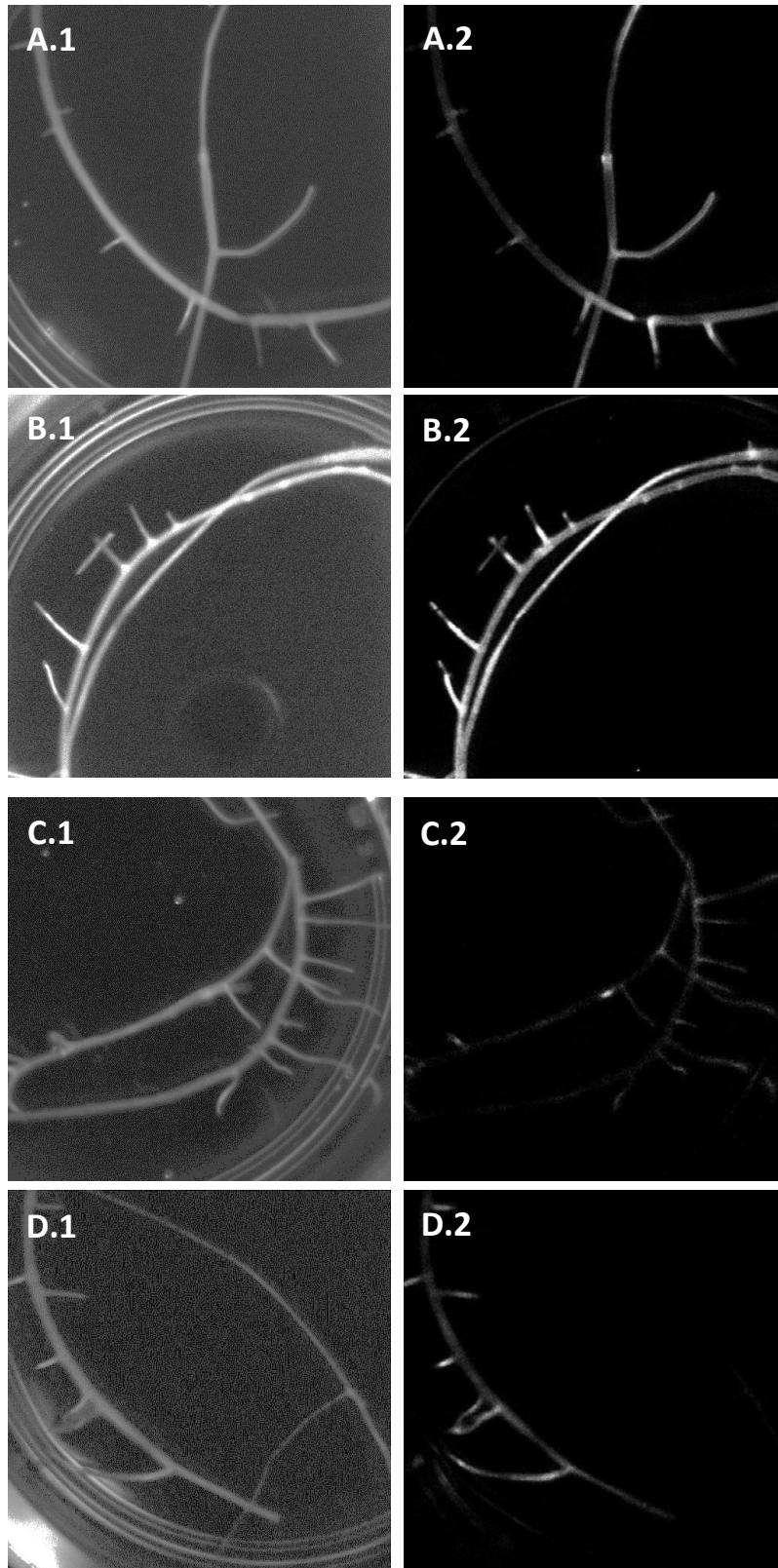
Comme présentée précédemment, son expression est induite par le  $\beta$ -glucane de *Phytophthora*, et les COs de chitine. Les données de transcriptomique sur *M.truncatula* de l'équipe Interactions Plante-Microorganisme (Laboratoire de Recherche en Sciences





Végétales, CNRS/Université Paul Sabatier, Toulouse) réalisées sur des puces 16kOliPlus, indiquent que l'expression de ce gène est induite au cours de l'infection des parties racinaires par *A.euteiches* à 1, 3 et 6 jours après inoculation, au cours de l'infection des parties aériennes par le champignon *Colletotrichum lindemuthianum* à 1 jours après inoculation et au cours de l'infection des parties aériennes par *Colletotricum trifolii* à 1 et 3 jours après inoculation. Elle est aussi induite par le traitement des parties aériennes des plantes par le Bion, analogue de l'acide salicylique, après 6 jours, ainsi que par l'acide  $\beta$ -aminobutyrique 1 et 2 jours après traitement. Les données disponibles sur le *MtGEA Project* indiquent que les régulations de l'expression de ce gène présentent des similitudes avec celles du gène PI dans les conditions d'infection par *Phymatotrichum*, de mycorhization et en réponse à l'élicitation par l'extrait de levure. L'expression du gène PR10.2 présente une induction dans les cultures cellulaires traitées par du méthyljasmonate après 2 h (**Figure 1.6.B**).

La séquence génomique en amont du gène PR10.2 n'est pas complète et a nécessité de réaliser des alignements pour la prolonger. La sonde 16kOliPlus MT015362 a été construite sur le MTGI9-TC123318 de la version 9 de la tentative d'assemblage des EST de *M.truncatula*. Ce TC s'aligne à 100% avec la sonde Affymétrie Mtr.8507.1.S1\_at dont les régulations sont présentées en **Figure 1.6.B**. L'alignement du MTGI9-TC123318 sur les séquences des BAC-ends de *M.truncatula* a permis d'aligner les BACs mth2-146L14FM1 et mte1-76K22RM1, permettant d'obtenir une région d'environ 800 bases en amont de l'ATG prédit par le MTGI9-TC123318. Cette séquence a été clonée par GateWay dans le plasmide pKGWL7.0 donnant la construction nommée promPR10.2-*luc*.



**Figure 1.7 :** Visualisation de la bioluminescence dans des cultures racinaires de *M.truncatula* exprimant une construction rapportrice de la défense promoteur-luciférase  
**A, B :** Racines exprimant la construction promPI-*luc*. **C, D :** Racines exprimant la construction promPR10.2-*luc*. **A, C :** Traitement eau. **B, D :** Traitement COs 100 µg/mL. **1 :** Visualisation des racines sous lumière transmise. **2 :** Bioluminescence enregistrée avec une caméra emCCD C9100-13.

La transformation de racines de *M.truncatula* lignée R108 nous a permis d'obtenir deux lignées de culture de racines transgéniques, l'une exprimant la luciférase sous le contrôle de la région promotrice du gène PI, l'autre sous le contrôle de la région promotrice du gène PR10.2.

Des fragments des racines transgéniques générées avec les constructions *promPI-luc* ou *promPR10.2-luc* et ont été traités par des COs DP 7. La luminescence a été révélée à l'aide d'une caméra emCCD après 21 h d'incubation. Nous avons obtenu les résultats présentés en (**Figure 1.7**). Pour les deux constructions nous observons une induction de la luminescence émise suite au traitement par les COs DP 7. Nous constatons que le niveau de base d'expression de la construction *promPI-luc* est élevé comparé à celui de la construction *promPR10.2-luc* qui est presque indétectable. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par RT-qPCR (niveau d'expression basal en  $2^{-\Delta Ct} \pm SE$ : PI =  $0.09 \pm 0.02$  ; PR10.2 =  $0.01 \pm 0.007$ ).



## **DISCUSSION**

Afin de pouvoir étudier l'activité biologique des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches*, nous avons mis au point un bioessai d'élicitation de l'appareil racinaire de *M.truncatula*, permettant de mettre en évidence la perception d'une molécule à des temps précoces et d'étudier la régulation de gènes relatifs à la défense de la plante. La mise au point de ce bioessai a été réalisée à l'aide d'une préparation de COs de chitine, qui servira par la suite d'éliciteur contrôle pour l'étude de l'activité biologique des chitosaccharides pariétaux d'*A.euteiches*.

Dans le but de mettre au point ce système expérimental, nous avons développé une méthode permettant de produire des chitooligosaccharides de DP élevé à partir de chitine de crabe. La méthode de préparation de COs que nous proposons est plus complexe qu'une simple mise en suspension de chitine ou que l'utilisation d'hydrolysats commerciaux de chitine, qui sont mal caractérisés et/ou de faible DP. Mais cette méthode est plus simple que la préparation de chitoheptaose ou chitooctaose purs, et est réalisable dans la plupart des laboratoires. Nous avons obtenu environ 150 mg de COs de DP moyen 13.7 (fraction CO I) et de DP moyen 6.8 (fraction CO II) par extraction de 10 g de chitine de crabe.

Les analyses combinées de RMN du solide et de RMN du liquide sur la fraction CO I ont mis en évidence la propriété des COs de DP élevés à s'agréger suite à la lyophilisation, vraisemblablement à cause d'associations intermoléculaires irréversibles. À notre connaissance, ces problèmes d'agrégation des oligosaccharides de chitine en mélange n'ont jamais été documentés de façon aussi illustrative. Pour la suite des expériences, c'est la fraction CO II, notée « COs DP7 », qui a été utilisée.

Les essais réalisés sur le mutant d'*A.thaliana cerk1*, comparé à la plante sauvage, ont indiqué qu'il n'y a pas d'éliciteur contaminant dans cette préparation.



Les COs DP7 ont permis de mettre au point un bioessai sur les parties racinaires de *M.truncatula*, dont le débit permet de réaliser environ 60 traitements en triplicats par jour. Les points forts de ce bioessai résident dans sa simplicité, sa rapidité, sa bonne reproductibilité, et sa sensibilité. Au cours du développement de ce système nous avons comparé différents matériels biologiques. Les jeunes plantes cultivées en condition hydroponique se sont montrées plus sensibles à l'élicitation que les cultures cellulaires et les graines germées que nous avons utilisées. Notre dispositif s'est révélé être plus simple, plus accessible et beaucoup moins volumineux que ceux déjà publiés (Bonfranceschi *et al.*, 2009; Chandran *et al.*, 2008; Fei and Vessey, 2009; Felle *et al.*, 1995; Rodriguez-Celma *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Selim *et al.* (2010) proposent une méthode de culture très similaire à la nôtre, mais les auteurs ne l'exploitent qu'à des fins d'inoculation avec un microorganisme pathogène et réalisent leurs élicitations sur des cultures cellulaires. La méthode que nous proposons permet aussi de doser d'autres molécules sécrétées par les racines, comme par exemple des flavonoïdes. Tant que l'échantillonnage se fait par prélèvement du milieu, plusieurs dosages peuvent être cumulés sans affecter la plante, qui peut être récoltée par la suite pour effectuer d'autres analyses sur ses tissus.

Grâce à ce bioessai, nous avons montré que la fraction COs DP7 est capable d'induire une production d' $H_2O_2$  suite à sa perception au niveau racinaire chez *M.truncatula*, ainsi que des gènes relatifs à la défense, ce qui n'avait jusqu'ici jamais été décrit chez *M.truncatula*. Ce bioessai pourra notamment être exploité afin de réaliser une étude visant à déterminer l'impact du DP des COs sur la perception et l'induction des réponses de défense de *M.truncatula*, à l'aide de COs individuels de différents DPs.

Au cours de ces travaux nous avons utilisé des oligomères linéaires de glucoses liés en  $\beta$ -1,3, de DP compris entre 5 et 9. Dans la littérature, les oligomères de  $\beta$ -1,3-glucanes utilisés proviennent généralement de la laminarine de l'algue brune *Laminaria digitata*. La laminarine est décrite comme un polymère de glucoses liés par des liaisons  $\beta$ -1,3 aussi avec des ramifications en liaisons  $\beta$ -1,6 (Lepagnol-Descamps *et al.*, 1998; Read *et al.*, 1996). Nos oligomères ont été préparés à partir de curdlan, qui est décrit comme un polymère linéaire de glucoses liés uniquement par des liaisons  $\beta$ -1,3 (Manjanna *et al.*, 2009).





## Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de *M.truncatula* aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens

Des oligomères linéaires de laminarine, de DP compris entre 2 et 30, ont été employés comme éliciteur sur *Vitis vinifera*, *M.sativa*, *O.sativa*, *N.tabacum*, *N.plumbaginifolia* et *A.thaliana*. Il a été montré qu'ils sont capables d'induire un influx calcique, une alcalinisation du milieu, une production de ROS avec les oligomères d'au moins DP 5, l'activation de MAPK, ainsi que l'expression de gènes relatifs à la défense comme des gènes codant des PR-protéines et des enzymes clefs du métabolisme secondaire telles que la phénylalanine ammonia lyase (PAL), et aussi d'induire des activités  $\beta$ -1,3-glucanase et chitinase ainsi que la production de phytoalexines chez *V.vinifera* (Aziz *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2007). Des réactions similaires ont été observées chez la luzerne, le riz, le tabac et l'arabette (Aziz *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2007; Inui *et al.*, 1997; Klarzynski *et al.*, 2000; Lecourieux *et al.*, 2002; Ménard *et al.*, 2004).

Nous avons observé que les  $\beta$ -1,3-glucanes de curdlan n'induisent pas la production d' $H_2O_2$  extracellulaire sur les racines de *M.truncatula*, contrairement à ce qui est habituellement observé pour les oligo- $\beta$ -1,3-glucanes de laminarine sur d'autres espèces végétales comme *V.vinifera* ou *N.tabacum* (Aziz *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2007; Klarzynski *et al.*, 2000). Pourtant, les  $\beta$ -1,3-glucanes de curdlan sont capables d'induire l'expression des gènes relatifs à la défense, un gène codant pour la vestitone réductase (VR) et un gène codant pour un inhibiteur de protéase (PI) chez *M.truncatula*. Cela indique que l'induction de l'expression de gènes relatifs à la défense peut-être découplée de l'induction de la production de ROS extracellulaires. En conséquence, ce dernier marqueur n'est pas suffisant pour révéler la perception d'une molécule de type éliciteur.

Le bioessai développé dans cette étude a été utilisé pour mettre en évidence la perception de composés éliciteurs présents dans le milieu de culture d'*A.euteiches*. Il pourra être mis à contribution, au cours de l'étude des molécules sécrétées dans le milieu par *A.euteiches*, pour déterminer celles qui sont bioactives.



L'hypothèse selon laquelle la résistance quantitative à différents microorganismes pathogènes est conditionnée par des différences quantitatives ou cinétiques dans l'activation de la machinerie de défense de la plante par le microorganisme via les éliciteurs qu'il produit, a pu être mise en évidence dans certains cas pour des résistances partielles, comme par exemple dans l'interaction entre *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* et *A.thaliana* dont l'un des QTL s'est révélé être FLS2, le récepteur au MAMP flg22 de la flagelline (Ahmad *et al.*, 2011; Forsyth *et al.*, 2010). Les résultats des travaux de Valdés-López *et al.* (2011) montrent que les lignées de soja (*Glycine max*) dont la production de ROS et l'induction de gènes relatifs à la défense sont les plus intenses en réponse au peptide flg22 et à la chitine sont aussi les lignées dont le niveau de résistance à l'infection par *Sclerotinia sclerotiorum* est accrue. Sans mettre à mal cette hypothèse, les travaux de (Kröner *et al.*, 2011) y apportent une dimension supplémentaire. Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé l'oomycète biotrophe *P.infestans*, et la bactérie nécrotrophe *Pectobacterium atrosepticum*. L'induction des défenses de différents cultivars de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) en réponse aux filtrats de culture de ces deux microorganismes ainsi que le degré de résistance des cultivars à l'infection par ces agents pathogènes, ont été évalués. Dans le cas de *P.atrosepticum*, les auteurs ont observé une importante corrélation entre l'intensité de l'induction des défenses par le filtrat de culture et le degré de résistance pour les cultivars de pomme de terre utilisés. En revanche, les résultats obtenus pour *P.infestans* ne soutiennent pas l'idée que l'activation des défenses par la reconnaissance des MAMPs suffit à expliquer la résistance quantitative. Les auteurs expliquent cela par le mode de vie de *P.infestans* dont la croissance peut résulter en une fuite du microorganisme des tissus de la plante où la défense est activée (Vleeshouwers *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008).

C'est dans ce contexte que notre bioessai peut être exploité afin de révéler la présence de QTL d'intérêt. Le criblage de lignées de niveaux différents de résistance quantitative, contre des molécules provenant du microorganisme, peut permettre d'identifier les molécules clefs provenant du microorganisme, qui conduisent à l'activation efficace des défenses de la plante, et à la résistance. Ce sont les composés qui présenteront une capacité élicitrice divergente entre les lignées sensibles et résistantes qui pourront conduire à une meilleure compréhension de la résistance. Ce travail d'envergure est réalisable grâce au bioessai que nous proposons et à la possibilité de le coupler à d'autres



*Chapitre 1 : Un système expérimental pour étudier les réponses des racines de M.truncatula aux oligomères de chitine de degré de polymérisation élevé et autres éliciteurs microbiens*

méthodes ayant un haut débit, telles que de la RT-qPCR avec la technologie Fluidigm, en alternative à l'approche RT-qPCR classique que nous avons utilisée.



**CHAPITRE 2 : CARACTERISATION  
STRUCTURALE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DES  
CHITOSACCHARIDES D'*A.EUTEICHES***





## **INTRODUCTION**

Les polysaccharides de la paroi se structurent en deux parties, un squelette interne cristallin et un composant amorphe. Chez les oomycètes, le squelette cristallin est principalement constitué de fibrilles de cellulose associées à des  $\beta$ -1,3-glucanes (Bartnicki-Garcia, 1966; Jarvis, 2003; Nishiyama *et al.*, 2003). Le composant amorphe est constitué de polymères de glucose, dont les résidus sont liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,6, d'après les résultats obtenus sur la paroi de *Phytophthora*. Chez les champignons, les principaux polysaccharides structuraux des parois cellulaires sont des  $\beta$ -1,3- et  $\beta$ -1,6-glucanes et la chitine (Bartnicki-Garcia, 1966; Bartnicki-Garcia, 1968; Jarvis, 2003; Nishiyama *et al.*, 2003). La chitine est un polymère linéaire de *N*-acétyl-D-glucosamine (NAG) dont les résidus sont liés en  $\beta$ -1,4, dont le degré de polymérisation est élevé et qui peut adopter une structure cristalline. Le résidu NAG peut constituer également des polymères amorphes (chitosaccharides amorphes) ou des oligomères (chitooligosaccharides) (Roberts, 2008). Ces derniers peuvent être libérés de la paroi cellulaire après l'action de chitinases endogènes ou de chitinases de plantes hôtes (Boller, 1995; Fossdal *et al.*, 2006; Hartl *et al.*, 2012; Matsumoto, 2006).

Alors que les oomycètes sont généralement considérés comme des organismes celluloseux non chitineux, le dosage des sucres aminés a révélé de petites quantités d'hexosamines dans les hydrolysats de parois cellulaires de différents oomycètes, en particulier chez des espèces de *Phytophthora*, dont les parois contiennent une teneur en hexosamines souvent inférieure à 1% (Aronson, 1965; Aronson and Bertke, 1987; Bartnicki-Garcia, 1968; Sietsma *et al.*, 1969). L'hexosamine majeure a été identifiée comme de la NAG à la suite d'une hydrolyse enzymatique des parois par une chitinase et de l'analyse chromatographique des hydrolysats chez différentes espèces de Saprolegniales et Péronosporales (Dietrich, 1975; Sietsma *et al.*, 1969). Les auteurs de ces études ont suggéré que la NAG mesurée constitue de la chitine qui serait présente avec une teneur plus élevée chez les Saprolegniales (*Achlya* et *Saprolegnia*) que chez les Péronosporales (*Pythium*) (Sonia and Dietrich, 1973). Néanmoins, par définition, la chitine est de nature cristalline, et si cette structure a été détectée sans ambiguïté par cristallographie aux rayons X au sein de l'ordre des Saprolegniales (*Achlya* : (Campos-Takaki *et al.*, 1982) et *Saprolegnia monoica* : (Bulone *et*



*al.*, 1992)) et des Leptomitales (*Apodachlya* : (Lin and Aronson, 1970), *Leptomitus* : (Aronson and Lin, 1978) et *Apodachlyella* : (Bertke and Aronson, 1980)), elle n'a jamais été mise en évidence chez les Péronosporales (Bulone *et al.*, 1992).

L'étude de la paroi d'*A.euteiches* réalisée au sein de l'équipe IPM (UMR5546 CNRS-UPS, Toulouse) a révélé la présence d'une proportion élevée de NAG dans sa paroi. En effet, la NAG constitue 10% des sucres pariétaux, ce qui n'a jamais été observé avant chez un oomycète (Badreddine *et al.*, 2008). L'analyse de sa paroi par diffraction des rayons X n'a pas révélé la présence de chitine cristalline, et aucune tentative d'extraction n'a permis d'en obtenir de la chitine. La comparaison des spectres RMN de la paroi d'*A.euteiches* analysés en condition sèche ou humide a révélé que le matériel contenant de la NAG est amorphe. Ainsi, ces composés contenant de la NAG ne présentent pas une structure cristalline. Néanmoins, l'utilisation de la Nikkomycine Z, un inhibiteur des chitines synthèses, altère la croissance du microorganisme (Badreddine *et al.*, 2008). La croissance d'*A.euteiches* sur Nikkomycine Z conduit à l'éclatement de l'apex des hyphes, suggérant que la synthèse de la paroi à l'extrémité des hyphes est affectée. Cela indique que les chitosaccharides ont un rôle structural dans la paroi en étant potentiellement liés aux autres glucanes structuraux. À cela s'ajoute que ces chitosaccharides sont exposés, au moins pour partie, à la surface de la paroi d'*A.euteiches* tout au long de son cycle, et sont donc accessibles pour être perçus par la plante. Les chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches* présentent donc des caractéristiques qui peuvent en faire une source potentielle de MAMPs. Inversement, leur abondance dans la paroi et leur exposition pourrait correspondre à un rôle de camouflage de MAMPs présents dans les molécules sous-jacentes (Aslam *et al.*, 2008; Fujikawa *et al.*, 2012).

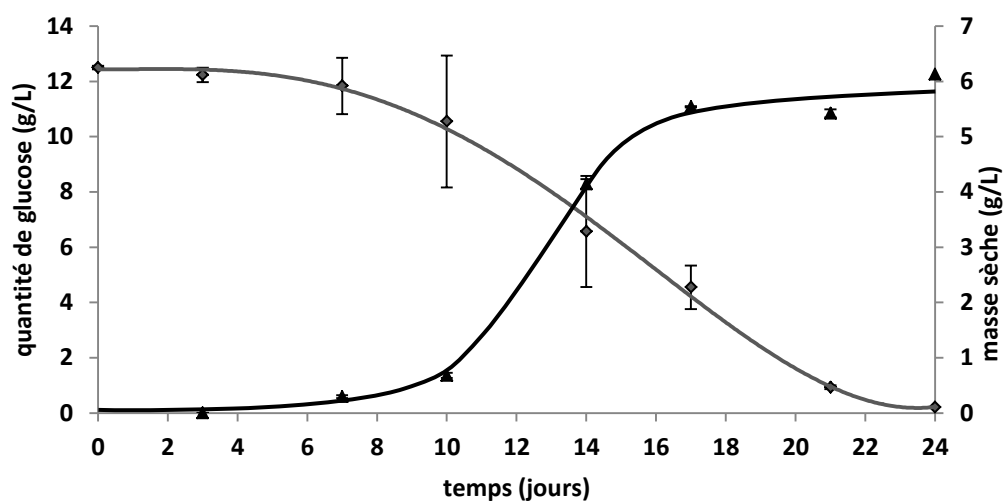
Afin de pouvoir étudier l'activité biologique des chitosaccharides pariétaux d'*A.euteiches*, il est nécessaire de procéder à leur extraction de la paroi et de les purifier. L'extraction de polysaccharides des parois de microorganismes est effectuée soit à l'aide d'une hydrolyse chimique, soit par une hydrolyse enzymatique. Les méthodes chimiques présentent l'avantage de ne pas restreindre l'hydrolyse des liaisons entre les sucres, quelle que soit l'anométrie du carbone n°1,  $\alpha$  ou  $\beta$ , et du carbone lié, n°2, n°3, n°4 ou n°6 pour les hexoses. Ce type d'approche a notamment été employé dans les travaux de Sharp *et al.*, (1984) concernant la purification de l'heptaglucone à partir de la paroi de *Phytophthora megasperma*. Au contraire, une hydrolyse enzymatique est limitée à l'anométrie,  $\alpha$  ou  $\beta$ , au



## Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches*

type de liaisons, 1->2, 1->3, 1->4 ou 1->6, ainsi qu'à l'accessibilité de ces liaisons. Elle demande aussi d'obtenir les enzymes nécessaires et surtout d'éliminer par la suite les protéines apportées pour réaliser l'hydrolyse, dans le cas d'étude d'activité biologique des produits de l'hydrolyse. L'approche par hydrolyse enzymatique est la seule que nous puissions envisager afin d'hydrolyser spécifiquement les glucanes et conserver l'intégrité des chitosaccharides. Nous pouvons supposer qu'en utilisant ce type d'approche, nous sommes en mesure d'obtenir des fragments de la paroi du microorganisme qui peuvent être libérés au cours de l'interaction avec la plante, ce qui est un aspect non négligeable lorsque l'on s'intéresse à l'activité biologique des molécules qui sont issues de l'hydrolyse.

Dans ce chapitre, une étude sur les chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches* sera présentée. Dans un premier temps leur purification sera exposée, puis la structure de ces composés sera analysée par des méthodes biochimiques et biophysiques. Dans un deuxième temps, leur activité biologique chez *A.thaliana* et *M.truncatula*, ainsi que l'implication du récepteur NFP, sera étudiée à l'aide de bioessais incluant le bioessai développé au chapitre précédent.



**Figure 2.1 : Courbe de croissance d'*Aphanomyces euteiches* et de consommation du glucose en milieu synthétique**

(◆) Cinétique de consommation du glucose du milieu (g/L). (▲) Cinétique de l'accumulation de mycélium (masse sèche en g). Les données présentées sont la moyenne de trois réplicats biologiques  $\pm$  SE.

## **1. CARACTERISATION STRUCTURALE :**

### **1.1. PREPARATION ET CARACTERISATION DES PAROIS MYCELIENNES**

#### **1.1.1. Culture d'*Aphanomyces euteiches* en milieu synthétique**

Dans la précédente étude qui a été menée par Badreddine *et al.*, (2008) sur la paroi d'*A.euteiches*, le microorganisme était cultivé en milieu complexe à base de glucose et d'extrait de levure. D'après la description du fabricant, l'extrait de levure est un extrait soluble obtenu par l'hydrolyse de cellules de levure, et contient des acides aminés, des peptides, des vitamines ainsi que des sucres. L'analyse par HPAEC-PAD de l'extrait de levure, que nous avons effectuée, a révélé qu'il contient 2.5% de NAG sous forme d'oligomères. Ces oligomères sont probablement issus de la chitine de levure. Etant donné qu'*A.euteiches* germe et se développe dans ce milieu, nous pouvons imaginer que des COs de levure ont la possibilité de s'adsorber à la paroi du microorganisme. Cela peut conduire à la co-purification de COs de chitine de levure combinés à des chitosaccharides produits par *A.euteiches*.

Dans le but de s'affranchir de ce risque, nous avons utilisé un milieu synthétique pour la culture d'*Aphanomyces*, dérivé du milieu mis au point par Papavizas et Ayers en 1964 (Papavizas and Ayers, 1964). Dans ce milieu, la principale source de carbone est le glucose, l'azote et le soufre proviennent de l'acide glutamique et de la méthionine, et le phosphate provient du phosphate de sodium et potassium permettant de tamponner le milieu à pH 6.2.

Le suivi de la consommation du glucose du milieu ainsi que de la biomasse sèche générée est effectué sur 24 jours de culture (**Figure 2.1**). On observe qu'environ 90% du glucose est consommé à 21 jours, ce qui corrèle avec l'apparition d'un plateau dans la croissance du microorganisme. Le mycélium est récolté après 21 jours de culture et congelé à -80°C.

**Tableau 2.1 : Rendement des parois brutes**

	exp 1	exp 2	exp 3
<b>Quantité (mg)</b>	4200	4300	2800
<b>Rendement d'obtention (%) <sup>a</sup></b>	14,5	15,3	13,7

<sup>a</sup> Le rendement d'obtention des parois brutes est calculé à partir de la quantité de mycélium sec d'origine.

**Tableau 2.2 : Composition des parois brutes**

Composition (mg/g)	exp 1	exp 2	moyenne (mg/g)
<b>Glucose</b>	560	590	575 ± 21.2
<b>Hexosamines</b>	85	97	91 ± 8.5
<b>Protéines</b>	285	255	270 ± 21.2
<b>Somme</b>	930	942	936 ± 8.5

Les moyennes sont présentées ± écart-type.

**Tableau 2.3 : Rendements des parois PAW et PAW-NaOH**

	Rendements (%)	exp1	exp2	exp3	Moyenne
<b>Parois PAW</b>	<b>rendement d'obtention</b>	73.8	62.7	53.0	64.4 ± 10
	<b>glucose</b>	107.4	90.5	ND	93.4 ± 15
	<b>Hexosamines</b>	104.2	90.6	ND	91.7 ± 14
	<b>protéines</b>	15.8	12.8	ND	13.5 ± 2
<b>Parois PAW-NaOH</b>	<b>rendement d'obtention</b>	21.7	21.7	29.3	23.5 ± 4
	<b>glucose</b>	35.2	33.0	ND	37.4 ± 7
	<b>NAG</b>	34.7	26.4	ND	34 ± 9
	<b>protéines</b>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	ND	0.0 <sup>a</sup>

Les rendements présentés sont calculés à partir des quantités présentes dans les parois brutes à l'origine. Les rendements d'obtention sont calculés à partir du poids sec des parois brutes. Les moyennes sont présentées ± écart-type. <sup>a</sup> 0,0 : Inférieur au seuil de détection.



### 1.1.2. Extraction et purification de la paroi

Trois cultures indépendantes de mycélium ont été réalisées, ce qui représente en totalité une culture d'environ 300 fioles de Roux, soit environ 1 Kg de mycélium frais. Le mycélium est broyé dans l'azote liquide, puis les parois sont lavées à plusieurs reprises dans un tampon phosphate, ce qui a pour objectif d'éliminer le contenu cytoplasmique du mycélium. Les lipides sont ensuite éliminés par un traitement avec une solution de méthanol et chloroforme durant 20 minutes, puis les parois sont lavées à plusieurs reprises à l'eau. Nous obtenons alors les « parois brutes » dont le rendement moyen est 14.5% du poids sec du mycélium d'origine (**Tableau 2.1**). Ces parois brutes contiennent une forte proportion de protéines, ce qui suggère qu'elles contiennent des protéines liées à la paroi, et qu'elles sont encore contaminées par du cytoplasme (**Tableau 2.2**).

Lors de l'étude précédente de la paroi d'*Aphanomyces* (Badreddine *et al.*, 2008), les parois brutes d'*A.euteiches* étaient déprotéinisées par traitements avec une solution de méthanol et d'hydroxyde de potassium à chaud, 10 minutes à 80°C. Bien que ce traitement soit efficace pour éliminer les protéines, cette méthode était employée par Aronson and Bertke (1987) dans le but de purifier et quantifier les composés cristallins, entraînant potentiellement la perte de quantités importantes de polysaccharides amorphes, parmi lesquels peuvent se trouver des chitosaccharides d'intérêt. Nous avons donc opté pour une méthode plus douce, pour l'élimination des protéines, avec une solution de phénol, d'acide acétique et d'eau (PAW), telle que décrite par (Selvendran *et al.*, 1985). Au cours d'essais préliminaires, nous avons observé que cette méthode est plus efficace pour éliminer des protéines que le traitement par le déoxycholate (DOC), et ne présente pas le risque de désacétyler la NAG comme le traitement MeOH-KOH, précédemment utilisés par Badreddine *et al.* (2008). Le traitement PAW nous permet d'éliminer des protéines non-covalamment liées à la paroi, tout en conservant la quasi-totalité du glucose et des hexosamines (**Tableau 2.3**). Néanmoins, à l'issue de ce traitement, les parois obtenues, appelées « parois PAW », contiennent encore de 11 à 15% des protéines initiales. Elles seront utilisées pour des caractérisations préliminaires par RMN et hydrolyse enzymatique (voir paragraphe 1.1.3) mais doivent être encore déprotéinisées avant d'entamer la purification de chitosaccharides.

**Tableau 2.4 : Composition des parois PAW et PAW-NaOH**

	<b>Composés (mg/g)</b>	<b>exp1</b>	<b>exp2</b>	<b>moyenne</b>
<b>Parois PAW</b>	<b>glucose</b>	815	850	832 ± 25
	<b>NAG</b>	120	140	120 ± 14
	<b>protéines</b>	61	52	57 ± 6
	<b>somme</b>	996	1042	1019 ± 32
<b>Parois PAW- NaOH</b>	<b>glucose</b>	907	905	906 ± 1
	<b>NAG</b>	135	117	126 ± 12
	<b>protéines</b>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
	<b>somme</b>	1042	1022	1032 ± 14

Les moyennes sont présentées ± écart-type. <sup>a</sup> 0,0 : Inférieur au seuil de détection.

Les protéines restantes sont donc éliminées par un traitement au NaOH 1 M à température ambiante. Ce traitement permet d'éliminer des protéines qui seraient covalamment liées à la paroi et permet d'éviter une association irréversible des protéines sur les polysaccharides par la suite, qui pourrait se produire, par exemple, pour les protéines à domaine « Carbohydrate Binding Motif » (CBM), ou pour les « glucan-binding domains » comme dans les glycohydrolases. La soude est ensuite éliminée par plusieurs lavages successifs à l'eau désionisée. La quantité de protéines atteint ainsi un seuil non détectable. Mais nous observons une perte de masse globale de plus de 70% certainement à cause du phénomène de  $\beta$ -élimination causée par la soude (**Tableau 2.3**), tout en conservant néanmoins les mêmes proportions d'hexosamines et de glucose (**Tableau 2.4**).

Les parois ainsi obtenues sont nommées « PAW-NaOH ». Trois lots de parois indépendants ont été ainsi préparés et traités, sauf indication contraire, séparément dans la suite de ces travaux.



### 1.1.3. Caractérisation de la paroi

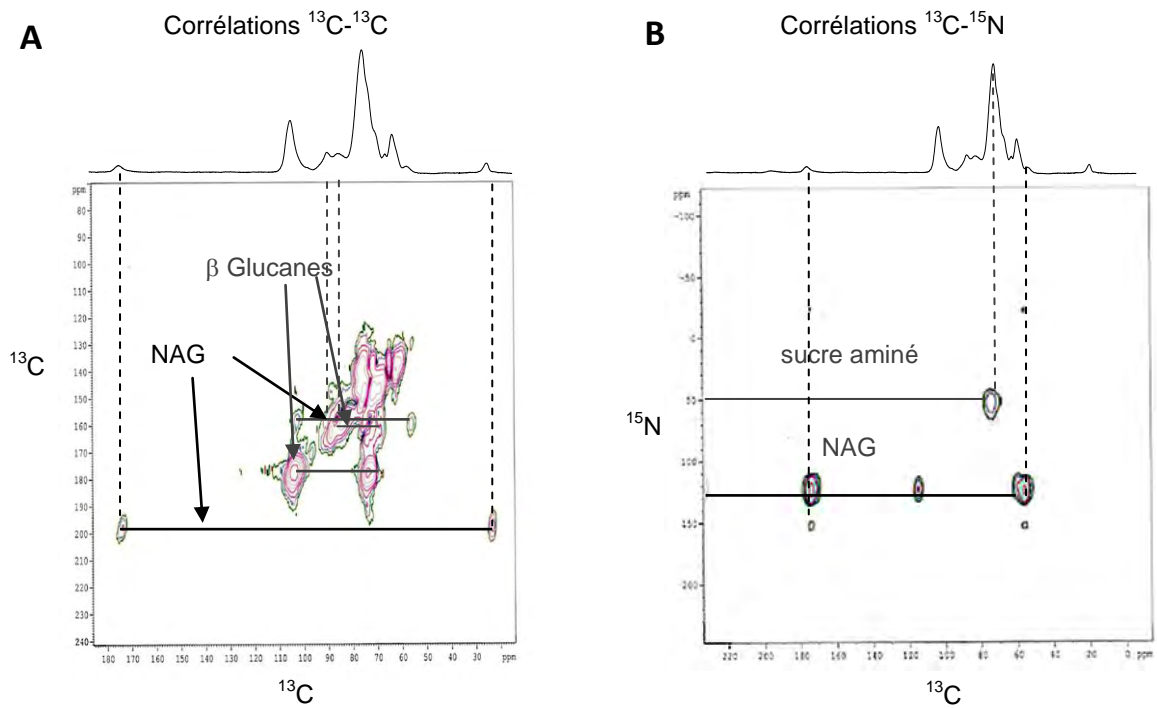
Une fois les parois extraites et débarrassées de l'essentiel des protéines liées covalamment, notre objectif a été de préciser la nature des hexosamines et de déterminer les liaisons glycaniques impliquant les chitosaccharides dans la paroi. Pour cela, deux méthodes complémentaires ont été utilisées. Une approche par résonance magnétique nucléaire (en collaboration avec le CERMAV de Grenoble) nous a permis d'obtenir des informations sur la nature des composés présents dans les parois et leur organisation. Une approche par hydrolyse enzymatique nous a donné des informations à la fois complémentaires et confirmatoires permettant de mettre en évidence certaines interconnexions entre les polymères de la paroi ainsi que leur accessibilité aux enzymes.

#### 1.1.3.1. Approche par Résonance Magnétique Nucléaire du solide

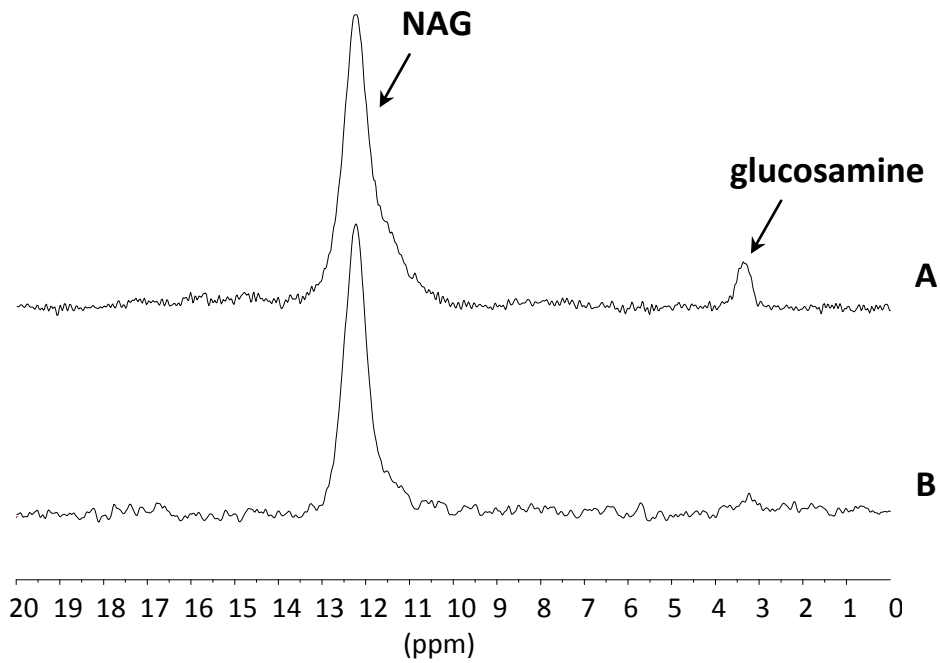
L'intérêt d'utiliser la RMN du solide dans le contexte de cette étude est de travailler sur des parois entières et non solubilisées, et ainsi d'identifier *in-situ* les espèces d'intérêt avant hydrolyse et purification. La limitation de cette méthode est cependant sa faible résolution qui ne permet pas d'affirmer de manière définitive la présence d'une molécule. Pour cette expérience, le milieu de culture d'*A.euteiches* a été préparé en utilisant des substrats marqués  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ , ce qui a permis d'améliorer la qualité des signaux de RMN.

Des travaux préliminaires sur parois entières avaient permis de proposer la présence de chitosaccharides au sein de la paroi d'*A.euteiches* sous une forme non-cristalline, excluant leur organisation sous forme de chitine (Badreddine *et al.*, 2008). L'analyse est cependant rendue difficile en raison de la complexité des signaux, en particulier le recouvrement très fort des contributions des polysaccharides.

Pour progresser dans la compréhension de ces parois, nous avons procédé à l'analyse par RMN bidimensionnelle des parois PAW non hydrolysées. Ces expériences, qui reposent sur la détection du couplage covalent entre deux atomes, permettent d'identifier formellement la présence d'une liaison covalente entre deux signaux qui ont été identifiés en RMN monodimensionnelle sur des parois PAW obtenues à partir de mycélium cultivé avec du glucose marqué  $^{13}\text{C}$  et du glutamate marqué  $^{15}\text{N}$ . Nous avons procédé à deux types d'expériences : les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  qui permettent d'avoir des informations sur les



**Figure 2.2 : Spectres de RMN 2D (bidimensionnelles) des parois PAW**  
**A :** Corrélation  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  (INADEQUATE). **B :** Corrélation  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  (Double-CP).



**Figure 2.3 : Spectre RMN  $^{15}\text{N}$  CP-MAS**  
**A :** de parois PAW, et **B :** d'un hydrolysate de parois.

squelettes saccharidiques, et les corrélations  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  spécifiques aux sucres aminés (**Figure 2.2**).

La carte 2D  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  permet de mettre en évidence, entre autres, deux corrélations importantes pour l'attribution des signaux (**Figure 2.2.A**). La première se fait entre les carbonés C=O résonnant à 175 ppm environ et  $\text{CH}_3$  à 27 ppm. Cette corrélation confirme l'attribution de ces deux signaux à des fonctions *N*-acétyl. La seconde se fait entre les C1 aux environs de 105 ppm et un signal à 56 ppm. Cette corrélation confirme la présence de sucres aminés (Heux *et al.*, 2000). Les autres corrélations confirment la présence de  $\beta$ -1,3- et  $\beta$ -1,4-glucanes qui sont majoritaires au sein de la paroi. Les autres types de liaisons sont de fait plus difficiles à mettre en évidence avec cette expérience.

Bien que cette information soit importante, elle ne permet pas de trancher sur la nature des sucres aminés. La corrélation  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  permet de mettre en évidence deux types de liaisons à l'azote dans les parois (**Figure 2.2.B**). Les deux corrélations du signal  $^{15}\text{N}$  à 125 ppm aux signaux à 105 et 56 ppm confirment que les unités *N*-acétyl sont bien celles de la *N*-acetyl glucosamine. La corrélation du signal  $^{15}\text{N}$  aux environs de 50 ppm à un groupe de signaux aux alentours de 70 ppm, appartient à un sucre portant une amine primaire, très probablement de la glucosamine.

Pour vérifier si les sucres aminés autres que la NAG étaient éliminés au cours des étapes ultérieures de purification et hydrolyse des parois, nous avons procédé à une analyse comparative par RMN du solide  $^{15}\text{N}$  des parois PAW et d'un hydrolysate obtenu après l'action d'un mélange de glycohydrolases (cf. paragraphe 1.2 de ce chapitre) (**Figure 2.3**). Alors qu'un signal intense correspondant à la NAG est détecté dans les deux échantillons, nous observons qu'un signal minoritaire (environ 4% du total) correspondant à la glucosamine est éliminé par la purification. Cela suggère que la glucosamine détectée dans les parois PAW est relative à des glycoprotéines pariétales qui n'ont pas encore été éliminées par le traitement au NaOH.

En conclusion, ces analyses confirment et étendent les interprétations de (Badreddine *et al.*, 2008), à savoir que les hexosamines de la paroi d'*A.euteiches* sont majoritairement sous forme de NAG et que les chitosaccharides solubilisés par l'action de glycanases sur des parois déprotéinisées ne contiennent pas de glucosamine.

**Tableau 2.5 : Activités spécifique des enzymes utilisées**

Origine	Dénomination	Activité spécifique (U/mg de protéines)
Culture cellulaire de tabac BY2	$\beta$ -1,3-endoglucanase	1.2
	$\beta$ -1,4-glucanase	1.2
	endochitinase	0.4
	exochitinase	0.5
Cellulase (Megazyme)	$\beta$ -1,4-endoglucanase	80 <sup>a</sup>
Westase (Takara)	$\beta$ -1,3-exoglucanase	0.7
	$\beta$ -1,6-endoglucanase	2

1U = quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 1  $\mu$ mol de substrat en 1 min, à 40°C.

<sup>a</sup> activité enzymatique à 40°C donnée par le fabricant.



### 1.1.3.2. Approche par hydrolyse enzymatique

Dans cette approche, il s'agit d'hydrolyser spécifiquement un type de liaison glycanique dans la paroi, puis de déterminer la quantité de chitosaccharides qui ont été libérés de la paroi. Les chitosaccharides sont quantifiés par le dosage de la NAG totale dans le surnageant et dans le culot par HPAEC-PAD (High-Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection).

La première phase de ce travail a consisté à préparer des sources enzymatiques dotées d'un seul type d'activité hydrolytique, lorsque celles-ci n'étaient pas commercialement disponibles. Une chitosanase a été achetée chez Sigma-Aldrich (Chitosanase from *Streptomyces griseus*) et utilisée en l'état.

Pour la plupart des autres enzymes nécessaires, des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum* BY2, gracieusement fournies par Christian Mazars (UMR 5546 CNRS/UPS, LRSV), ont été utilisées comme matériel de départ. En effet, ces cultures cellulaires, sont une source abondante d'enzymes hydrolytiques (C.Laffite, communication personnelle). Nous avons obtenu de ce matériel biologique des extraits à activité exclusive endochitinase, exochitinase,  $\beta$ -1,3-endoglucanase et  $\beta$ -1,4-glucanase (**Tableau 2.5**).

L'activité  $\beta$ -1,6-endoglucanase n'est pas connue chez les plantes. Celle-ci a été apportée par un extrait enzymatique commercial, la Westase<sup>®</sup> du fabricant TAKARA, qui contient également une activité  $\beta$ -1,3-exoglucanase. Cette préparation enzymatique est obtenue par le fabricant à partir de *Streptomyces rochei*. De la Westase<sup>®</sup>, nous avons purifié séparément la  $\beta$ -1,6-endoglucanase et la  $\beta$ -1,3-exoglucanase.

La nature des activités enzymatiques a été déterminée en réalisant une incubation sur 1 h avec un substrat adapté insoluble. Les sucres solubilisés sont quantifiés après hydrolyse chimique, permettant la dépolymérisation des sucres solubilisés, par HPAEC-PAD. Nous avons aussi déterminé si les sucres libérés étaient des monomères, dimères ou des fragments plus grands, en réalisant une analyse HPAEC-PAD sans hydrolyse chimique préalable. Cette information nous a renseigné sur l'activité endo- ou exo-glycanase de l'enzyme considérée. Les activités spécifiques de ces préparations enzymatiques sont présentées dans le **Tableau 2.5**.

**Tableau 2.6 :** Pourcentage d'hexosamines libérées à partir des parois PAW par des enzymes purifiées

hexosamines libérées après endochitinase	6.7 ± 3
hexosamines libérées après exochitinase	21.8 ± 17
hexosamines libérées après $\beta$ -1,4-endoglucanase	8 ± 1
hexosamines libérées après $\beta$ -1,3-endoglucanase	12.2 ± 9
hexosamines libérées après $\beta$ -1,6-endoglucanase	96.2 ± 1

Les valeurs présentées sont la moyenne de deux expériences indépendantes  $\pm$  écart-type.

Des parois PAW ont été hydrolysées pendant 24 h avec chacune des enzymes purifiées. Les hydrolyses ont été effectuées séparément sur les deux des trois lots de parois précédemment obtenus. Les quantités de NAG libérées par chaque hydrolyse enzymatique sont présentées dans le **Tableau 2.6**. La chitosanase n'a eu aucun effet sur les parois PAW (non montré), comme déjà observé par (Badreddine *et al.*, 2008) sur des parois extraites au méthanol-chloroforme. Nous observons que l'action de l'endochitinase n'a pour effet de libérer en moyenne que 6.7% des hexosamines de la paroi, tandis que l'exochitinase a libéré en moyenne 21.8% ( $\pm 17\%$ ) des hexosamines. Les chitinases sont en mesure de dégrader ou libérer plus de 22% des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches*, ce qui indique une proportion importante de liaisons  $\beta$ -1,4-NAG présentes ou accessibles. La  $\beta$ -1,4-endoglucanase a libéré dans le surnageant en moyenne 8% des hexosamines, ce qui indique que 8% des chitosaccharides sont liés à des polymères de glucose contenant des liaisons  $\beta$ -1,4. De même, la  $\beta$ -1,3-endoglucanase a libéré en moyenne 12.2% des hexosamines, ce qui indique que 12.2% des chitosaccharides sont liés à des polymères de glucose contenant des liaisons  $\beta$ -1,3. De façon intéressante, l'hydrolyse de la paroi à l'aide de la  $\beta$ -1,6-endoglucanase a libéré en moyenne 96.2% des hexosamines. Ce dernier résultat signifie que les chitosaccharides sont principalement impliqués dans des liaisons covalentes avec des polymères de glucose contenant des liaisons  $\beta$ -1,6-glucanes, dans la paroi d'*A.euteiches*.

## 1.2. PREPARATION ET CARACTERISATION DES CHITOSACCHARIDES

### 1.2.1. Extraction et purification

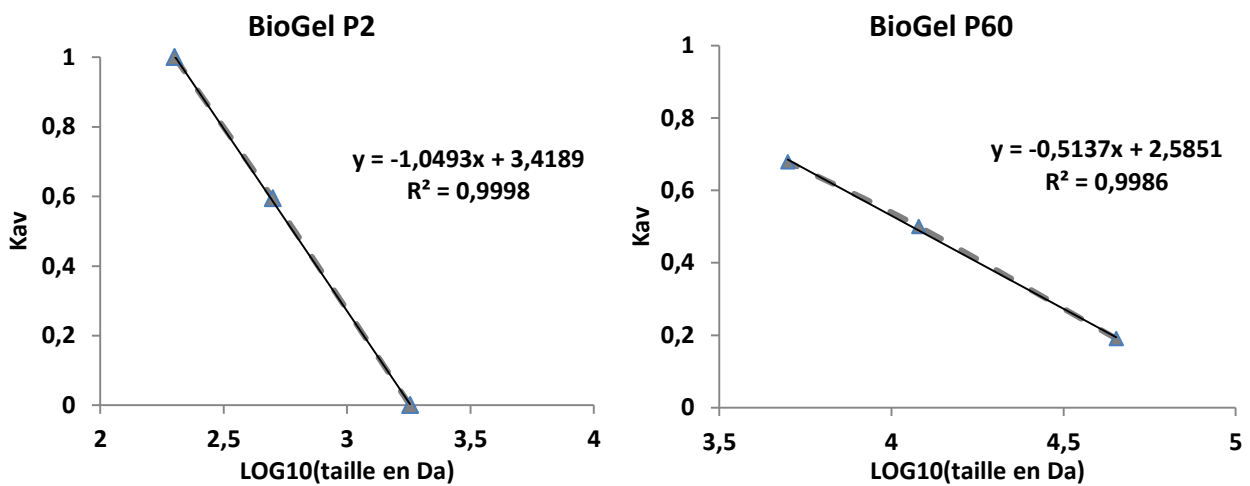
L'objectif a été de purifier les chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches* afin d'en étudier la structure ainsi que l'activité biologique. Nous avons donc souhaité libérer les chitosaccharides et éliminer au maximum les glucanes auxquels ils sont liés. L'extraction a été effectuée en utilisant une approche enzymatique, la seule permettant potentiellement d'atteindre notre objectif. Les résultats précédents nous ont indiqué que la présence d'une  $\beta$ -1,6-endoglucanase est indispensable pour extraire les chitosaccharides. Cette activité enzymatique n'a jamais été observée chez les plantes, néanmoins elle a pu être mise en évidence dans le milieu de culture d'*A.euteiches*, avec une activité spécifique moyenne de  $0.82 \pm 0.035$  pKat/ $\mu$ g à 6 jours de croissance en milieu glucose-extrait de levure (Badreddine



*et al.*, non publié). Ainsi, notre approche enzymatique peut aussi se rapprocher d'une réalité biologique

Un mélange enzymatique a été constitué avec les activités enzymatiques purifiées à partir de cellules de tabac BY2, soit la  $\beta$ -1,3- et  $\beta$ -1,4-glucanase, auxquelles est ajoutée une source commerciale de  $\beta$ -1,4-endoglucanase, la cellulase de *Bacillus amyloliquefaciens* de Megazyme, afin d'obtenir une meilleur efficacité d'hydrolyse des glucanes. A cause de contaminants contenant de fortes quantités de mannose, que nous avons retrouvés dans des échantillons de chitosaccharides en fin de purification lors d'expériences préliminaires, la Westase<sup>®</sup> n'a été utilisée qu'après une purification sur colonne échangeuse d'anions, à l'issue de laquelle nous avons obtenu la préparation notée westase-DEAE contenant les activités  $\beta$ -1,3-exoglucanase et  $\beta$ -1,6-endoglucanase d'activité spécifique 0.5 et 1.6 U/mg respectivement. Les activités enzymatiques purifiées des cellules de tabac BY2, la cellulase de Megazyme et la Westase-DEAE ont été combinées pour réaliser l'hydrolyse des parois d'*A.euteiches*. Ce mélange enzymatique contenait toutes les activités glucanases nécessaires pour hydrolyser les glucanes et était dépourvues d'activité chitinase.

Les parois PAW-NaOH ont été mises en suspension dans un tampon acétate et dispersées par une étape de sonication. Les trois lots de parois PAW-NaOH ont été hydrolysés indépendamment par le mélange enzymatique. Entre 820 et 920 mg de parois ont été hydrolysés pour chaque lot. Les hydrolyses ont été réalisées dans les conditions décrites en **Matériel et Méthodes 1.3.4**. Après 20 h d'hydrolyse, un prélèvement sur plusieurs tubes d'hydrolyse a été effectué, permettant de déterminer l'avancement de l'hydrolyse, par dosage de la quantité de chitosaccharides libérés dans le surnageant. Ce contrôle a été effectué pour les trois lots d'hydrolyse. Nous estimons que 92 à 95% des chitosaccharides ont été libérés dans le surnageant. Pour chaque lot d'hydrolyse le surnageant d'un échantillon a été à nouveau incubé en présence d'enzymes fraîches. Le glucose total et le glucose monomérique présents dans le surnageant après la seconde hydrolyse ont été dosés. La seconde hydrolyse n'a pas libéré davantage de glucose, ce qui indique que la réaction d'hydrolyse est terminée dès la fin de la première hydrolyse (résultats non montrés). La partie de la paroi qui n'a pas été hydrolysée est éliminée par centrifugation, puis les enzymes sont dénaturées par une étape de chauffage à 100°C au



**Figure 2.4 : Courbes de calibration des colonnes de filtration moléculaire BioGel P2 et BioGel P60**

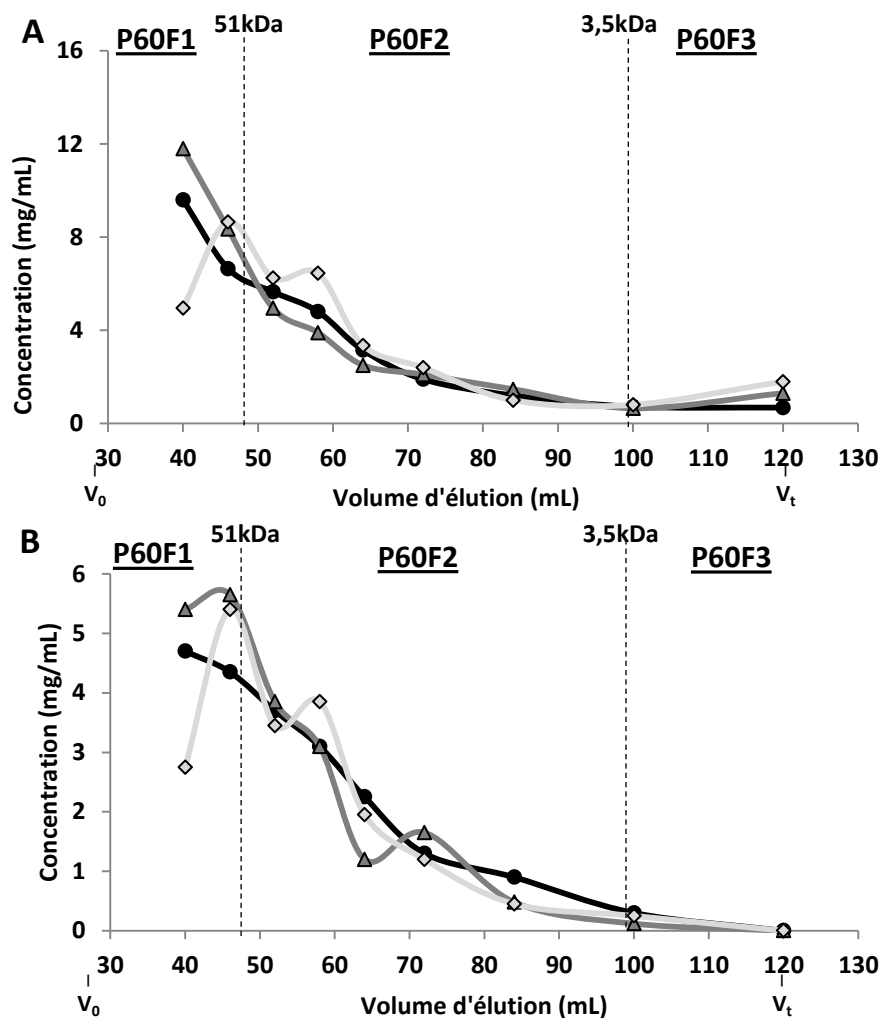
La colonne de filtrations moléculaire BioGel P60 est calibrée à l'aide de dextrans 5 kDa, 12 kDa et 45 kDa, et la BioGel P2 avec des dextrans de 0.2 kDa, 0.5 kDa et 1.8 kDa.

bain-marie, ce qui entraîne la précipitation de la majeure partie d'entre elles, qui sont alors éliminées par centrifugation.

Au cours d'essais préliminaires, nous avons observé que l'hydrolyse des glucanes n'est pas totale, et que nous obtenons aussi des fragments de tailles importantes. La gamme de taille obtenue va du monomère à des polymères de plusieurs dizaines de kDa. Une étape préliminaire de séparation des glycanes de petite et de grande taille permet d'améliorer significativement la qualité de séparation sur colonne de filtration moléculaire, comme nous l'avons constaté sur les essais préliminaires. Cette étape de séparation est réalisée, après réduction des volumes des hydrolysats, par une précipitation en ajoutant 9 volumes de méthanol et une incubation de 12 h à -20°C. Nous obtenons ainsi pour chaque hydrolysat un nouveau culot et un nouveau surnageant.

Les polymères des culots méthanoliques ont été séparés sur une colonne de filtration moléculaire adaptée pour les polymères de grande taille, le BioGelP60. Celui-ci sépare les molécules de tailles comprises entre 3 kDa à 60 kDa. Tandis que ceux des surnageants méthanoliques ont été séparés sur BioGelP2 adapté pour des petites tailles, séparant les molécules de tailles comprises entre 100 Da à 1.8 kDa.

Il est connu que les polysaccharides ne se comportent pas de la même façon que les protéines globulaires sur les colonnes de filtration moléculaire. Or les courbes étalons du fabricant des colonnes de filtration moléculaire BioGelP60 et BioGelP2 sont réalisées à l'aide de protéines globulaires. Nous avons donc procédé à leur étalonnage en utilisant des dextrans linéaires de tailles définies, afin de pouvoir calculer les tailles théoriques des fragments de parois d'*A.euteiches* séparés sur ces colonnes :  $K_{av} = f(\log(\text{taille en Da}))$ , avec  $\log(K_{av}) = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$  où  $K_{av}$  est le coefficient de partage,  $V_e$  est le volume d'élution de la molécule considérée,  $V_0$  est le volume mort de la colonne et  $V_t$  est le volume total de la colonne. Nous obtenons les équations  $Y = -0.5137x + 2.5851$  avec un  $R^2 = 0.9986$  pour la BioGelP60 et  $Y = -1.0493x + 3.4189$  avec un  $R^2 = 0.9998$  pour la BioGelP2 (**Figure 2.4**). Ces équations nous permettent par la suite de déterminer les gammes de tailles théoriques des fractions issues des colonnes de filtration moléculaire BioGelP60 et BioGelP2.



**Figure 2.5 : Chromatographie des chitosaccharides sur colonne BioGel P60**

Les chitosaccharides ont été solubilisés par hydrolyse des parois PAW-NaOH par un mélange de  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,6-glucanases. Après précipitation au méthanol, les culots sont analysés sur colonne Biogel P60.  $V_0$  : Volume mort, déterminé avec du dextran 200 kDa.  $V_t$  : Volume total de la colonne. Les fractions P60F1, P60F2 et P60F3 sont délimitées par les lignes verticales discontinues. L'expérience est réalisée trois fois sur des préparations de parois indépendantes. (● : expérience 1 ; ▲ : expérience 2 ; ◇ : expérience 3). **A** : Profil d'élution du glucose. **B** : Profil d'élution de la NAG. Les concentrations en glucose et NAG sont déterminées par chromatographie HPAEC-PAD.

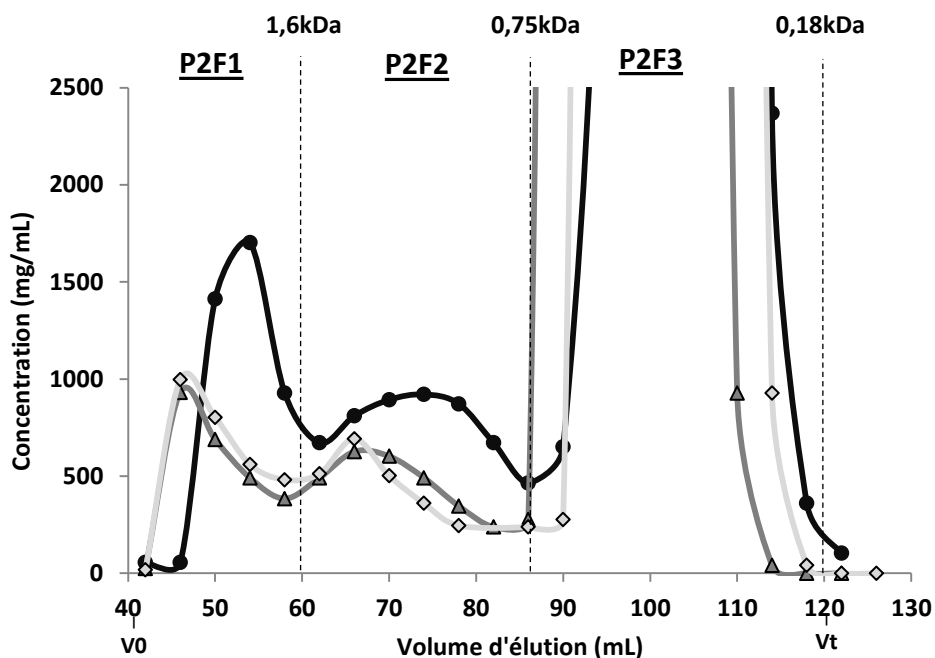
**Tableau 2.7 : Correspondances entre masse moléculaire et degré de polymérisation (DP) pour les fractions de paroi d'*A.euteiches***

Fractions	P60F1	P60F2	P60F3	P2F1	P2F2	P2F3
Gamme de masse moléculaire (kDa)	>51	51-3,5	<3,5	>1,6	1,6-0,75	0,75-0,18
DP théorique en NAG	>230	230-16	<16	>8	8-4	<4
DP théorique en glucose	>283	283-20	<20	>9	9-5	<5



Les culots méthanoliques ont été séparés individuellement sur la colonne de BioGelP60, à l'issue de laquelle des fractions de 2 mL ont été collectées. Le glucose et les hexosamines ont été dosés par HPAEC-PAD après hydrolyse sur une collection de fractions de 2 mL. Comme montré par les analyses RMN (paragraphe 1.1.3.1), la nature des hexosamines des hydrolysats enzymatiques de paroi est la NAG, et donc on attribuera à la NAG les résultats de dosages par HPAEC-PAD des hexosamines libérées après hydrolyse chimique des fractions issues des hydrolysats enzymatiques. Les profils chromatographiques de concentration en glucose et NAG correspondant aux trois lots de parois hydrolysées sont présentés sur la (**Figure 2.5**). Nous observons des profils similaires avec des quantités décroissantes du début à la fin des profils. On note pour le profil de la quantité de glucose un épaulement autour de 58 mL et un minimum atteint à 100 mL, pour les trois séries. Pour le profil de la NAG, nous observons une évolution parallèle jusqu'à 100 mL, avec quelques fluctuations entre 52 mL et 85 mL, et nous passons sous la limite de détection à partir de 100 mL.

Trois fractions ont été définies en fonction des tailles théoriques calculées et des zones qui se profilent sur ces courbes. La première se situe de 30 à 50 mL, la seconde de 51 à 100 mL et la troisième de 101 à 130 mL. A l'aide des équations précédemment obtenues, nous pouvons déterminer que la première zone de fractionnement de 30 à 50 mL correspond à des polysaccharides de tailles supérieures à 51 KDa, soit des polymères de grande taille correspondant à un équivalent de plus de 230 résidus de NAG, ou de plus de 283 résidus de glucose (**Tableau 2.7**). La seconde zone de fractionnement de 51 à 100 mL correspond à des sucres de tailles comprises entre 51 KDa et 3.5 KDa, soit des polymères compris entre 230 et 16 résidus de NAG ou 283 et 20 résidus de glucose. La troisième zone de fractionnement de 101 à 130 mL correspond à des tailles inférieures à 3.5kDa, soit inférieures à un équivalent de 16 résidus de NAG, ou 20 résidus de glucose. Les collections de fractions de 2 mL, issues des séparations des culots méthanoliques et correspondant aux hydrolyses des trois lots de parois, sont rassemblées en trois fractions telles que nous venons de les définir. Nous obtenons ainsi les fractions P60F1, P60F2 et P60F3, respectivement (**Figure 2.5**).



**Figure 2.6 : Chromatographie du glucose sur colonne BioGel P2**

Les chitosaccharides ont été solubilisés par hydrolyse des parois PAW-NaOH par un mélange de  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,6-glucanases. Après précipitation au méthanol, les surnageants sont analysés sur colonne Biogel P2.  $V_0$  : Volume mort, déterminé avec du dextran 10 kDa.  $V_t$  : Volume total de la colonne. Les fractions P2F1, P2F2 et P2F3 sont délimitées par les lignes verticales discontinues. Les concentrations en glucose sont déterminées par dosage colorimétrique. L'expérience est réalisée trois fois sur des préparations de parois indépendantes ( ● : expérience 1 ; ▲ : expérience 2 ; ◇ : expérience 3).

**Tableau 2.8 : Rendements d'obtention des fractions de paroi**

rendement	P60F1	P60F2	P60F3	P2F1	P2F2	P2F3	Rendement total (%)
en glucose (%)	6.8	5.7	0.9	2.9	3.5	82.5	102.4
en NAG (%)	26.9	18.5	0.7	14.5	7.4	34.1	102.1
<b>Total (%)</b>	<b>9.9</b>	<b>7.6</b>	<b>1.1</b>	<b>4.6</b>	<b>4.2</b>	<b>79.6</b>	<b>106.8</b>

Les rendements présentés sont calculés à partir des quantités initiales dosées dans les parois PAW-NaOH utilisées.

## Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches*

Les surnageants méthanoliques ont été séparés sur colonne de BioGelP2, et le glucose quantifié par dosage du pouvoir réducteur sur une collection de fractions. Les profils chromatographiques de concentration en glucose sont représentés sur la **Figure 2.6**. Nous obtenons des profils similaires pour les trois lots de parois, montrant trois pics distincts, le premier entre 45 et 55 mL, le second entre 65 et 75 mL et le dernier, qui est très majoritaire, autour de 100 mL.

Trois zones de fractionnement se dessinent donc en fonction des trois pics observés. La première se situe de 20 à 60 mL et correspond à des sucres de tailles supérieures à 1.6 kDa, soit des polymères de plus de 8 résidus de NAG ou de plus de 9 résidus de glucose (**Tableau 2.7**). La seconde se situe de 61 à 86 mL et correspond à des sucres de taille comprise entre 1.6 kDa et 0.75 kDa, soit des polymères entre 8 et 4 résidus de NAG ou 9 et 5 résidus de glucose. La troisième zone correspond à des sucres de taille inférieure à 0.75 kDa, soit des sucres de tailles inférieures à 4 résidus pour la NAG et 5 résidus pour le glucose. Les collections de fractions de 2 mL, issues des séparations des surnageants méthanoliques et correspondant aux hydrolyses de trois lots de parois, sont rassemblées en trois fractions telles que nous venons de les définir. Nous obtenons ainsi les fractions P2F1, P2F2 et P2F3, respectivement (**Figure 2.6**).

Nous avons ainsi obtenu six fractions : P60F1, P60F2, P60F3, P2F1, P2F2 et P2F3, de tailles moléculaires décroissantes. Ces fractions sont issues de trois lots de parois mycéliennes indépendamment extraits, hydrolysés et purifiés. Nous assumons que ces fractions sont représentatives de la paroi d'*A.euteiches*.

Nous observons que la quantité totale de glucose des trois lots de parois PAW-NaOH est entièrement retrouvée à l'issue des séparations chromatographiques, répartie entre les six fractions (**Tableau 2.8**). Il en est de même pour la NAG. Nous ne notons donc pas de perte conséquente au cours des hydrolyses et des séparations.

Nous observons que 82.5% du glucose des parois se trouve dans la fraction de plus petit poids moléculaire, P2F3, comme attendu. En effet, le mix enzymatique utilisé contient toutes les activités glucanase nécessaires pour hydrolyser les glucanes de la paroi et obtenir majoritairement des fragments de moins de 5 résidus. De façon inattendue, on retrouve dans cette fraction 34.1% de la NAG totale, soit des fragments de moins de 4 résidus NAG, ce qui ne peut pas être imputé à la présence d'une activité enzymatique de type chitinase dans

**Tableau 2.9 : Composition des fractions de paroi**

	<b>P60F1</b>	<b>P60F2</b>	<b>P60F3</b>	<b>P2F1</b>	<b>P2F2</b>	<b>P2F3</b>
<b>Glucose (%)</b>	63.0	68.2	80.1	57.6	76.4	94.1
<b>NAG (%)</b>	35.3	31.5	8.5	41.3	23.0	5.6
<b>Protéines (%)</b>	1.8	0.3	11.4	1.1	0.7	0.4

le mélange enzymatique, et suggère des enchainements de NAG très courts à l'origine. La fraction P60F1 contient 6.8% du glucose total, mais aussi 26.9% de la NAG totale, sous forme de polymères solubles de très grande taille, et donc peu sensibles aux enzymes utilisées. Nous observons également que la fraction P60F3 ne contient que 0.9% du glucose total et 0.7% de la NAG totale, indiquant que la zone correspondante du profil de séparation chromatographique a été appauvrie par la précipitation préalable au méthanol. Cet appauvrissement s'est fait au profit de l'enrichissement de la fraction P2F1, qui contient 2.9% du glucose total et 14.5% de la NAG totale.

Les fractions P60F1 et P60F2 contiennent 35.3% et 31.5% de NAG pour 63% et 68.2% de glucose respectivement (**Tableau 2.9**). La fraction P2F1 contient 41.3% de NAG pour 57% de glucose et la fraction P2F2, 23% de NAG pour 76.4% de glucose (**Tableau 2.9**). Les fractions P60F3 et P2F3, qui correspondent à des fins de profils de séparation, sont pauvres en NAG, seulement 8.5% et 5.6% de NAG pour 80.1% et 94.1% de glucose respectivement. La fraction P2F1 présente, à cette étape, le meilleur enrichissement par rapport aux parois d'origine qui contenaient 12.2% de NAG (**Tableau 2.4**). Cinquante milligrammes de chacune de ces fractions, excepté pour la fraction P2F3, ont été réservés pour les analyses structurales au CERMAV à Grenoble, sous la direction de Laurent Heux, ainsi qu'au KTH Royal Insitute à Stockholm, sous la direction de Vincent Bulone.

A l'issue du fractionnement des hydrolysats de paroi, nous avons constaté que les six fractions obtenues contiennent une faible proportion de protéines (**Tableau 2.9**). N'ayant pas détecté de protéines dans les parois PAW-NaOH, celles-ci sont vraisemblablement des protéines résiduelles du mélange enzymatique que nous avons utilisé. Si pour les analyses structurales des sucres, la présence de ces petites quantités de protéines dans les six fractions ne présente aucune difficulté, elle est un problème pour l'étude de l'activité biologique de ces fractions. Il a donc été envisagé de traiter le reste des fractions afin d'éliminer les protéines. La fraction P60F3 ne contient, en proportion propre, que 8.5% de NAG pour 80.1% de glucose, ce qui représente seulement 2.4 mg de NAG en totalité (**Tableau 2.9**). Cette fraction est difficilement utilisable pour étudier l'activité biologique des chitosaccharides. Elle n'a été utilisée que pour les analyses structurales. La fraction P2F3 contient en proportion propre 94.1% de glucose pour 5.6% de NAG. Bien qu'elle soit la fraction contenant la plus grande quantité de NAG, celle-ci n'a un degré de polymérisation

**Tableau 2.10 :** Rendement d'obtention et composition des fractions de paroi après déprotéinisation

	P60F1	P60F2	P2F1	P2F2
<b>Rendement (%)</b>	37.1	85	69.5	91.9
<b>Proportion de glucose (%)</b>	50.9	53.2	59.8	77.1
<b>Proportion de NAG (%)</b>	48.7	46.8	40.2	22.8
<b>Proportion de Protéines (%)</b>	0.4	0.03	0.0 <sup>a</sup>	0.1

<sup>a</sup> 0.0 : Inférieur au seuil de détection. Le rendement d'obtention de chaque fraction est calculé par rapport aux fractions non déprotéinées.

**Tableau 2.11 :** Évaluation de la contamination en protéines dans les fractions de paroi déprotéinisées

Fractions	P60F1	P60F2	P2F1	P2F2
<b>DP théoriques en acides aminés</b>	>463	463-31	>14	14-6
<b>Concentration protéique pour 100µg/mL (nM)</b>	<7	0.6-8.8	<31 <sup>a</sup>	70-150

La contamination en protéines est calculée à partir de la limite de détection de la méthode de dosage.

théorique maximum que de 4 résidus. Cette fraction n'a, elle aussi, été utilisée que pour les analyses structurales.

Seules les fractions P60F1, P60F2, P2F1 et P2F2 ont donc été déprotéinisées, en réalisant une chromatographie échangeuse d'anions sur une résine de type Dowex H<sup>+</sup> (**Matériel et Méthodes 1.3.4.2.**). La composition des fractions a été à nouveau déterminée (**Tableau 2.10**). Nous constatons que l'étape de déprotéinisation a entraîné des pertes en sucres des parois. Nous observons une perte globale de 63% de la fraction P60F1, ce qui représente la moitié de la NAG et les deux tiers du glucose de cette fraction. La perte globale de la fraction P60F2 est de 15%, qui est essentiellement une perte de glucose, une perte globale de 31% pour P2F1, autant de NAG que de glucose, et 8% de perte pour P2F2, autant de NAG que de glucose également. Les pertes les plus importantes sont observées pour la fraction P60F1 qui contient de gros polymères, ce qui pourrait s'expliquer par un phénomène de floculation des molécules dans l'eau et leur rétention sur la colonne. Pour les fractions P2F1 et P2F2, cette étape n'a eu aucun effet sur les proportions de glucose et de NAG alors que les fractions P60F1 et P60F2 se sont enrichies en NAG, passant de 35.5% à 48.7%, et 31.5% à 40.3%, respectivement (**Tableau 2.10**).

Le dosage des protéines après cette étape de déprotéinisation a été effectué par la méthode de Bradford modifiée, décrite en **Matériel et Méthodes 1.1.1**. Cette méthode présente une linéarité du dosage accrue pour des concentrations de 1 à 5 µg de protéines, tandis que la méthode usuelle de Bradford a une meilleure linéarité pour des concentrations de 5 à 25 µg de protéines. Le dosage est réalisé sur 2 mg de chaque fraction. Nous observons la présence de protéines résiduelles dans les fractions P60F1, P60F2 et P2F2. Le dosage des protéines dans la fraction P2F1 ne nous permet pas de mettre en évidence leur présence. Nous considérons que la quantité de protéines présente est au maximum égale à la limite de détection, soit 1 µg de protéines dans 2 mg de parois. Pour les 49.7 mg de la fraction P2F1, nous avons donc au maximum 25 µg de protéines. Les tailles théoriques de protéines présentes se répartissent telles que cela est présenté dans le **Tableau 2.11**. Nous présentons également dans ce tableau les concentrations théoriques des protéines pour une concentration des fractions à 100 µg/mL. Nous observons que les fractions P60F1 et P60F2 présentent alors une concentration en protéines inférieure à 10 nM, tandis que la fraction P2F2 a une concentration en protéines comprise entre 70 et 150 nM. Pour la fraction P2F1,





la concentration en protéines est au maximum de 31 nM. Les quatre fractions sont lyophilisées trois fois pour éliminer par évaporation les restes de sels de formiate d'ammonium, provenant de l'étape de séparation sur colonne de filtration moléculaire.

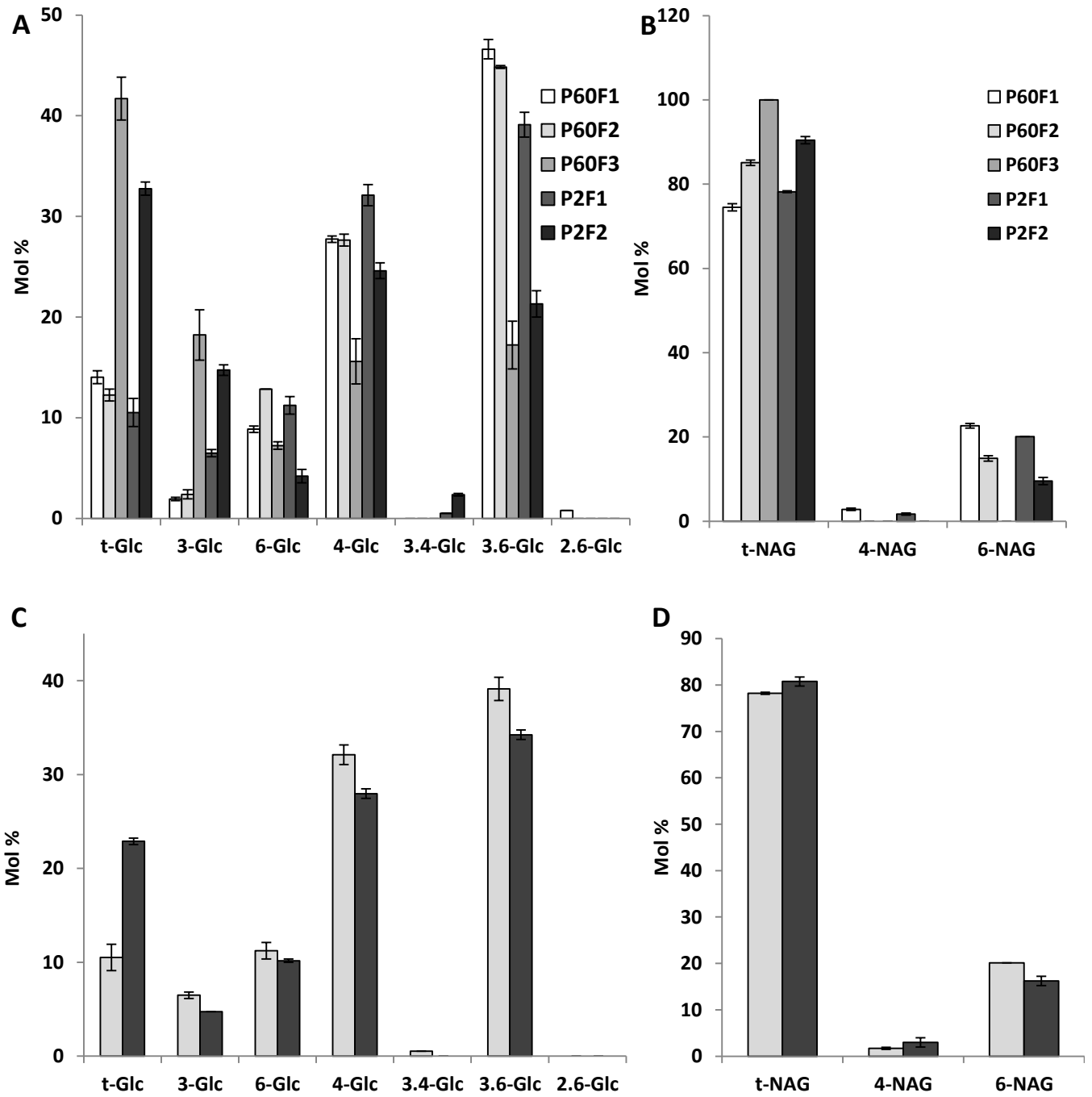
Pour pouvoir déterminer par la suite l'impact de la présence des protéines présentes dans les fractions de paroi d'*A.euteiches*, sur les réactions des plantes, des fractions contrôles ont été préparées. Ces fractions ont également servi de contrôle pour les sels présents, en particulier les sels de formiate d'ammonium. Une hydrolyse avec la même quantité du mélange enzymatique a été réalisée en absence de parois PAW-NaOH. L'échantillon a été traité selon les mêmes étapes qui ont été réalisées pour le fractionnement des parois hydrolysées. Nous avons obtenu quatre fractions protéiques correspondant aux fractions de parois : P60.1, P60.2, P2.1, P2.2. Pour les bioessais sur les plantes, elles ont été diluées afin de correspondre à une concentration équivalente de 100 µg/mL ou 1 mg/mL, selon le bioessai, de la fraction correspondante, concentrations utilisées pour traiter les plantes avec les fractions P60F1, P60F1, P2F1 et P2F2.

### **1.2.2. Caractérisation structurale**

Le traitement des quatre fractions, P60F1, P60F1, P2F1 et P2F2, par des chitinases n'a pas permis de détecter la libération de NAG sous forme de monomère après analyse par HPAEC-PAD, ce qui indique qu'il n'y a pas de polymères de NAG accessible aux chitinases. Des techniques complémentaires (RMN, perméthylation des sucres et spectrométrie de masse) ont été utilisées pour caractériser plus avant ces fractions.

#### **1.2.2.1. Approche par perméthylation des sucres**

Pour déterminer les différents types de liaisons existantes dans les fractions de paroi d'*A.euteiches* non déprotéinées, une analyse des liaisons pas méthylation a été effectuée au Royal Institute of Technology (KTH), à Stockholm, par Hugo Mélida, sous la direction de Vincent Bulone. Cette méthode consiste à méthyler les fonctions hydroxyle libres des polymères, puis à hydrolyser les polymères dans des conditions qui conservent la méthylation, à l'exception de celle éventuellement présente au niveau du carbone anomérique. A l'issue de l'hydrolyse, on obtient des monomères où les fonctions hydroxyle

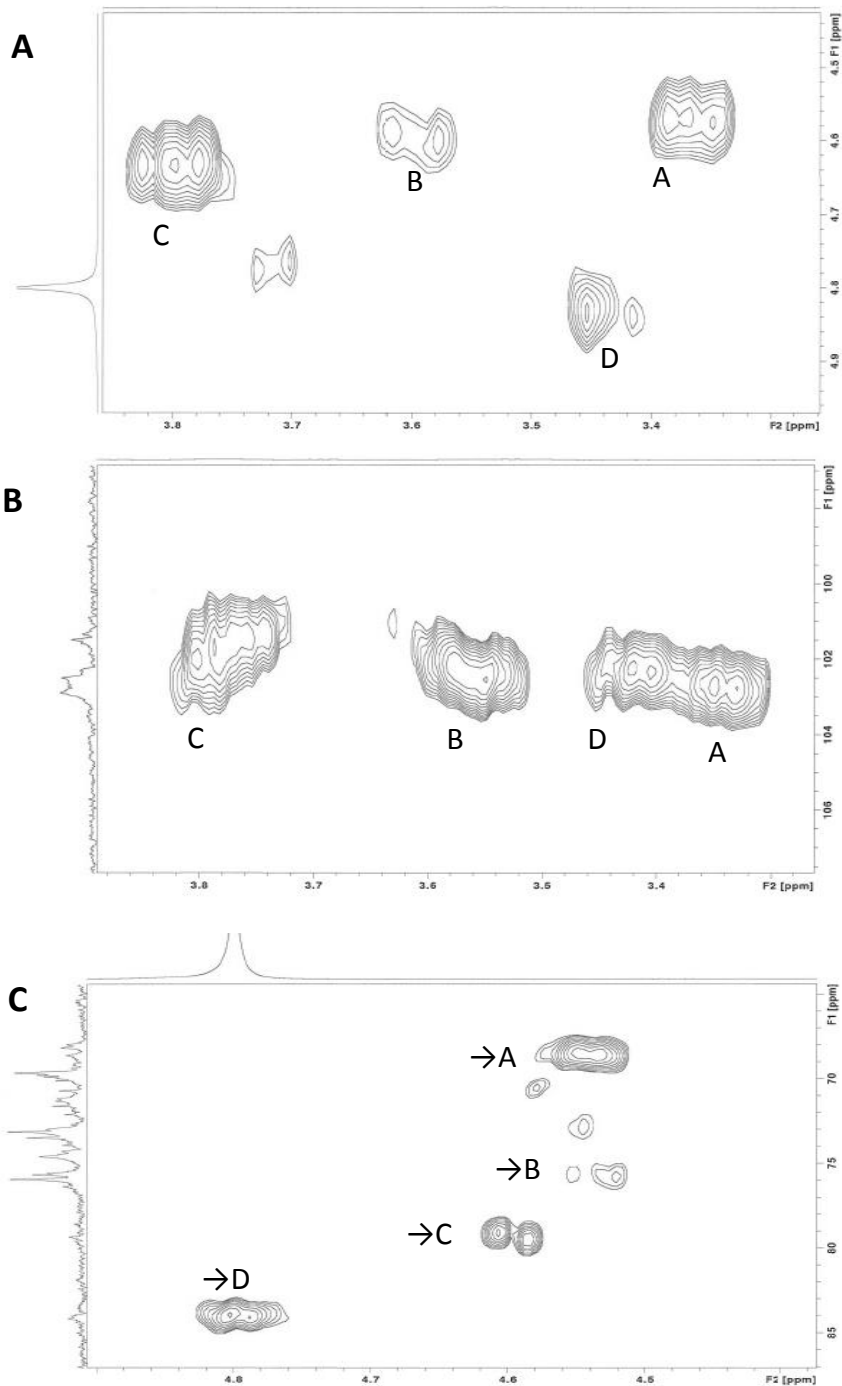


**Figure 2.7 : Analyse des liaisons par méthylation des sucres**

**A :** Liaisons des résidus glucose dans les fractions de parois d'*A.euteiches*. **B :** Liaisons des résidus NAG dans les fractions de parois d'*A.euteiches*. **C :** Liaisons des résidus glucoses dans la fraction P2F1 avant (□) et après déprotéinisation (■). **D :** Liaisons des résidus NAG dans la fraction P2F1 avant (□) et après déprotéinisation (■).

qui n'étaient pas impliquées dans des liaisons sont alors méthylées, tandis que les carbones qui étaient impliqués dans des liaisons sont pourvus d'une fonction hydroxyle libre. La présence de groupements méthyl ou hydroxyle est déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la **Figure 2.7 (A,B)**. Cette analyse a été renouvelée sur la fraction P2F1 après déprotéinisation **Figure 2.7 (C,D)**.

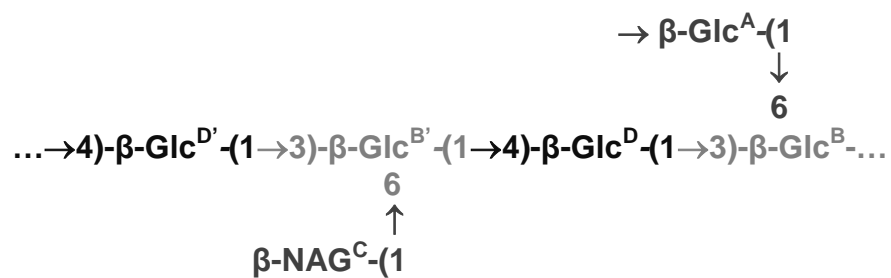
De faibles proportions de mannose ont été mises en évidence dans les fractions P60F1, P60F2, P2F1 et P2F2 encore non déprotéinisées, moins de 2% de la totalité des sucres pour P60F1, P60F2 et P60F3, et moins de 1% pour P2F1 et P2F2, certainement dues à la présence des protéines. Pour le glucose nous mettons en évidence des liaisons 1->3, 1->4 et 1->6. Des ramifications 1->3,6 sur le glucose ont pu être identifiés en proportion importante. Ces liaisons sont celles auxquelles nous pouvions nous attendre dans la paroi d'un oomycète (Sharp *et al.*, 1984). Dans toutes les fractions, nous ne révélons que très peu, voire pas de NAG liée en 1->4, expliquant leur résistance aux chitinases. La seule chaîne de NAG homopolymérique possible consisterait donc en des NAG liées par des liaisons  $\beta$ -1,6, mais elle serait en moyenne très courte car nous trouvons beaucoup de NAG en position terminale. Ces résidus peuvent être liés par leur carbone anomérique à du glucose sur les carbones 3, 4 ou 6. Les ramifications d'oligoglucanes avec des résidus NAG pourraient se positionner essentiellement sur les carbones 3 et 6 des résidus glucose. Aucune ramification sur les résidus NAG n'est observée. La comparaison des profils de la fraction P2F1 analysée avant ou après déprotéinisation montre que la déprotéinisation a augmenté la proportion de glucoses terminaux au détriment des glucoses liés, mais n'a pas affecté la composition des liaisons de la NAG.



**Figure 2.8 : Spectres 2D de RMN de la fraction P2F2**

**A :** Corrélation COSY dans la zone des protons anomères. **B :** Corrélation HMBC dans la zone des C1.

**C :** Corrélation HMBC dans la zone de la liaison glycosidique.



**Figure 2.9 : Hypothèse de structure de molécules contenues dans la fraction P2F2**

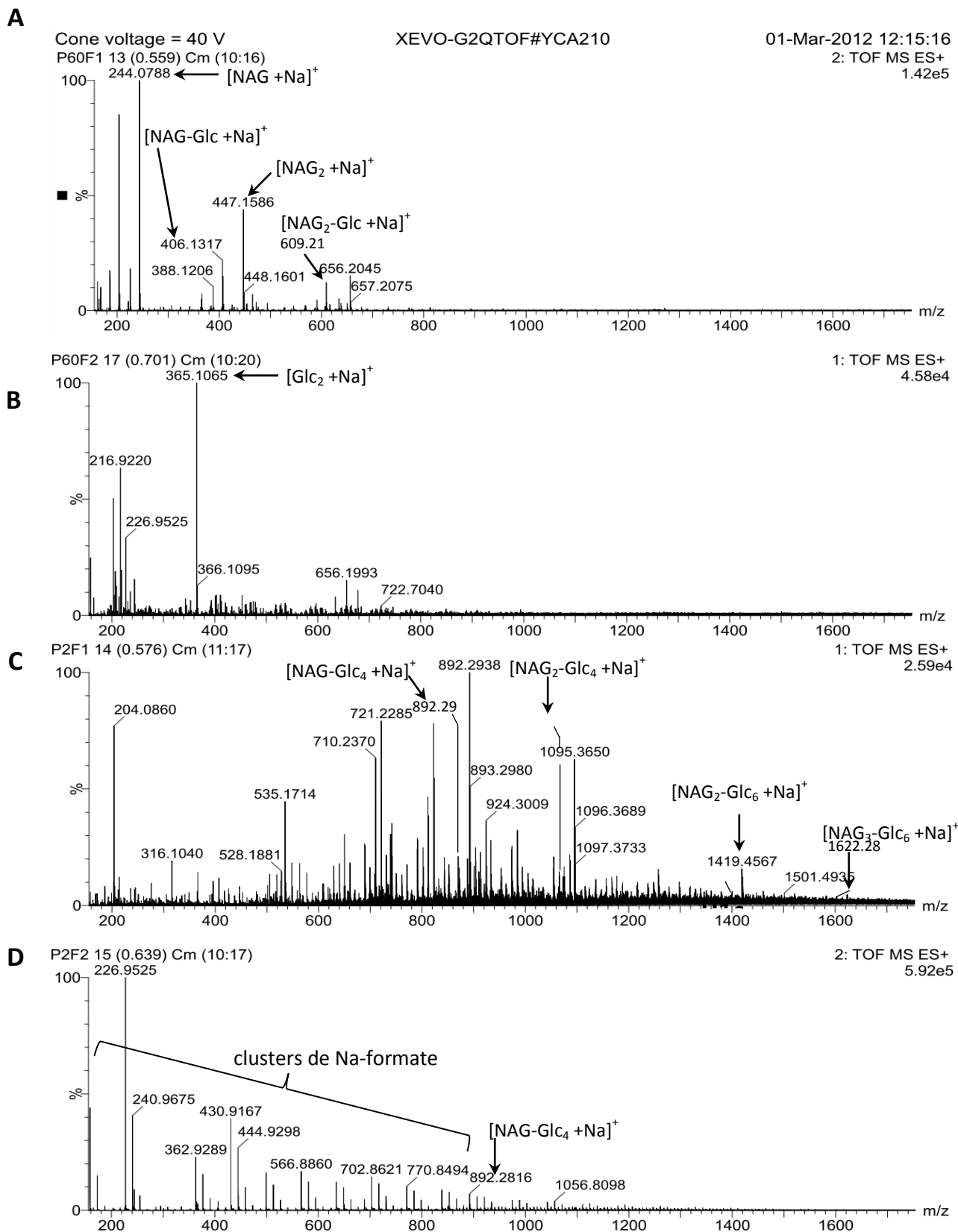
Les unités A, B, C et D formant les signaux présentés en **Figure 2.8** sont indiquées au niveau des résidus glucidiques de la structure.

### 1.2.2.2. Approche par Résonance Magnétique Nucléaire du liquide

Les analyses RMN ont été réalisées par Tinaïg Lecostaouec et Sophie Drouillard, sous la direction de Laurent Heux du CERMAV, à Grenoble. Nous avons analysé par RMN du liquide les fractions P60F1, P60F2, P60F3, P2F1 et P2F2. De manière assez peu surprenante, le spectre le plus simple a été obtenu pour P2F2 de gamme de poids moléculaire la plus petite. Pour comprendre la structure de ce produit, nous nous sommes appuyés sur des spectres de corrélation bidimensionnels. La **Figure 2.8** montre trois agrandissements issus de corrélation COSY (protons voisins) (**Figure 2.8.A**) dans la zone des protons anomères, une corrélation HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  à longue distance) dans la zone des C1 (**Figure 2.8.B**) et cette même corrélation HMBC dans la zone de la liaison glycosidique (**Figure 2.8.C**).

L'information principale provient de la corrélation COSY (**Figure 2.8.A**). En effet, il est possible de distinguer 4 unités très majoritaires qui sont les 4 éléments de base de la structure. La **Figure 2.8.B** (HMBC) permet de relier ces quatre groupes de protons à 4C1, confirmant la composition de la fraction. Enfin, la **Figure 2.8.C** permet de comprendre les relations entre les protons à travers les liaisons glycosidiques. Elle nous permet de proposer, en cohérence avec l'analyse des liaisons par méthylation, une architecture possible de la molécule (**Figure 2.9**). Les analyses indiquent la présence de liaisons entre les résidus glucoses en positions  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 probablement alternées en raison de l'absence de corrélation croisée, des liaisons entre les résidus glucose en position  $\beta$ -1,6 qui ne seraient pas dans la chaîne principale, et des résidus NAG probablement liés en  $\beta$ -1,6 au résidu glucose lié en  $\beta$ -1,3 dans la chaîne principale.

La molécule pourrait alors être un squelette de glucoses en liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 alternées, avec des ramifications en position  $\beta$ -1,6 situées sur les résidus glucose de la chaîne principale, liés en  $\beta$ -1,3. Ces ramifications sont soit des résidus glucose soit des résidus NAG. Il est difficile à ce stade de connaître la longueur potentielle des branches qui commencent par un glucose. La structure doit être confirmée par l'analyse et la cohérence des autres signaux.



**Figure 2.10 : Analyse des fractions de parois par spectrométrie de masse**

**A :** Spectre de la fraction P60F1. **B :** Spectre de la fraction P60F2. **C :** Spectre de la fraction P2F1. **D :** Spectre de la fraction P2F2.

### **1.2.2.3. Approche par spectrométrie de masse**

Dans le but de mettre en évidence directement la présence éventuelle de COs et de glycanes mixtes composés de glucose et de NAG, les quatre fractions P60F1, P60F2, P2F1, P2F2 déprotéinisées ont été analysées par spectrométrie de masse à haute résolution, avec l'aide de Saïda Danoun (UMR 5546 CNRS/UPS, LRSV). Les spectres obtenus sont présentés en **Figure 2.10**.

**Tableau 2.12 : Identification des ions détectés par spectrométrie de masse**

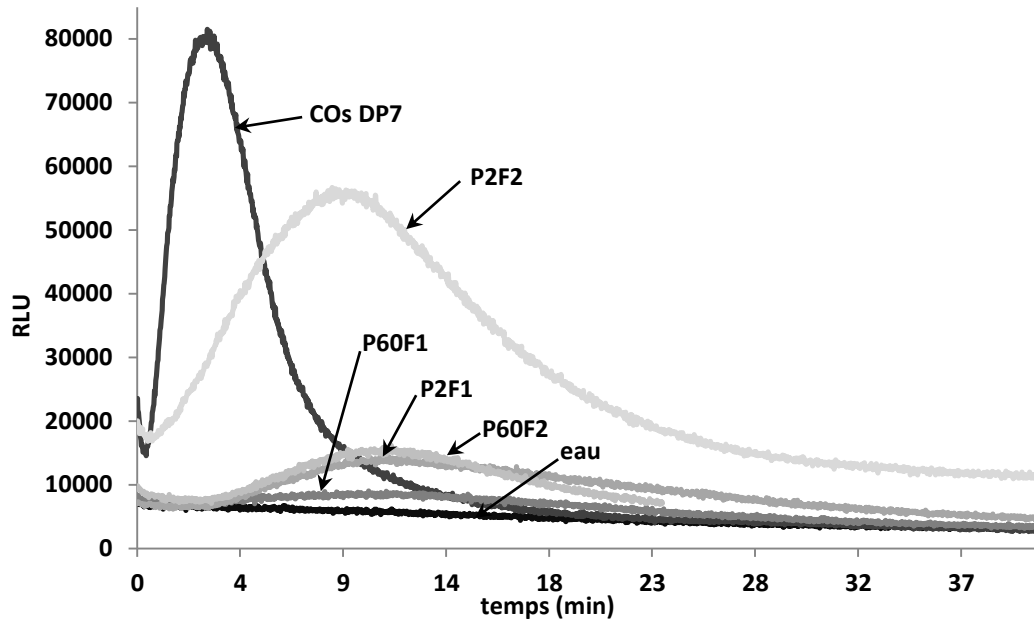
	m/z	Ions
<b>P60F1</b>	244,07	[NAG +Na] <sup>+</sup>
	406,12	[NAG-Glc +Na] <sup>+</sup>
	447,15	[NAG <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>
	609,21	[NAG <sub>2</sub> -Glc +Na] <sup>+</sup>
<b>P60F2</b>	365,1	[Glc <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>
<b>P2F1</b>	892,29	[NAG-Glc <sub>4</sub> +Na] <sup>+</sup>
	1095,36	[NAG <sub>2</sub> -Glc <sub>4</sub> +Na] <sup>+</sup>
	1419,45	[NAG <sub>2</sub> -Glc <sub>6</sub> +Na] <sup>+</sup>
	1622,55	[NAG <sub>3</sub> -Glc <sub>6</sub> +Na] <sup>+</sup>
<b>P2F2</b>	892,28	[NAG-Glc <sub>4</sub> +Na] <sup>+</sup>

**Tableau 2.13 : Confirmation des ions détectés dans fraction P2F1 par fragmentation MS/MS**

Ions parents		Ions fils (m/z)		
		204,08	366,14	407,16
m/z	Ions	[NAG-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	[(NAG-Glc)-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	[NAG <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
870,3	[NAG-Glc <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	X	X	
1073,38	[NAG <sub>2</sub> -Glc <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	X	X	X
1397,49	[NAG <sub>2</sub> -Glc <sub>6</sub> +H] <sup>+</sup>	X	X	X
1600,57	[NAG <sub>3</sub> -Glc <sub>6</sub> +H] <sup>+</sup>	X	X	X

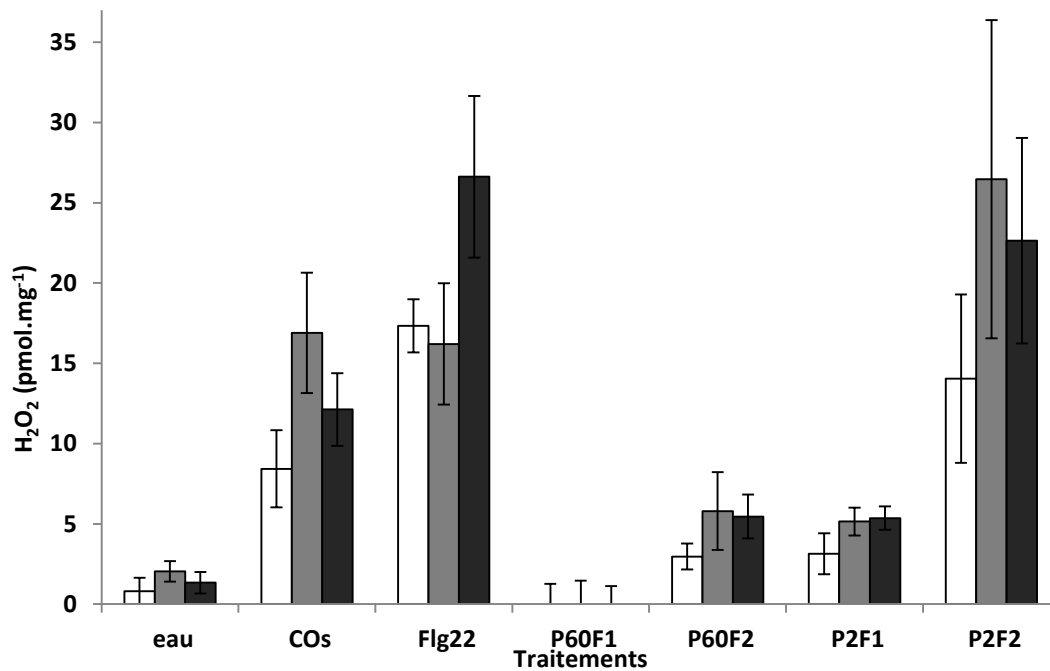


Sur le spectre de la fraction P60F1, quatre ions majeurs ont été identifiés (**Tableau 2.12**), ainsi qu'un ion mineur à  $m/z$  650.23 correspondant à un trimère de NAG. Deux ions à  $m/z$  244.07 et  $m/z$  447.15 correspondent respectivement à un monomère et à un dimère de NAG sous forme d'adduits sodium. Les deux autres à  $m/z$  406.13 et  $m/z$  609.21 correspondent à des molécules constituées de glucose et de NAG, sous forme d'adduits sodium, le dernier ayant été confirmé par analyse MS/MS. Sur le spectre de la fraction P60F2, un seul ion a pu être identifié, un dimère de glucose sous forme d'adduit sodium. Les fractions P60F1 et P60F2 contiennent des molécules de haut poids moléculaire. De ce fait la spectrométrie de masse n'est pas une méthode adaptée à l'étude de ces molécules, comme en témoigne la pauvreté des spectres obtenus pour ces deux fractions. Ces spectres ne sont pas représentatifs du contenu de ces fractions. Sur le profil de la fraction P2F1, outre deux ions mineurs à  $m/z$  447.15 et 650.23 correspondant au dimère et au trimère de NAG, respectivement, nous avons pu identifier quatre molécules qui correspondraient à des hétéroglycanes constitués de glucose et de NAG. Les prédictions des molécules correspondant à ces pics a été confirmée par fractionnement en MS/MS qui a notamment permis de mettre en évidence sous forme d'adduits proton des dimères constitués de NAG et de glucose, démontrant de façon définitive la liaison covalente entre chitosaccharides et glucanes (**Tableau 2.13**). Pour la fraction P2F2, de nombreux pics du chromatogramme correspondent à des agrégats de formiate qui empêchent la visualisation d'autres espèces moléculaires, mais une espèce à  $m/z$  892.28 a été détectée, déjà observée dans la fraction P2F1.



**Figure 2.11 :** Mesure en cinétique de l' $H_2O_2$  extracellulaire produit par les racines de *M.truncatula* en réponse aux fractions de paroi d'*A.euteiches*

Le traitement avec des COs DP7 les fractions de parois d'*A.euteiches* sont effectués à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figure 2.12 :** Dosage en point final de la production d' $H_2O_2$  extracellulaire par les racines de *M.truncatula* en réponse aux fractions de paroi d'*A.euteiches*

Les racines des jeunes plantes de *M.truncatula* wt (□) ou mutante *nfp1* (■) ou *nfp2* (■) sont traitées par des COs DP7 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), de la flagelline (Flg22 à 1  $\mu\text{M}$ ), ou les fractions de paroi déprotéinées d'*A.euteiches* (P60F1, P60F2, P2F1 et P2F2 à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les résultats présentés sont issus trois expériences indépendantes  $\pm$  SE.

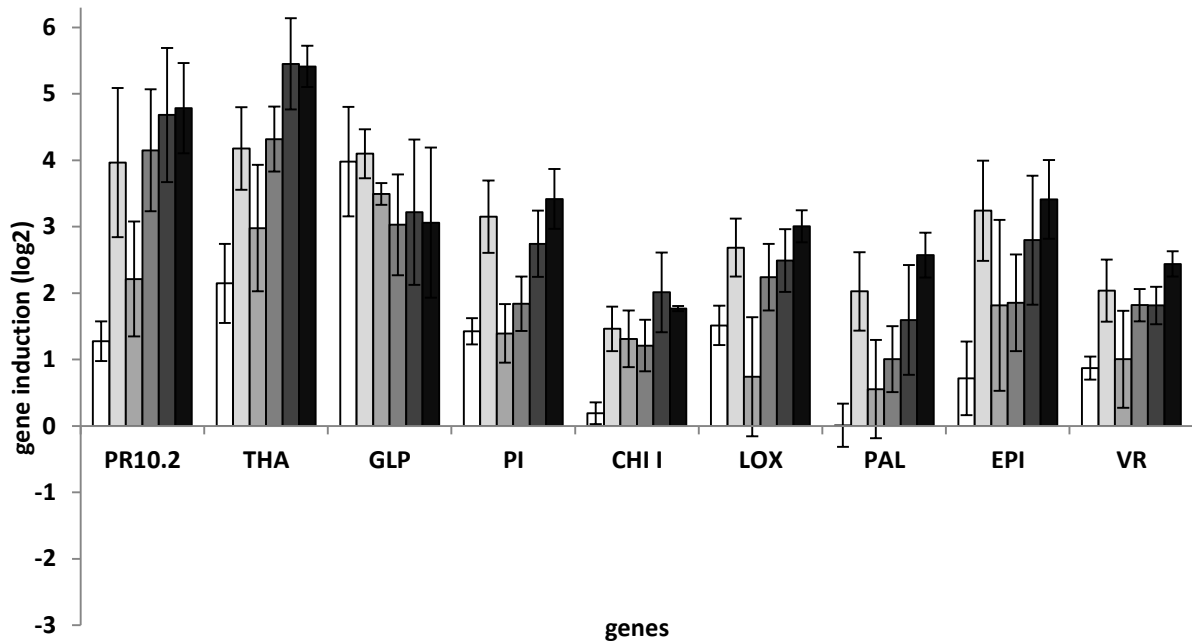
## 2. ACTIVITE BIOLOGIQUE :

### 2.1. ACTIVITE BIOLOGIQUE CHEZ *M.TRUNCATULA*

#### 2.1.1. Mesure de la production de ROS extracellulaires

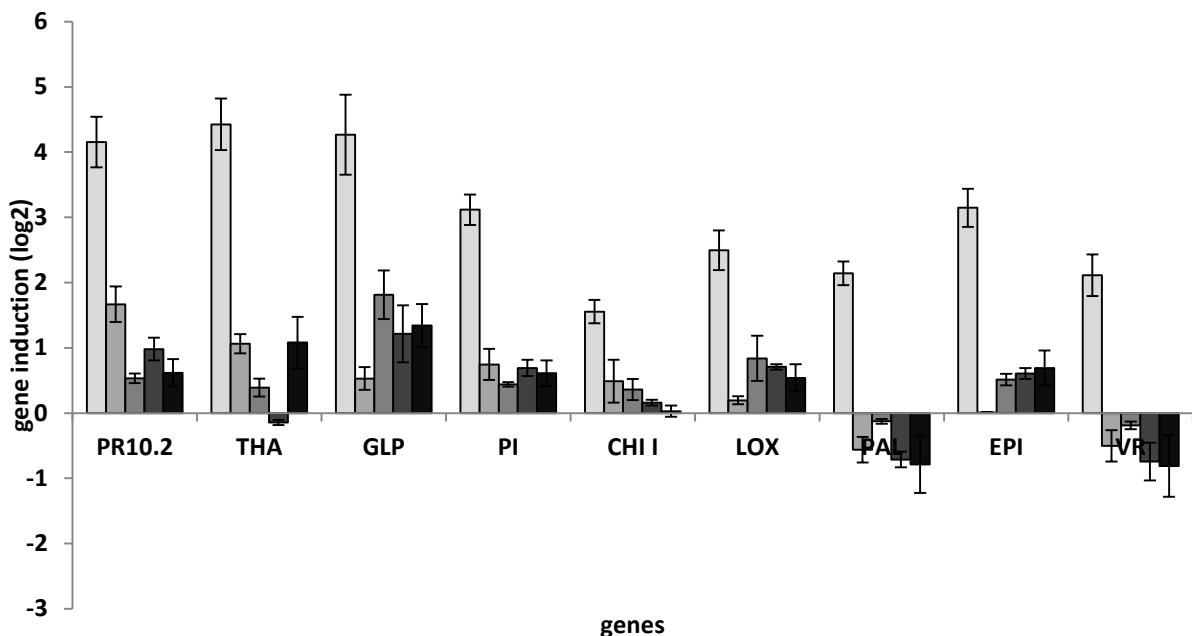
Nous avons déterminé dans un premier temps si les quatre fractions de paroi P60F1, P60F2, P2F1 et P2F2 déprotéinisées, sont perçues par la plante *M.truncatula* sauvage (wt) au niveau racinaire. Pour cela nous avons utilisé le bioessai d'élicitation avec mesure de la production de ROS, que nous avons mis au point et détaillé dans le **Chapitre 1**. Les fractions sont appliquées sur l'appareil racinaire à une concentration de 100 µg/mL. Les cinétiques de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse aux différents traitements sont représentées dans la **Figure 2.11**. La fraction qui induit le signal le plus fort est la fraction P2F2, qui est la fraction de plus petite taille moléculaire. Nous observons un signal débutant à moins d'une minute, atteignant un maximum vers dix minutes et se terminant vers vingt-cinq minutes. Le signal élicité par la fraction P2F2 est nettement plus prolongé que celui élicité par les COs DP 7, ici utilisés à 100 µg/mL. Les fractions P2F1 et P60F2 induisent un signal faible mais clairement identifiable et similaire entre les deux fractions, tandis que la fraction P60F1 induit un signal qui se différencie à peine du témoin négatif. L'induction de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les fractions P60F2, P2F1 et P2F2 indique qu'elles sont perçues par *M.truncatula*. Pour la fraction P60F1, étant donné la faiblesse du signal obtenu, nous ne pouvons pas statuer sur sa perception.

Après avoir montré que les fractions de parois d'*A.euteiches* peuvent être perçues par le système racinaire de la plante sauvage de *M.truncatula*, nous avons déterminé si les plantes *nfp-1* et *nfp-2* mutées sur le gène codant le récepteur NFP, sont affectées dans leur perception. Pour cela nous avons utilisé le bioessai d'élicitation avec une mesure de ROS en point final que nous avons développé dans le **Chapitre 1**. Les COs DP7 ont été utilisés à 20 µg/mL, concentration induisant une réponse maximale chez la lignée sauvage, et les quatre fractions de parois à 100 µg/mL (**Figure 2.12**). La flagelline est utilisée comme témoin protéique, à une concentration de 1 µM. Celle-ci induit une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez la plante sauvage (wt) et les deux mutants, sans différence significative. Pour les COs DP7 et les



**Figure 2.13 : Régulation par les fractions de paroi d'*A.euteiches* de l'expression de gènes associés à la défense dans les racines de *M.truncatula***

Les racines des plantes sont incubées pendant 4 h dans les solutions élicitrices (□: COs à 20 µg/mL; □: Flg22 à 1 µM; ▒: P60F1 à 100 µg/mL; ▒: P60F2 à 100 µg/mL; ■: P2F1 à 100 µg/mL; ■: P2F2 à 100 µg/mL) avant d'être récoltées pour l'analyse de l'expression génique. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.



**Figure 2.14 : Régulation par les contrôles protéiques de l'expression de gènes associés à la défense dans les racines de *M.truncatula***

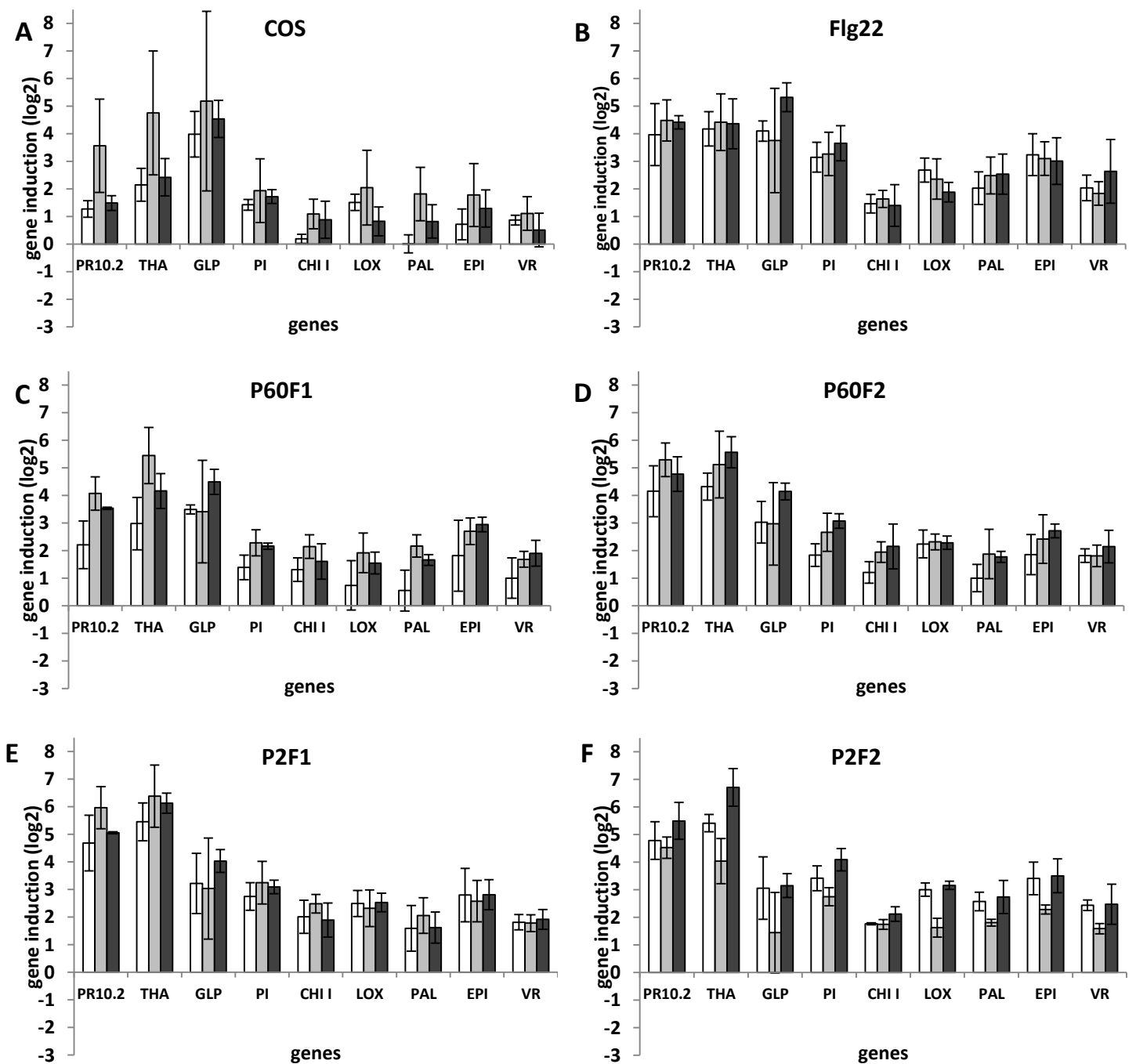
Les racines des plantes sont incubées pendant 4 h dans les solutions élicitrices (□: flg22 à 1 µM; ▒: P60.1; ▒: P60.2; ■: P2.1; ■: P2.2) avant d'être récoltées pour l'analyse de l'expression génique. Les contrôles protéiques sont utilisés à une concentration équivalente à 100 µg/mL des fractions de paroi correspondantes. Les résultats présentés sont issus trois expériences indépendantes ± SE.

fractions de paroi d'*A.euteiches*, nous avons obtenu des résultats cohérents avec ceux obtenus lors du dosage de ROS en cinétique sur la lignée sauvage. La fraction P2F2 induit la plus forte production d' $H_2O_2$ , tandis que les fractions P60F2 et P2F1 induisent une production de ROS faible mais significativement différentes de celle du témoin eau. Nous ne sommes pas en mesure de mettre en évidence une induction de la production d' $H_2O_2$  suite au traitement avec la fraction P60F1. Nous n'avons observé de différence significative entre la plante sauvage (wt) et les mutants *nfp-1* et *nfp-2* pour aucun des traitements effectués, ce qui suggère qu'aucun des deux mutants n'est altéré dans la perception des COs de chitine et des quatre fractions de paroi d'*A.euteiches*.

D'autre part, nous n'avons observé d'induction de production d' $H_2O_2$  avec aucune des quatre fractions de contrôle protéique P60.1, P60.2, P2.1 et P2.2 (paragraphe 1.2.1 ; résultat non montré). La présence d'une faible quantité de protéines dans ces fractions n'est donc pas suffisante pour induire une réaction de la plante se traduisant par une induction de la production de ROS.

### 2.1.2. Analyse de l'expression génique

Les plantes traitées, pour lesquelles la production d' $H_2O_2$  a été mesurée comme précédemment décrit, ont été incubées durant quatre heures. A l'issue de cette période d'incubation, les racines des plantes ont été collectées et les ARNs en ont été extraits. L'analyse de l'expression de gènes, présentés dans le **Chapitre 1**, par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) en réponse au traitement par les fractions de paroi d'*A.euteiches* chez la plante sauvage (wt) est présentée sur la **Figure 2.13**. Nous constatons que les traitements par les quatre fractions de paroi d'*A.euteiches* conduisent à l'induction des gènes étudiés. Cette observation indique que les quatre fractions sont biologiquement actives. La fraction P60F1 semble avoir une activité moins forte que les trois autres, si on se réfère à la régulation des gènes *PR10.2* et *LOX* par exemple. A l'opposé, la fraction P2F2 semble avoir une activité un peu plus forte que les trois autres, lorsque l'on se réfère au gène *VR* par exemple. Nous pouvons aussi observer que les régulations induites par les fractions de paroi sont plus fortes que les régulations induites par les COs DP7 et se rapprochent des inductions observées en réponse au traitement par Flg22.



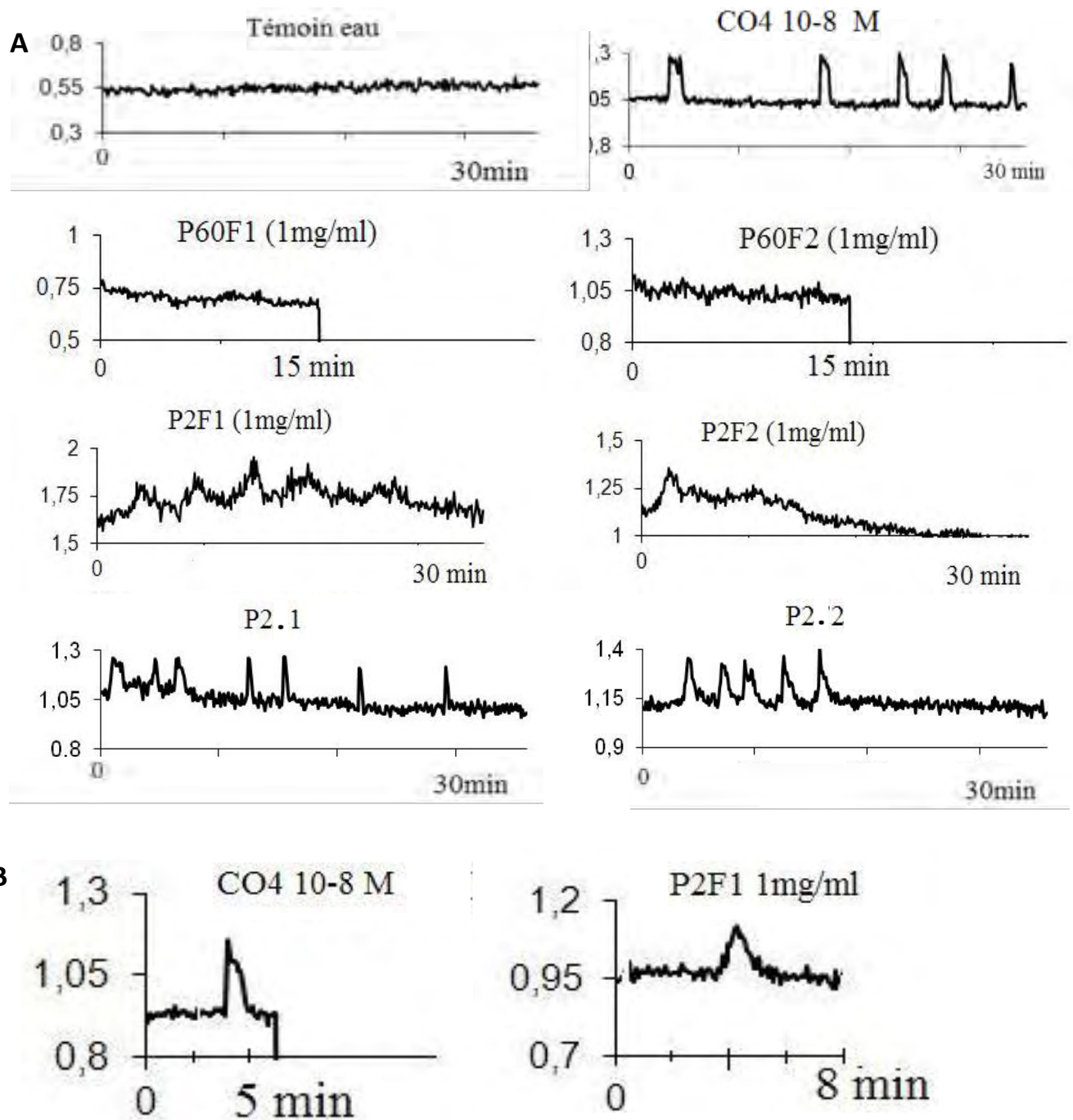
**Figure 2.15 : Régulation par les fractions de paroi d'*A.eteiches* de l'expression de gènes associés à la défense dans les racines de *M.truncatula***

Les racines des plantes sauvages (□), mutantes *nfp-1* (◻), mutantes *nfp-2* (◼) sont incubées pendant 4 h dans les solutions élicitrices **A** : COs à 20 µg/mL; **B** : Flg22 à 1 µM; **C** : P60.1; **D** : P60.2; **E** : P2.1; **F** : P2.2, avant d'être récoltées pour l'analyse de l'expression génique. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

## Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches*

Les traitements de la plante sauvage avec les fractions de contrôle protéique P60.1, P60.2, P2.1 et P2.2 (paragraphe 1.2.1) n'induisent que des régulations faibles (**Figure 2.14**). Cela nous conduit à conclure que les protéines présentes en faible quantité dans les fractions de paroi d'*A.euteiches* ont peu d'influence sur leur activité biologique, que nous attribuerons aux glycanes qui sont très majoritaires.

Enfin, les régulations observées pour les plantes *nfp-1* et *nfp-2*, en réponse à chacun des traitements, sont similaires à celles observées chez la plante wt, ne nous permettant pas de conclure quant à l'implication de NFP dans la perception des fractions de parois d'*A.euteiches* (**Figure 2.15**).



**Figure 2.16 :** Profils représentatifs des variations de calcium observées dans les noyaux des cellules de racines de *M.truncatula*

**A :** Comparaison des variations calciques obtenues dans les noyaux de cellules de racine de *M.truncatula* après traitement avec différentes fractions de parois. **B :** Différence de symétrie entre les pics obtenus avec la fraction P2F1 et avec le chitotétraose (CO4). Le pic obtenu avec le CO4 est asymétrique contrairement au pic obtenu avec la fraction P2F1 qui est symétrique.



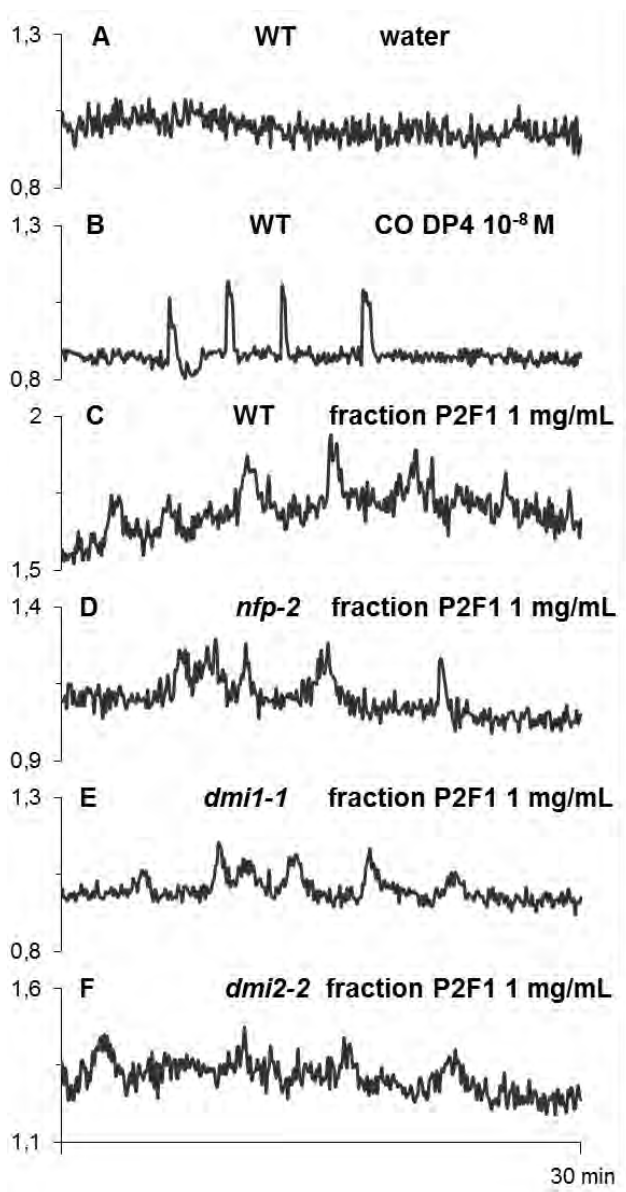
### 2.1.3. Mesure des variations calciques nucléaires

Pour poursuivre l'étude de l'activité biologique et de la perception des chitosaccharides par *M.truncatula*, nous avons mis en œuvre un autre bioessai permettant de mettre en évidence l'induction d'une signalisation calcique. Ce bioessai est fondé sur l'utilisation de cultures de racines exprimant une construction « caméléon » permettant de mesurer les variations en calcium nucléaire par le phénomène de Fluorescence Resonance Energie Transfert (FRET).

Les mesures de variations calciques ont été réalisées par Julie Benedetti et Mireille Chabaud sous la direction de David Barker du Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (INRA, Auzeville). Les observations ont été faites sur trois racines et dix noyaux par racine. Les quatre fractions de parois (P60F1, P60F2, P2F1 et P2F2) ont été utilisées pour ces essais à une concentration de 1 mg/mL sur des racines âgées de 15 jours (**Figure 2.16.A**).

Les fractions P60F1 et P60F2 ne montrent pas d'activité significative, moins de 9% des noyaux ont donné une réponse. La fraction P2F2 montre une activité assez faible mais reproductible, avec plus de 50% des noyaux qui ont donné une réponse, qui correspond à un pic de calcium dans le noyau au début de l'enregistrement. La fraction P2F1 montre une activité qui correspond à des variations de calcium répétées dans les noyaux. Ces variations apparaissent dans les 10 premières minutes après contact dans plus de 90% des cellules observées et sont différentes des oscillations calciques observées en réponse au chitotétraose (CO4) (**Figure 2.16.B**). En effet, les oscillations en réponse au CO4 correspondent à des pics asymétriques, tandis que celles observées en réponse à la fraction P2F1 correspondent à des pics symétriques. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant la fraction P2F1 à 100 µg/mL, mais le pourcentage de cellules qui répondent à cette concentration est plus faible (résultats non montrés).

De façon surprenante, des oscillations calciques ont été obtenues sur la plante sauvage en réponse aux fractions de contrôle protéique P2.1 et P2.2 (**Figure 2.16.A**). Néanmoins, ces oscillations calciques sont constituées de pics asymétriques semblables à ceux observés en réponse au CO4, et diffèrent donc clairement de ce qui est observé en réponse à P2F1 et P2F2. Ces réponses sont peut être liées à la présence de contaminants

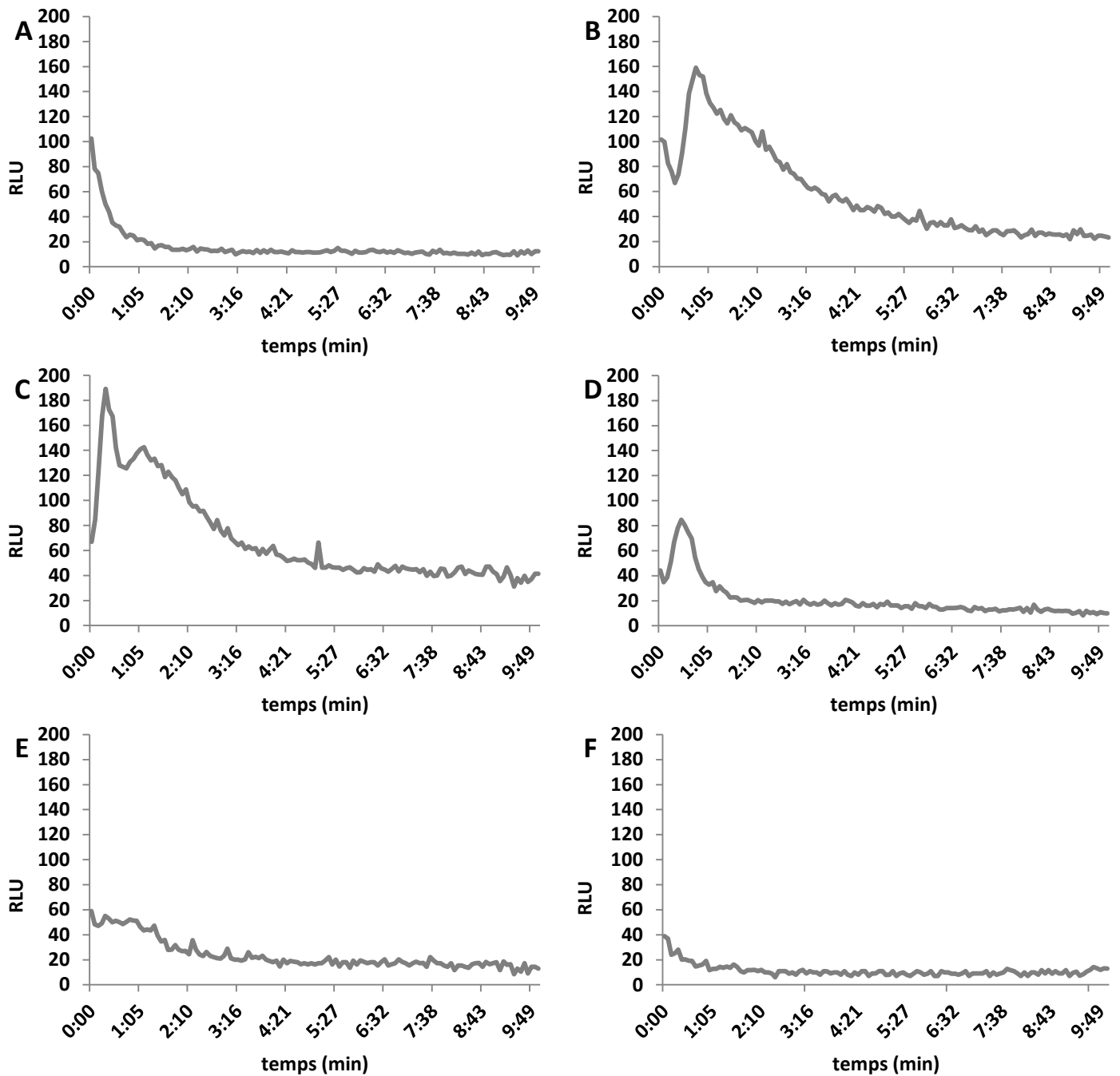


**Figure 2.17 :** Profils représentatifs des variations de calcium observées dans les noyaux des cellules de racines de *M.truncatula*

**A :** Racines WT traitées à l'eau. **B :** Racines WT traitées avec le chitotétraose (CO4) à  $10^{-8}$ M. **C :** Racines WT traitées avec la fraction P2F1 à 1 mg/mL. **D :** Racines mutantes *nfp-2* traitées avec la fraction P2F1 à 1 mg/mL. **E :** Racines mutantes *dmi1-1* traitées avec la fraction P2F1 à 1 mg/mL. **F :** Racines mutantes *dmi2-2* traitées avec la fraction P2F1 à 1 mg/mL.

mineurs, dont l'activité biologique ne se manifeste pas en présence des chitosaccharides des fractions P2F1 et P2F2.

Afin de déterminer si la voie de signalisation symbiotique était impliquée dans la réponse calcique observée pour la fraction P2F1, des essais ont été réalisés sur des racines caméléon mutantes pour les gènes *NFP*, *DMI1* et *DMI2*. La fraction P2F1 à 1 mg/mL induit les mêmes variations calciques chez les mutants *nfp-2*, *dmi1* et *dmi2* que chez la lignée sauvage (**Figure 2.17**). Ceci suggère l'indépendance de cette réponse par rapport à la voie symbiotique.



**Figure 2.18:** Mesure en cinétique de l'influx de calcium nucléaire chez *A.thaliana* en réponse au traitement avec les fractions de paroi d'*A.euteiches*

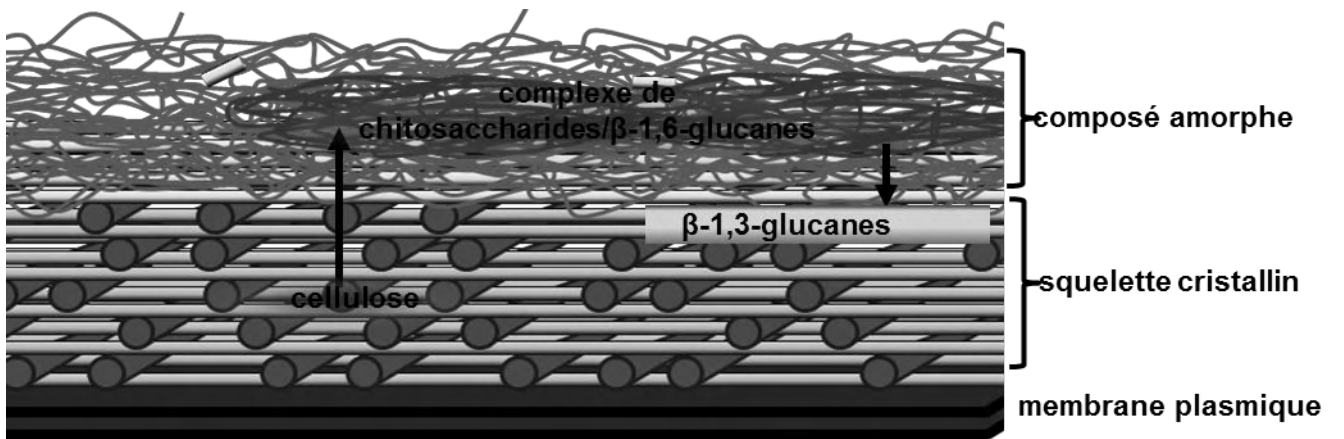
A: Eau. B: COs DP7 à 100 µg/mL. C: P60F1 à 100 µg/mL. D: P60F2 à 100 µg/mL. E: P2F1 à 100 µg/mL. F: P2F2 à 100 µg/mL. Les résultats présentés sont les moyennes de trois répétitions biologiques.

## 2.2. ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES CHITOSACCHARIDES CHEZ

### ***A.THALIANA***

La plante modèle *A.thaliana* a été utilisée dans le but de déterminer si les composés riches en NAG d'*A.euteiches* sont perçus par une plante non hôte. Aucune production d' $H_2O_2$  n'a pu être mise en évidence chez *A.thaliana* suite au contact avec les fractions de paroi d'*A.euteiches*, par des mesures en cinétique (résultats non montrés).

Un autre signal cellulaire, la variation de concentration en calcium cytoplasmique, a été étudié en réponse aux fractions de paroi. Ceci a été réalisé grâce à l'utilisation d'*A.thaliana* No-O exprimant dans le cytoplasme l'apoequorine (Sedbrook *et al.*, 1996), qui forme un complexe avec la coelenterazine dont l'interaction avec le calcium résulte en l'émission de lumière. Les COs de chitine (COs DP7) induisent un signal qui débute après 30 secondes, atteignant un maximum à 1 minute suivi d'un léger épaulement entre 1 et 2 minutes, et s'achève après 5 minutes (**Figure 2.18 B**). Le signal induit par la fraction P60F1 présente une allure similaire à celle du signal en réponse aux COs DP7, mais débute à 10 secondes. Pour la fraction P60F2, le signal est plus faible que pour les COs de chitine et que pour la P60F1. Il débute vers 20 secondes, atteint un pic à 30 secondes et s'achève après 1 minute. La fraction P2F1 induit un signal faible mais bien distinct du témoin négatif, qui se prolonge jusqu'à 1 minute et 30 secondes. Enfin, La fraction P2F2 n'induit aucun signal. Les contrôles protéiques n'induisent également aucun signal calcique chez *A.thaliana* (résultats non montrés). Les signaux observés sont différents d'une fraction à l'autre et se distinguent parfaitement du signal induit par les COs de chitine. Ces résultats montrent que les composés des fractions d'*A.euteiches* de poids moléculaire supérieur à 1.6 kD sont perçus par *A.thaliana*, avec une signature calcique spécifique à chaque fraction.



**Figure 2.19:** Modèle de la paroi d'*A. euteiches*

## **DISCUSSION**

Les objectifs du travail présenté dans ce chapitre étaient d'extraire les chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches* et de les purifier afin d'étudier leur structure, leur perception et leur activité biologique chez la plante hôte *M.truncatula*.

Les résultats obtenus après hydrolyses de la paroi par des enzymes d'activités distinctes suggèrent que les chitosaccharides sont liés en particulier à des glucanes contenant des liaisons  $\beta$ -1,6. Après un travail de purification, les analyses de liaisons par perméthylation des sucres, RMN et spectrométrie de masse ont permis de montrer qu'une partie de la NAG est impliquée dans des liaisons  $\beta$ -1,6 et ont révélé la présence d'oligomères composés à la fois de glucose et de NAG dans les fractions de parois hydrolysées, ce qui n'a jamais été rapporté jusqu'ici chez un oomycète. D'autre part, l'étude de l'activité biologique chez *M.truncatula* et *A.thaliana* les fractions de parois hydrolysées a montré que les réponses induites chez ces deux plantes par ces fractions de parois d'*A.euteiches* sont très souvent distinguables de celles induites par les COs de chitine. Cela indique que les COs de chitine et les chitosaccharides sont des signaux distincts.

L'analyse par RMN du solide des parois PAW a révélé la présence probable de glucosamine. La comparaison du spectre des parois PAW avec celui d'un hydrolysate de paroi déprotéinisée suggère que le traitement de déprotéinisation est responsable de la disparition du signal correspondant à la glucosamine. Nous pouvons supposer que la glucosamine provenait des protéines encore présentes dans les parois PAW, comme par exemple dans les ancrés GPI. Le traitement des parois PAW avec de la soude afin d'éliminer les protéines ayant provoqué une perte importante de matériel, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la glucosamine soit impliquée dans des polymères peu représentés dans les parois PAW, devenus non détectables dans les parois PAW-NaOH.

Les résultats obtenus par l'approche enzymatique fondée sur l'utilisation d'hydrolases pures, combinés aux résultats obtenus par Badreddine *et al.* (2008), nous permettent de construire un premier modèle de la paroi d'*A.euteiches* (**Figure 2.19**). Par analogie avec l'organisation de la paroi de *S.cerevisiae* et d'*Aspergillus fumigatus*, les  $\beta$ -1,3-1,6-glucanes pourraient présenter des liaisons covalentes avec le squelette cristallin, soit la





## Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches*

cellulose et les  $\beta$ -1,3-glucanes linéaires dans le cas des oomycètes (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003; Bernard and Latgé, 2001; Kollar *et al.*, 1995; Kollar *et al.*, 1997; Latgé *et al.*, 2005). La localisation exacte des chitosaccharides au sein de la paroi d'*A.euteiches* n'a pas pu être mise en évidence par les méthodes employées. Toutefois, certains indices nous permettent de proposer une hypothèse quant à leur localisation et leurs liaisons avec les autres polymères de la paroi. Leur accessibilité au marquage par la WGA-FITC ainsi que leur nature non cristalline indiquent que les chitosaccharides se situent dans le composant amorphe, et sont en partie exposés à la surface de la paroi (Badreddine *et al.*, 2008). L'approche enzymatique a montré que les chitosaccharides sont liés de façon proche à des chaînes de glucanes comportant des liaisons  $\beta$ -1,6. Cette approche a aussi montré des liaisons avec les  $\beta$ -1,3-glucanes et la cellulose, ce qui est cohérent avec l'effet négatif de la nikkomycine Z, un inhibiteur des chitine synthases, sur la croissance du micro-organisme (Badreddine *et al.*, 2008). Cela indique la participation des chitosaccharides à l'intégrité de la paroi d'*A.euteiches*, et donc la liaison des chitosaccharides aux glucanes squelettiques.

Dans le but de réaliser une caractérisation complète des chitosaccharides au niveau structural et de leur activité biologique, leur extraction et leur purification ont été entreprises. Nous avons préféré une méthode d'extraction enzymatique à une méthode chimique.

Afin d'éliminer au maximum les glucanes de la paroi, nous avons réuni dans un mélange enzymatique des activités endo et exo  $\beta$ -1,3-glucanases, ainsi que des activités  $\beta$ -1,4-glucanases. A cela, nous avons ajouté une activité endo  $\beta$ -1,6-glucanase qui est inconnue chez les plantes, mais qui peut être produite par *A.euteiches* (Badreddine, Lafitte et Bottin, non publié). L'utilisation de ce mélange enzymatique a permis de solubiliser la totalité de la paroi. Les profils de séparation des fragments de paroi par chromatographie de filtration moléculaire indiquent que l'hydrolyse enzymatique a libéré des fragments se répartissant sur une large gamme de poids moléculaires. Suite à cette séparation, la totalité du glucose et de la NAG est conservée, aucune perte de matériel au cours du processus d'hydrolyse et de séparation n'a été déplorée.

De façon surprenante, nous avons constaté que le tiers de la NAG (34%) se situe dans la fraction de plus petit poids moléculaire (P2F3). Etant donné l'absence d'activité chitinase dans le mélange enzymatique, ce résultat signifie que 34% de la NAG de la paroi constitue

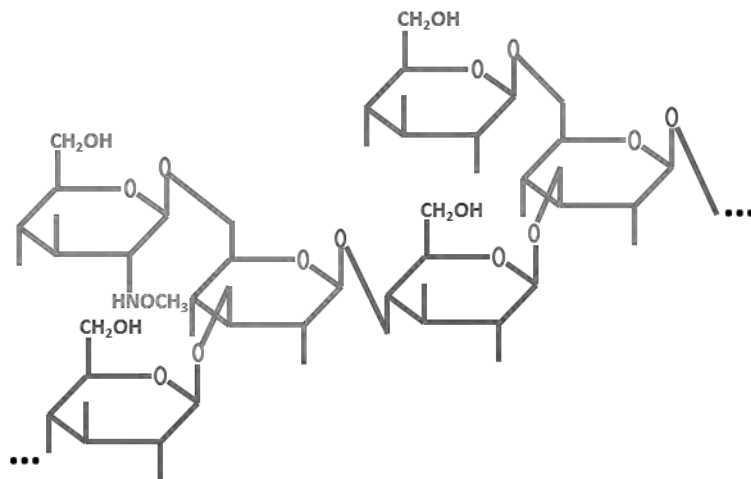


des assemblages très courts, de moins de 3 résidus. A l'opposé, la fraction de plus haut poids moléculaire (P60F1) est la seconde plus abondante en NAG (27%), ce qui indique que 27% de la NAG est impliqué dans des polymères de grande taille. Cela suggère que les chitosaccharides se répartissent en au moins deux populations. La première est une population de chitosaccharides très courts, associée à des polymères de glucose moins complexes, sensibles aux enzymes. La seconde est associée à des polymères de glucose qui présentent vraisemblablement des structures complexes les rendant relativement insensibles aux glucanases, et est donc une population de chitosaccharides ne pouvant être libérés facilement.

Les analyses de liaisons par méthylation des sucres ont révélé que seulement 1% de la NAG totale des fractions analysées est impliqué dans des liaisons  $\beta$ -1,4, ce qui est cohérent avec l'absence de chitine cristalline. La majorité (81%) des résidus NAG est en position terminale, ce qui implique que la plupart des résidus NAG est liée directement à du glucose. La liaison directe entre le glucose et la NAG a été confirmée par l'analyse par spectrométrie de masse des composés présents dans les fractions de paroi d'*A.euteiches*.

Nos résultats rappellent la liaison entre la NAG et le glucose au sein des parois des microorganismes qui a été observée chez *S.cerevisiae* et *A.fumigatus*, où les chaînes de chitine peuvent se connecter aux polymères de  $\beta$ -1,3/1,6-glucanes par une liaison  $\beta$ -1,4 (Fontaine *et al.*, 2000; Kollar *et al.*, 1995; Kollar *et al.*, 1997).

Les 18% restants de NAG sont engagés dans des liaisons  $\beta$ -1,6, ce qui n'a jusqu'à aujourd'hui jamais été observé dans la paroi d'un oomycète ou d'un champignon. Ce type de liaison entre résidus NAG a été mise en évidence dans le poly- $\beta$ -1,6-linked *N*-acétylglucosamine (PNAG), l'un des constituants principaux des biofilms formés par de nombreuses bactéries pathogène des animaux, responsable de maladies nosocomiales, et en particulier chez le genre *Staphylococcus* (Cerca *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2009; Grachev *et al.*, 2011; Jabbouri and Sadovskaya, 2010; Lasa, 2006; Yakandawala *et al.*, 2011). De façon intéressante, le PNAG est connu pour son immunogénicité chez les animaux, mais aussi pour son rôle important dans l'adhésion d'*Escherichia coli* aux jeunes plantes germées de luzerne et sur les racines de tomate (Maira-Litran *et al.*, 2002; Matthyse *et al.*, 2008). Le PNAG est hydrophile et se lie potentiellement aux composés hydrophiles de la paroi des cellules des racines (Matthyse *et al.*, 2008). Un rôle similaire peut être envisagé pour les chitosaccharides contenant de la NAG liée en  $\beta$ -1,6.



**Figure 2.20 :** Hypothèse de structure de molécules contenues dans la fraction P2F2

A la lumière des résultats d'analyse de liaisons (**Figure 2.7**), la présence de COs de chitine dans les fractions P60F2 et P2F2 semble peu probable, et très faible dans les fractions P60F1 et P2F1. Si l'on regarde de plus près la fraction P2F1, celle-ci est constituée de 57.6% de glucose et 41.3% de NAG. 78.2% de la NAG est liée en position terminale à l'extrémité non réductrice, 1.7% est impliqué dans des liaisons 1,4 et 20.1% est impliqué dans des liaisons 1,6. Il y a beaucoup plus de NAG en position terminale que de NAG impliquée dans des chaînes, 1,4 ou 1,6. Il y a donc au minimum 60% de NAG en position terminale qui est liée à du glucose. Les molécules de cette fraction ont des tailles théoriques supérieures à sept résidus. Nous pouvons donc supposer que la grande majorité des molécules comprises dans la fraction P2F1, soit environ 80%, sont des hétéroooligomères de glucose et de NAG.

Les analyses par RMN de la fraction P2F2 ont permis d'émettre une première hypothèse de structure possible de ces hétéropolymères. Ils seraient constitués d'un squelette de glucoses liés alternativement par des liaisons 1,3 et 1,4. Les glucoses liés en 1,3 seraient les points de ramification sur leur carbone 6 avec des résidus NAG ou glucose (**Figure 2.20**). Dans cette hypothèse de structure, les liaisons 1,6-NAG et 1,4-NAG ne sont pas représentées. Des analyses complémentaires sur les fractions de parois hydrolysées seront nécessaires pour comprendre la structure complète de ces molécules.

L'analyse des fractions de parois hydrolysées par spectrométrie de masse a mis en évidence la présence de ces hétéropolymères de NAG et de glucose dans les fractions P60F1, P2F1 et P2F2. La molécule la plus grande est détectée dans la fraction P2F1 et est constituée de neuf résidus, six de glucose et trois de NAG. Il est intéressant de constater qu'au moins une molécule, constituée de quatre glucoses et une NAG, a été détectée dans deux fractions (P2F1 et P2F2), suggérant que les différentes fractions de parois hydrolysées peuvent avoir des motifs structuraux communs expliquant par exemple leurs activités communes d'induction des gènes associés à la défense (**Figure 2.13**).

**Tableau 2.14 :** Récapitulatif des principales informations concernant l'activité biologique des quatre fractions de parois hydrolysées et déprotéinisées d'*A.euteiches*

	<b>P60F1</b>	<b>P60F2</b>	<b>P2F1</b>	<b>P2F2</b>
<b>Gamme de masse moléculaire (kDa)</b>	>51	51-3.5	>1.6	1.6-0.75
<b>Proportion de glucose (%)</b>	50.9	53.2	59.8	77.1
<b>Proportion de NAG (%)</b>	48.7	46.8	40.2	22.8
<b>Induction de la production de ROS chez <i>M.truncatula</i></b>	non	faible	faible	forte
<b>Induction de l'expression de gènes relatifs à la défense chez <i>M.truncatula</i></b>	oui	oui	oui	oui
<b>Induction d'oscillations calcique nucléaires répétées chez <i>M.truncatula</i></b>	non	non	oui	non
<b>Induction de la production de ROS chez <i>A.thaliana</i></b>	non	non	non	non
<b>Induction d'un influx calcique nucléaire chez <i>A.thaliana</i></b>	fort	faible	faible	non

Pour déterminer si les molécules contenues dans les fractions de parois hydrolysées sont perçues et sont capable d'induire la défense chez les plantes, l'activité biologique des fractions a été évaluée chez *A.thaliana* et *M.truncatula* (**Tableau 2.14**).

Aucune des quatre fractions n'a montré une capacité à induire la production de ROS chez *A.thaliana* contrairement aux COs de chitine, ce qui suggère qu'aucune d'entre elles ne contient de quantité significative de COs de chitine, en accord avec les analyses biochimiques. La fraction P60F1 induit très peu la production de ROS chez *M.truncatula*, mais induit un influx de calcium nucléaire important chez *A.thaliana*. Les fractions P60F2 et P2F1 induisent une production de ROS faible chez *M.truncatula* et un influx de calcium nucléaire faible mais détectable chez *A.thaliana*. Enfin, la fraction P2F2 induit une forte production de ROS chez *M.truncatula* mais pas d'influx de calcium nucléaire chez *A.thaliana*. Ceci montre que pour certaines réponses les différentes fractions ont des activités biologiques différentes, ce qui peut correspondre à des différences en termes de motifs moléculaires accessibles aux systèmes de perception végétaux. Les quatre fractions utilisées présentent néanmoins une activité élicitrice chez *M.truncatula*, en ce qu'elles induisent toutes l'expression de gènes associées à la défense induits par les COs DP7 et la flagelline. Cette activité élicitrice ne peut être liée à la présence de COs de chitine, dont la présence n'a pas été révélée par les analyses structurales chez P60F2 et P2F2, et dont les concentrations maximum théoriques en chitoheptaose seraient respectivement de 0.9 nM et 0.15 nM pour P60F1 et P2F1, aux concentrations utilisées pour les traitements.

Parmi ces quatre fractions, la fraction P2F1 induit des variations calciques répétées dans les noyaux de cellules de racine de *M.truncatula*. Sur la base de la proportion de NAG liées en 1,4, la concentration théorique en CO4 dans la fraction P2F1 serait de 8.4  $\mu$ M pour la concentration en fraction utilisée, ce qui serait suffisant pour induire des oscillations calciques, et un trimère de NAG a été détecté en spectrométrie de masse. Si il correspondait à du chitotriose, il pourrait par lui-même des oscillations calciques (M. Chabaud, communication personnelle). Pour la fraction P60F1, la concentration en CO4 serait à 12  $\mu$ M, mais pourtant cette fraction n'induit pas d'oscillations calciques. De plus, les oscillations calciques induites par les COs sont asymétriques, tandis que celles induites par la fraction P2F1 sont symétriques (**Figure 2.16 B**), et elles dépendent de *DMI1* et *DMI2* (M. Chabaud, communication personnelle), tandis que celles induites par P2F1 n'en dépendent pas. Ces





résultats montrent que l'induction d'oscillations calciques par la fraction P2F1 n'est pas dûe à la présence de COs de chitine.

De façon surprenante, les fractions contrôle P2.1 et P2.2 ont aussi montré une capacité à induire des oscillations calciques, mais dont la signature est similaire à celle obtenue en réponse au CO4, avec des pics asymétriques. La recherche par spectrométrie de masse à haute sensibilité de COs contaminants dans ces témoins est actuellement en cours. Enfin, des oscillations calciques présentant des pics symétriques, comme observées en réponse à P2F1, ont été reproduites récemment en utilisant de la laminarine déprotéinisée (A. Bottin, C. Lafitte et M. Chabaud, communication personnelle), suggérant que le phénomène observé en réponse à P2F1 pourrait être lié à la partie glucane des molécules contenues dans cette fraction.

Il est intéressant de constater que les différences observées entre les fractions pour leur capacité à induire la production ROS et les oscillations calciques ne reflètent pas la capacité de ces fractions à induire l'expression de gènes relatifs à la défense. En effet les quatre fractions induisent de façon similaire ces gènes. L'absence d'induction précoce de production de ROS et d'oscillations calciques par la fraction de plus haut poids moléculaire pourrait être due à une différence au niveau des cinétiques de perception en raison d'empêchements stériques ralentissant la diffusion des composés actifs à travers la paroi cellulaire et leur interaction avec le(s) récepteur(s). L'absence d'induction d'oscillations calciques par la fraction de plus petit poids moléculaire suggère que ces dernières ne sont pas requises pour l'induction des gènes associés à la défense. Ceci pourrait être étudié par une approche pharmacologique, en utilisant par exemple un inhibiteur des canaux ioniques tel que le  $\text{LaCl}_3$ .

La protéine NFP est un récepteur potentiel possédant des domaines LysM, pour lesquels la liaison à la NAG est possible. Les mutants *nfp-1* et *nfp-2* présentent une déficience dans l'établissement de la symbiose rhizobienne et une altération des réponses aux LCOs symbiotiques. D'autre part, ces deux mutants présentent une tolérance diminuée à l'infection par *A.euteiches* (T. Rey *et al.*, 2013), dont la paroi contient des composés à NAG (Badreddine *et al.*, 2008). Ces observations ont soulevé l'hypothèse de l'implication possible du récepteur NFP dans la perception des chitosaccharides pariétaux d'*A.euteiches*. Pourtant, les plantes mutantes *nfp-1* et *nfp-2* ont présenté des productions de ROS similaires à celles de la plante sauvage en réponse aux traitements par les quatre fractions de parois



hydrolysées. De même, aucune différence entre la plante sauvage et ces deux mutants n'a pu être mise en évidence par l'analyse de l'expression de gènes relatifs à la défense. Il est possible que NFP ne soit pas impliqué dans la perception des chitosaccharides pariétaux d'*A.euteiches*, mais nous ne pouvons pas exclure que NFP soit à l'origine de mécanismes inhabituels de résistance lors de l'infection par *A.euteiches*, tels que la division des cellules du péricycle (Rey *et al.*, 2013), auxquels nous ne nous sommes pas encore intéressés. Il est aussi possible que les fractions de parois hydrolysées présentent encore une hétérogénéité de molécules trop importante pour permettre la mise en évidence l'implication de NFP de la perception des chitosaccharides d'*A.euteiches*.

Les molécules contenues dans les fractions de parois d'*A.euteiches* hydrolysées sont différentes des COs de chitine, et certaines sont capables d'induire des signatures calciques originales chez les plantes. Ces résultats conduisent à se poser de nombreuses questions en ce qui concerne les programmes induits chez les plantes par ces composés, et en particulier chez *M.truncatula* : La perception de ces composés conduit-elle à l'activation d'un programme de défense ou d'acceptation chez la plante ? Implique-t-elle un récepteur à domaine LysM spécifique ou également impliqué dans la symbiose ? Quelle est la signification des oscillations calciques induites et par quelle voie sont-elles contrôlées ? Afin d'apporter des éléments de réponse, une étude complète du transcriptome comparant les mutants *nfp-1* et *nfp-2* avec la lignée sauvage permettra de progresser dans l'étude de l'implication du récepteur NFP dans la perception des chitosaccharides. La fraction P2F1 est constituée d'hétéroooligomères de glucose et NAG, qui ont été observés par spectrométrie de masse, elle présente une activité élicitrice comparable aux autres fractions, elle induit des variations calciques originales chez *M.truncatula*. Elle a donc été retenue pour traiter des racines de plantes sauvages et de plantes mutantes *nfp-1* et *nfp-2* de *M.truncatula*, de façon à réaliser une analyse transcriptomique, actuellement en cours.

L'étude de l'activité biologique des chitosaccharides d'*A.euteiches* nécessitera de mieux séparer les différentes espèces moléculaires contenues dans les fractions de parois hydrolysées, de synthétiser les composés majeurs des fractions actives et d'étudier pour chacun d'entre eux l'activité biologique et la perception par le récepteur NFP. L'utilisation des constructions promoteur-luciférase générées au chapitre 1 facilitera ce travail. Pour chaque espèce moléculaire isolée, la capacité à induire la production de molécules antimicrobiennes ainsi que la protection contre l'infection par *A.euteiches*, et d'autres



*Chapitre 2 : Caractérisation structurale et activité biologique des chitosaccharides  
d'A.euteiches*

microorganismes pathogènes, ainsi que leur capacité à perturber les programmes symbiotiques, sera à déterminer. L'implication potentielle d'autres récepteurs à domaines LysM et la liaison physique des récepteurs aux ligands seront à étudier pour comprendre les mécanismes physico-chimiques sous-jacents à la reconnaissance de ces molécules particulières. Ce vaste programme ne pourra se réaliser qu'avec des moyens conséquents, humains et techniques.



## **CONCLUSION GENERALE**





## Conclusion Générale

*A.euteiches* est un oomycète parasite des légumineuses, dont la biologie est encore peu connue. La découverte de composés originaux constitués de NAG dans sa paroi par Badreddine *et al.* (2008), a placé ce microorganisme au cœur de la problématique de la signalisation croisée entre symbiose et défense. La capacité de récepteurs à domaines LysM à reconnaître des chitooligosaccharides éliciteurs et la mise en évidence d'une tolérance à l'infection par *A.euteiches* diminuée chez les mutants du récepteur NFP, récepteur à domaines LysM impliqué dans la perception de signaux symbiotiques contenant de la NAG (LCOs) chez la légumineuse modèle *M.truncatula*, ont renforcé cette idée. Dans le but d'identifier un composé à NAG éliciteur potentiel provenant des parois d'*A.euteiches* et de progresser dans la compréhension de l'implication de NFP dans la signalisation croisée entre symbiose et défense, la purification des chitosaccharides et l'étude de leur structure et de leur activité biologique, chez *M.truncatula*, ont été entreprises.

Afin de pouvoir étudier l'activité biologique des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches*, la première partie de mes travaux a consisté à mettre au point un bioessai sur les racines de *M.truncatula* permettant d'étudier des réponses associées à la défense suite à des traitements avec des éliciteurs. Il a paru intéressant d'avoir un éliciteur contrôle dont la nature se rapproche de celle des chitosaccharides. Une méthode pour produire une préparation de fragments de chitine de DP élevés, complètement acétylés et solubles, a donc été développée.

Des fragments de chitine de crabe partiellement hydrolysée ont été séparés en fonction de leur taille par chromatographie de filtration moléculaire. Les fractions obtenues ont été caractérisées en termes de DP, solubilité et degré d'acétylation, en combinant des analyses par RMN du solide et par RMN du liquide. Ces analyses ont permis d'aborder le problème de la solubilité des COs de DP élevés et leur agrégation après lyophilisation. Nous avons obtenu en quantité importante une fraction de COs de DP moyen 7, complètement acétylée et soluble. L'utilisation du mutant *cerk1* d'*A.thaliana* a permis d'attester que cette préparation de COs de chitine n'est pas contaminée par d'autres d'éliciteurs. Cette préparation a été utilisée pour développer un bioessai d'élicitation sur les racines de *M.truncatula*. Ce bioessai consiste à cultiver la plante en conditions hydroponiques, puis le milieu de culture est remplacé par la solution d'éliciteur et un prélèvement du milieu est effectué à 20 minutes afin de doser la production précoce de ROS extracellulaires. Les



## Conclusion Générale

plantes peuvent être incubées pour des temps plus longs et les racines prélevées pour faire des analyses d'expression génique. Ce bioessai présente une sensibilité élevée, un débit important et est simple à réaliser. A présent que les conditions d'élicitation avec des COs en mélange ont été optimisées, les travaux futurs porteront sur l'activité biologique de COs purs chez *M.truncatula* afin de déterminer le DP nécessaire à l'activation de la défense et de la protection et à étudier l'impact du DP sur les réponses symbiotiques, si il y a lieu. Notre essai a montré sa capacité à mettre en évidence la présence d'une activité élicitrice dans un échantillon biologique, tel que le filtrat de culture d'*A.euteiches*. Cela ouvre la perspective de pouvoir identifier de nouveaux MAMPs, au cours de processus de purification, en se basant sur l'activité biologique.

La seconde partie de mes travaux a eu pour but de caractériser la structure des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches*, d'en étudier l'activité biologique sur les racines de *M.truncatula*, plante hôte du microorganisme, et d'étudier l'implication du récepteur NFP dans leur perception.

Dans un premier temps, l'étude des liaisons par une approche enzymatique entre les chitosaccharides et les autres polysaccharides de la paroi a donné des résultats cohérents avec ceux précédemment obtenus au cours des travaux de thèse d'Ilham Badreddine et a permis de construire un premier modèle de la structure de la paroi d'*A.euteiches*. Dans ce modèle les chitosaccharides se situent au sein du composant amorphe de la paroi et sont liés d'abord avec des glucanes comportant des liaisons  $\beta$ -1,6, mais présentent également des liaisons avec les autres polymères de nature cristalline. Cette hypothèse prend ainsi en compte non seulement leur nature non cristalline mais aussi leur implication dans l'intégrité de la paroi. Pour aller plus loin dans cette étude des chitosaccharides, leur purification a été entreprise. La méthode d'extraction choisie est une méthode enzymatique qui présente l'avantage de se rapprocher de la réalité biologique et est la seule permettant potentiellement d'éliminer les glucanes en conservant les chitosaccharides. Nous avons obtenu des fractions de paroi enrichies en NAG. Les analyses de liaisons par méthylation des sucres ont indiqué la présence de liaisons 1,6 et peu de liaisons 1,4 sur les résidus NAG, et qu'environ 80% de la NAG est liée en position terminale, ce qui suggère qu'une grande partie de la NAG est liée à du glucose. Les analyses par RMN ont permis de proposer une première hypothèse de structure pour ces molécules, qui seraient des hétéroooligomères où



## Conclusion Générale

des résidus NAG sont liés à un squelette de glucose dont les liaisons sont alternées en 1,3 et 1,4. Les analyses par spectrométrie de masse ont révélé la présence de molécules constituées de NAG et glucose, dont la plus complexe détectée est constituée de trois NAG et six glucoses. De telles molécules n'ont jamais été décrites auparavant dans la paroi d'un oomycète, ce qui constitue une grande nouveauté dans les connaissances actuelles concernant les oomycètes.

Dans un second temps, le bioessai développé au cours de la partie précédente a été mis à contribution pour étudier l'activité biologique des fractions de parois enrichies en chitosaccharides, sur les racines de *M.truncatula*. Plusieurs aspects de l'activité biologique de ces fractions ont indiqué qu'elle se distingue clairement de l'activité biologique de COs de chitine. L'induction de la production de ROS par ces fractions chez *M.truncatula* suit une cinétique nettement différente de celle élicitée par des COs de chitine, et chez *A.thaliana* ces fractions sont incapables d'induire les ROS contrairement aux COs de chitine. Chez *M.truncatula* la fraction P2F1 induit des variations calciques nucléaires, qui sont différentes de celles observées en réponse à des COs de chitine, mais similaires à celles observables en réponse à de la laminarine. Les variations induites par P2F1 se sont révélées être indépendantes de *NFP* et de la voie symbiotique qui fait intervenir *DMI1* et *DMI2*, suggérant une transduction cellulaire différente et excluant la possibilité qu'elles sont induites par la présence de COs ou LCOs dans cette fraction. En dépit des différences au niveau biochimique et des activités biologiques qui distinguent les fractions de paroi les unes des autres, elles sont capables d'induire des gènes relatifs à la défense avec les mêmes intensités, suggérant que les réponses ROS et calciques observés ne sont pas nécessaires à l'induction des gènes associés à la défense par ces molécules. Cela peut aussi indiquer que les molécules capables d'induire de la défense sont présentes dans toutes les fractions mais que les molécules responsables de l'induction des réponses ROS ou calciques ne sont pas présentes dans toutes les fractions. L'indépendance potentielle de l'induction des gènes de défense vis-à-vis de la génération de ROS extracellulaires et/ou d'oscillations calciques nucléaires devrait être confirmée par des approches complémentaires, utilisant par exemple des agents pharmacologiques.

Le rôle biologique des chitosaccharides de la paroi d'*A.euteiches* reste incertain. Dans la paroi du microorganisme, ils jouent clairement un rôle dans l'intégrité de la paroi (Badreddine *et al.*, 2008). Les résultats de nos travaux suggèrent plusieurs hypothèses quant



## Conclusion Générale

à leur rôle au cours de l'interaction avec la plante. Nous avons mis en évidence la présence de NAG liée en  $\beta$ -1,6 qui pourrait avoir un rôle d'adhésion aux polymères hydrophiles de la paroi végétale, comme cela est le cas dans le PNAG des bactéries (Maira-Litran *et al.*, 2002; Matthyse *et al.*, 2008). Cette hypothèse pourrait être abordée soit par une approche pharmacologique avec la nikkomycine Z, soit par inactivation du gène impliqué dans la biosynthèse de ces composés, qui reste à identifier, même si l'un des deux gènes de chitine synthase d'*A.euteiches* pourrait avoir ce rôle (Badreddine *et al.*, 2008). Malheureusement, la transformation stable de ce microorganisme a été, jusqu'à ce jour, infructueuse. La présence des chitosaccharides à toutes les étapes du cycle de développement du microorganisme où il est doté d'une paroi, et leur rôle dans l'intégrité pariétale, suggèrent qu'ils sont sources de MAMPs (Badreddine *et al.*, 2008). Nos travaux ont indiqué que les fractions de paroi, enrichies en NAG, sont perçues et induisent des gènes relatifs à la défense, soutenant ainsi cette hypothèse. Toutefois, leur quantité importante dans la paroi et leur exposition en surface pourraient indiquer qu'ils jouent un rôle de leurre pour tromper la plante et induire des mécanismes inadaptés, ou, à la manière d'un effecteur, interférer avec la mise en place des défenses de la plante (Aslam *et al.*, 2008; Fujikawa *et al.*, 2012). Afin de confirmer l'importance de la NAG dans l'activité biologique de ces molécules, on pourrait tester l'effet de la déacétylation des résidus NAG, qui devrait modifier leur activité, comme cela est observé pour la désacétylation de la chitine en chitosan qui présente une activité élicitrice plus faible, ou de l'hydrolyse par des N-acétylglucosaminidases (pourvu qu'il en existe qui soient capables d'agir sur ces molécules) (El Gueddari *et al.*, 2002). Pour mieux comprendre le rôle possible des chitosaccharides au cours de l'interaction avec la plante, l'étude du transcriptome de la plante après son traitement par la fraction P2F1 est une étape importante. Elle permettra d'émettre des hypothèses sur les mécanismes qui se mettent en place en réaction au traitement et par comparaison avec le programme induit chez les mutants *nfp-1* et *nfp-2*, sur l'implication du récepteur NFP. La réalisation d'expériences de protection, de co-traitements avec des COs de chitine et des LCOs symbiotiques ainsi que l'étude d'autres mutants des récepteurs LysM sont autant d'expériences qui permettront de déterminer si les chitosaccharides ont un rôle éliciteur ou au contraire sensibilisateur, comme cela a pu être observé par le passé pour certains glucanes (Fujikawa *et al.*, 2012). Enfin, le rôle des variations calciques induites par les glucanes-chitosaccharides sera à déterminer soit par des approches pharmacologiques, soit en identifiant des mutants





## *Conclusion Générale*

impliqués dans ces variations originales et en les étudiant dans le pathosystème et dans leurs interactions symbiotiques. Les informations apportées par ces travaux contribueront à une meilleure compréhension du rôle de la NAG dans les parois des oomycètes et au cours des interactions avec les plantes.



# **MATERIEL ET METHODES**



## **MATÉRIEL BIOLOGIQUE**

### **1. APHANOMYCES EUTEICHES**

#### **1.1. MAINTIEN DE LA SOUCHE**

La souche d'*A.euteiches* utilisée pour cette étude est la souche ATCC201684, un isolat de pois originaire du Danemark. La culture et le maintien du mycélium se font par repiquage mensuel sur milieu CMA (Corn Meal Agar, Sigma-Aldrich). Les boîtes sont incubées à l'obscurité, d'abord à 24°C pour une période de croissance de 2 semaines, puis à 15°C pour stockage. Pour la conservation de la souche sur le long terme, des explants mycéliens sont déposés sur du milieu CMA coulé incliné en tube Falcon de 50 mL. Les tubes sont parafilmés immédiatement, incubés à l'obscurité à 24°C 1 semaine, puis placés à 15°C. Ils peuvent être conservés pendant 12 mois.

#### **1.2. PRODUCTION DE ZOOSPORES**

Pour la production de zoospores d'*A.euteiches*, un explant mycélien est déposé sur milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma-Aldrich) et mis en culture à l'obscurité à 24°C. Après 3 jours de croissance, vingt explants de ce mycélium sont transférés dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de Bacto-peptone 2% et glucose 5% et incubés pendant trois jours dans les mêmes conditions. A l'issue de cette période de culture, le mycélium est lavé à trois reprises dans 150 mL d'eau de Volvic stérile par drainage et resuspension, avec un intervalle de deux heures entre chaque lavage, puis incubé dans 30 mL d'eau de Volvic à l'obscurité à 24°C pendant 16 h. Cette étape de carence permet d'obtenir une suspension de zoospores et la concentration est calculée après dénombrement à la cellule de Fuchs-Rosenthal.

**Tableau M.1** : Composition du milieu de culture synthétique d'*A.euteiches*

Macro-éléments	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,9 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	FeCl <sub>3</sub>	197 µM
Micro-éléments du milieu M	MnCl <sub>2</sub>	30 µM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24 µM
	ZnSO <sub>4</sub>	9,2 µM
	KI	4,5 µM
	CuSO <sub>4</sub>	0,52 µM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01 µM
Sources de carbone de soufre et d'azote	Glucose	69,4 mM
	L-Glutamate	20 mM
	L-Methionine	4 mM
	H <sub>2</sub> O UHQ qsp	1 L
pH ajusté à 6,2 avec du NaOH		

### 1.3. CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

Le microorganisme est cultivé en milieu synthétique liquide adapté de (Papavizas and Ayers, 1964), dans lequel les microéléments ont été substitués par les microéléments du milieu M de culture de *M.truncatula* (Bécard and Fortin, 1987) (**Tableau M.1**) pour la production de masse mycélienne, destinée à la préparation de parois. Des fioles de Roux de 1 L contenant 100 mL de milieu liquide sontensemencées avec une concentration finale de zoospores d'*A.euteiches* de  $500 \text{ cell.mL}^{-1}$ , puis placées à plat à 24°C à l'obscurité, pour une incubation d'une durée de 21 jours. Le mycélium est récolté par filtration sur verre fritté, lavé abondamment à l'eau désionisée, séché 3 minutes sur le filtre avec aspiration. Le poids frais est évalué, puis le mycélium est stocké à -80°C pour être utilisé lors la préparation de parois. Pour la description de la cinétique de croissance, le mycélium est récolté par filtration sur un filtre de nylon de 5  $\mu\text{m}$  de taille de maille. Le poids frais du mycélium est évalué, puis le mycélium est lyophilisé pour déterminer son poids sec. Le filtrat de culture est récolté suite à la filtration sur filtre de nylon, pour mesurer sa teneur en protéines, en glucose et en hexosamines.

**Tableau M.2 :** Composition des milieux de culture de *M.truncatula*

		milieu M
Macro-éléments	MgSO <sub>4</sub>	3 mM
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,2 mM
	KCl	0,9 mM
	KNO <sub>3</sub>	0,8 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,035 mM
	NaFe-EDTA	0,022 mM
Micro-éléments	MnCl <sub>2</sub>	30 μM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24 μM
	ZnSO <sub>4</sub>	9,2 μM
	KI	4,5 μM
	CuSO <sub>4</sub>	0,52 μM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01 μM
Vitamines	Myo-inositol	280 μM
	Glycine	40 μM
	Acide nicotinique	4 μM
	Pyridoxine-HCl	0,5 μM
	Thiamine-HCl	0,3 μM
	Phytigel*	5g/L
	H <sub>2</sub> O qsp	1 L

pH ajusté à 5,5 avec du KOH. \*milieu gélosé.



## **2. MEDICAGO TRUNCATULA**

La lignée A17 du cultivar Jemalong, issue de la collection 'core' gérée par J.M. Proserpi (INRA de Montpellier), tolérante à *A.euteiches*, a été utilisée. Les mutants symbiotiques *nfp1* et *nfp2* (Arrighi *et al.*, 2006), dans le fond génétique A17, ont été fournis par C. Gough (LIPM, Toulouse, France).

Les gousses du genre *Medicago* renferment en moyenne 7 à 8 graines dont la dormance doit être levée avant la mise en germination. Dans un premier temps, les graines sont scarifiées par traitement chimique à l'acide sulfurique pur pendant 5 minutes puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite stérilisées par un bain de 3 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2.5% puis rincées 4 fois à l'eau stérile. L'incubation dans le dernier bain de rinçage est maintenue pendant une heure pour permettre l'imbibition et accélérer la réhydratation des graines. Les graines sont alors transférées sur eau gélosée (agar 1%) et séchées pendant 30 min sous hotte à flux laminaire. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 22°C à l'obscurité pendant 2 jours.

Pour la réalisation de bioessais d'élicitation, les graines germées sont ensuite mises en culture en boîte de Pétri de 35 mm dans 2 mL de milieu M sans gélifiant, dit M liquide, (Bécard and Fortin, 1987) (**Tableau M.2**) à raison de 3 plantes par boîte. Les boîtes de Petri de 35mm sont placées dans des grandes boîtes carrées de 200x133 mm, à raison de 30 boîtes de 35 mm par grande boîte carrée. Les plantes sont incubées une semaine en enceinte climatique avec une photopériode de 16 h jour/8 h nuit, et une température de 22/20°C.

Les racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*, de type Hairy Roots, sont générées selon le protocole décrit par Boisson-Dernier *et al.* (2001). Les cultures obtenues sont entretenues sur milieu M gélosé, complété en saccharose à 10 g/L et repiquées mensuellement. Les cultures de racines sont entretenues à l'obscurité, à 23°C.



### **3. ARABIDOPSIS THALIANA**

Les plantes sauvages, le mutant *cerk1* et la lignée transgénique «*PR1-GUS*» sont d'écotype Columbia (Miya *et al.*, 2007; Shapiro and Zhang, 2001). La lignée «*PR1-GUS*» exprime le gène de la glucuronidase sous le contrôle du promoteur du gène *PR1*, construction dite «*PR1-GUS*», obtenue auprès d'A.D. Shapiro. Le mutant *cerk1* est un mutant d'insertion d'ADN-T dans le gène At3g21630, obtenu du centre de ressources GABI-Kat (lignée 096F09, don de S.Bensmihen, LIPM). Les graines exprimant l'apo-aequorine sont d'écotype Nossen, obtenues auprès de M. Knight (Durham University, Royaume Uni) (Sedbrook *et al.*, 1996). Les graines sont imbibées dans de l'eau pendant 1 h puis stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2,4% pendant 30 min. Après plusieurs lavages dans de l'eau stérile, elles sont semées soit en boîte de Pétri 35 mm, dans 1 mL de milieu, soit en plaque 24 puits transparente, à raison d'une graine par puits et 300 µL de milieu, soit en plaque 96 puits blanche (plaque LumiNunc™, ThermoScientific) à raison de deux graines par puits et 100 µL de milieu. Ce milieu est le milieu MS (Sigma M5519) additionné de 1% de saccharose. Les plaques sont incubées en chambre de culture (16 h jour/8 h nuit, température 22°/20°C), sous agitation circulaire les trois premiers jours (50 rpm, Agitateur Rota-test 74402, Bioblock Scientific), puis sans agitation pendant 7 jours pour les plantes exprimant l'apo-aequorine et 10 jours pour les plantes exprimant la construction «*PR1-GUS*».

Pour la production de graines, les graines sont directement semées dans du terreau commercial (mélange «H4 spécial», Treff). Le développement des plantes a lieu en chambre de culture (photopériode 16 h jour/8 h nuit, température 22°/20°C, et hygrométrie 80/40%) pendant 4 semaines. Les plantes sont transférées en serre jusqu'à maturation des siliques.



## **MÉTHODES**

### **1. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE**

#### **1.1. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE DES PROTEINES**

##### **1.1.1. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est réalisé en utilisant, soit :

(1) la méthode de dosage décrite par O. H. Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Le dosage est effectué sur 1 mL de prise d'essai auquel est ajouté 5 mL d'une solution de  $\text{CuSO}_4$ , 392  $\mu\text{M}$  ;  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ , 686  $\mu\text{M}$  ;  $\text{NaOH}$ , 98 mM ;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 185.3 mM. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 500  $\mu\text{L}$  de réactif de Folin (MERCK), dilué 2 fois dans l'eau, sont ajoutés. Après 30 min d'incubation supplémentaire à température ambiante, la densité optique (DO) est mesurée à 750 nm. Une gamme étalon est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma).

(2) une méthode de Bradford modifiée (Bradford, 1976). Le dosage est réalisé sur une prise d'essai de 250  $\mu\text{L}$  auxquels sont ajoutés 2 mL de réactif (UPF 86420 Coo Protein Assay Reagent, Interchim). Après une incubation d'1 min, la DO est mesurée à 595 nm. Cette méthode est optimisée pour mesurer jusqu'à seulement 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéines.

(3) une méthode indirecte, par dosage de l'azote total. Le dosage de l'azote total dans les parois est mesuré par dosage colorimétrique de l'azote qu'elles renferment avec le réactif de Nessler (Sigma Aldrich) (Strauch, 1965). Cette technique implique la minéralisation préalable de l'azote à l'aide d'un catalyseur au sélénium. Entre 20 mg de parois sont placés dans les tubes à minéraliser, 200  $\mu\text{L}$  du réactif de minéralisation sont ajoutés. Les tubes sont placés ensuite au thermoblock préalablement réglé à 100°C. Après 1 h 30 d'incubation, la température est augmentée à 320°C et l'incubation se poursuit pendant 30 min. Ensuite tout est effectué à température ambiante. Le volume final de la solution minéralisée est amené à 10 mL avec de l'eau UHQ, puis 2 mL sont prélevés et ajoutés à 2 mL d'eau UHQ. Ensuite 2 mL de réactif de Nessler sont ajoutés sous agitation. Une couleur jaune se forme au cours de cette réaction, son intensité atteint son maximum après 10 min et la DO est mesurée à



500nm. Une gamme étalon de 0, 5, 10, 20 et 40 µg d'azote est établie avec du sulfate d'ammonium. La concentration en protéines est déduite après soustraction de l'azote apporté par les oses aminés.

### 1.1.2. Mesure d'activité glycohydrolase

Les activités chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase ou  $\beta$ -1,6-glucanase sont évaluées en effectuant des incubations en présence de chitine colloïdale à 1%, préparée selon J. A. Rupley (Rupley, 1964), de Curdlan (d'*Alcaligenes faecalis*, Sigma) à 0.5%, ou de Pustulan (Calbiochem) à 0,5% respectivement (p/v). L'activité chitinase est évaluée en parallèle sur 100 µL et 250 µL de prise d'essai, ajustés à 1 mL avec du tampon acétate à pH 5.0 (100 mM CH<sub>3</sub>COONa, 0.5 M NaCl, 5 mM PhenylMethaneSulfonylFluoride, 0.1% Triton X100), après 2 h d'incubation à 40°C. Les activités glucanases sont évaluées sur 25 µL et 50 µL en parallèle, ajustés à 1 mL avec le tampon acétate précédemment décrit, après 30 min d'incubation à 40°C. A l'issue de ces hydrolyses, le pouvoir réducteur libéré est dosé par la méthode de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952). La spécificité endo-glycohydrolase ou exo-glycohydrolase est évaluée par l'analyse des produits d'hydrolyse par HPAEC-PAD. Les activités endo-glycohydrolase libèrent des oligosaccharides, tandis que les activités exo-glycohydrolase libèrent uniquement des monomères.

La pureté des enzymes est évaluée sur la base de leur activité enzymatique et de l'absence d'activités contaminantes. L'absence d'activité glucanase dans les préparations de chitinase est vérifiée. Inversement l'absence d'activité chitinase dans les préparations de glucanase est évaluée après 16h d'incubation. L'absence d'activité protéasique dans les préparations enzymatiques est évaluée par la méthode de M. Kunitz (Kunitz, 1952). Pour la détermination de l'activité spécifique, les protéines sont dosées par la méthode (1).





### 1.1.3. Purification de glycohydrolases

#### 1.1.3.1. Purification de chitinases et glucanases de tabac

Des cellules de tabac BY2 âgées de 12 jours, cultivées en milieu MS (Sigma M5519) additionné de 30g/L de saccharose, 0.37g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1mg/L de thiamine-HCl et 0.2mg/L d'acide 2.4-dichlorophenoxyacétique, nous sont fournies par C.Mazars (UMR 5546 CNRS/UPS, LRSV). Vingt grammes de matière fraîche sont broyés dans un mortier avec un pilon, en présence d'azote liquide. Le broyat est extrait par 150 mL de tampon acétate à pH 5.0 décrit au paragraphe précédent, à 6°C, sous agitation continue durant 30 min, puis la suspension est centrifugée 15 min à 2500 g à 4°C. Le culot est extrait une seconde fois selon le même protocole. Les surnageants sont rassemblés.

L'extrait précédemment obtenu est incubé avec du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ajusté à 20% (p/v), à 0°C durant 2 h, puis centrifugé 30 min à 10000 g, à 4°C. Le surnageant est dialysé une nuit à 4°C contre 30 L d'eau désionisée, dans un sac à dialyse (membrane «Spectra/Por 6») de limite d'exclusion 10-12 KDa. Le dialysat est additionné de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH5 en concentration finale 20mM. La solution est centrifugée 30 min à 10000g à 4°C.

Le surnageant est analysé à température ambiante sur une colonne échangeuse de cations CM sepharose équilibrée dans du  $\text{CH}_3\text{COONa}$  20mM pH5 (25 mL de gel, 40 mL/h). L'élution se fait par un gradient de 0 à 2 M en NaCl, dans un volume total de 100 mL, à l'issue duquel 50 fractions de 2 mL sont collectées. La présence d'activités  $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -1,4-glucanase et chitinase est évaluée pour chaque fraction (**Tableau 2.5**). L'activité exochitinase n'est pas retenue sur la colonne et se trouve dans le volume non fixé. L'activité endochitinase est éluée à 0.25 M de NaCl, l'activité  $\beta$ -1,4-glucanase est éluée à 1 M de NaCl et l'activité  $\beta$ -1,3-endoglucanase est éluée à 1.3 M de NaCl, elles sont conservées à -20°C.

#### 1.1.3.2. Purification de $\beta$ -1,6-endoglucanase de Westase™

La  $\beta$ -1,6-endoglucanase est purifiée à partir de la Westase™ (Takara). Un gramme de poudre est suspendu dans 100 mL de tampon Tris/HCl à 10 mM, pH 8, incubé 1 h sous agitation constante à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 3500 g. Le surnageant est récolté. Le culot est repris dans 5 mL du même tampon, centrifugé dans les mêmes conditions, et le surnageant obtenu est ajouté au précédent. Cet extrait est analysé à



température ambiante sur une colonne échangeuse d'anions (diéthylaminoéthyl, 25 mL, 40 mL/h), dans du tampon Tris/HCl à 10 mM pH 8, puis élué sur un gradient de 0 à 1 M en NaCl, dans un volume total de 100 mL. Les 100 mL élués sont dialysés à 4°C, dans un sac à dialyse (membrane «Spectra/Por 6») de limite d'exclusion 1 KDa, pendant 4 h contre 1 L d'eau désionisée. Cette préparation est nommée la westase-DEAE. Elle contient des activités  $\beta$ -1,3-exoglucanase et  $\beta$ -1,6-endoglucanase (**Tableau 2.5**). Pour séparer les deux activités, la westase-DEAE est dialysée comme précédemment, mais à température ambiante et contre 1 L d'une solution 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 10 mM Tris/HCl, pH 8. Le dialysat est ensuite analysé sur colonne d'hydrophobicité (phénylsépharose 10 mL, 40 mL/h) équilibrée dans une solution 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 10 mM Tris/HCl, pH 8. La colonne est lavée avec 30 mL du même tampon, puis une première élution est effectuée avec 30 mL d'eau UHQ dans lesquels est éluee l'activité  $\beta$ -1,3-exoglucanase. Cette préparation constitue la  $\beta$ -1,3-exoglucanase purifiée (**Tableau 2.5**). Une seconde élution est effectuée avec 30 mL d'urée dans lesquels est éluee l'activité  $\beta$ -1,6-endoglucanase. L'urée est éliminée par dialyse à 4°C, dans un sac à dialyse (membrane «Spectra/Por 6») de limite d'exclusion 1 KDa, pendant 4 h contre 1 L d'eau UHQ. Cette préparation constitue la  $\beta$ -1,6-endoglucanase purifiée (**Tableau 2.5**).



## 1.2. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE DES SUCRES

### 1.2.1. Techniques de quantification

Pour analyser les oses non aminés ou aminés, 5 mg de parois ou 500  $\mu$ L de prise d'essai, sont hydrolysés en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 N pour le dosage des oses non aminés ou d'acide chlorhydrique (HCl) 6 N pour le dosage des oses aminés, dans un volume total de 2 mL pendant 1 h à 120°C. L'hydrolyse à l'HCl 6 N libère sous forme de glucosamine les glucosamines et *N*-acétylglucosamines (NAG) de l'échantillon. L'hydrolysats refroidi est filtré sur filtre en fibre de verre (Whatman GF/C) ensuite rincé avec 5 mL d'eau UHQ, puis l'échantillon (7 mL) est évaporé à sec au rotavapore (Büchi RE 111) à 45°C. L'hydrolysats sec est repris dans 1 mL d'eau UHQ puis analysé par HPAEC-PAD (chromatographie d'échange d'anions haute performance-détection par ampérométrie pulsée) au moyen d'un système chromatographique HPLC-Dionex série 4500i, sur une colonne analytique échangeuse d'anions (Carbo Pac PA1, 4 mm x 250 mm) équipée d'une précolonne (Carbo Pac PA1, 10-32). L'élution est effectuée à température ambiante avec une solution de soude de 15 mM. Les oses, dont la fonction légèrement acide est exaltée à pH basique (12 à 14), se comportent comme des acides faibles et se séparent en fonction de leur pKa. Pour optimiser la détection et minimiser la déviation de la ligne de base, de la soude 300 mM est ajoutée post-colonne. La détection est réalisée par ampérométrie pulsée à l'aide d'une électrode de travail en or (Dionex). Les chromatogrammes sont enregistrés et intégrés à l'aide d'une unité informatique munie du logiciel AT 450 (Dionex). Les oses sont identifiés en fonctions de leur temps de rétention et quantifiés par référence à des standards.

La quantité d'oses non aminés totaux dans les parois est également déterminée par un dosage colorimétrique à l'antrone (Merck), adapté de la méthode de W. Trevelyan et J. Harisson (Trevelyan and Harrison, 1952). A 2 mL d'échantillon sont ajoutés 4 mL de réactif d'antrone à 4% (p/v), préparé dans l'acide sulfurique 1 N. La solution est incubée pendant 1 h à 120°C, puis refroidie quelques minutes dans la glace. La DO est mesurée à 585 nM. Le D (+) glucose est utilisé comme sucre standard.



## 1.2.2. Techniques analytiques

### 1.2.2.1. Spectrométrie de masse

Les analyses des COs de chitine et des fractions de paroi *d'A.euteiches* par spectrométrie de masse sont réalisées en infusion directe en mode positif sur un appareil de type QTOF Xevo-G2 (Waters). Les températures utilisées sont de 110°C pour la source et de 300°C pour la désolvatation. Les tensions appliquées sont de 3 kV pour le capillaire et de 30 V pour le cône. L'azote est utilisé comme gaz de désolvatation à un débit de 650 L/heure, et comme gaz de cône à 20 L/heure. La leucine-enképhaline est utilisée comme lock-mass pour la mesure de la masse exacte.

### 1.2.2.2. Résonance Magnétique Nucléaire

#### 1.2.2.2.1. RMN du liquide

Les spectres RMN du proton et du carbone à une et deux dimensions sont réalisés sur un appareil BRUKER Avance 400 opérant aux fréquences de 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) et 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), équipé d'une sonde quadruple (QNP).

La référence utilisée est le pic résiduel de l'eau pour les spectres proton (étalonné à 4.79 ppm pour une température de 298 K et à 4.4 ppm pour une température de 338 K).

Les expériences bidimensionnelles homo- ou hétéro-nucléaires sont calibrées par analogie avec les spectres à une dimension correspondants.

#### 1.2.2.2.2. RMN du solide

Les spectres  $^{13}\text{C}$  haute-résolution sont enregistrés sur un spectromètre BRUKER Avance 400 à 300K en utilisant les techniques de l'angle magique (MAS) et de polarisation croisée (CP). Le champ de radiofréquence du proton est réglé pour donner un pulse à 90° pendant 2.5  $\mu\text{s}$ . Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au signal du carbonyle de la glycine utilisé comme référence et fixé à 176.03 ppm. Les échantillons secs à analyser sont placés dans des rotors en zirconium de 4 mm et fermés par des bouchons en Kel-F®. La fréquence de rotation est fixée à 12 000 Hz. Les spectres sont enregistrés avec un





temps d'acquisition (AQ) de 35 ms et un délai entre chaque impulsion de 4 s sur environ 2000 scans. Le temps de contact a été fixé à 2 ms.

### **1.2.2.3. Analyse de liaisons**

L'analyse de liaison des monosaccharides est réalisée par méthylation avec de l'iodure de méthyle dans de l'hydroxyde de sodium et du dimethyl sulfoxide comme décrit par Ciucanu and Kerek (Ciucanu and Kerek, 1984). Les alditols acétates partiellement méthylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les pourcentages des différents types de liaison des monosaccharides (mol%) sont calculés à partir de quatre répliques techniques et les quantifications finales sont basées sur les analyses de compositions en glucose et NAG des différentes fractions.

## **1.3. PREPARATION DE FRACTIONS PARIETALES ET MATERIEL ELICITEUR**

### **1.3.1. Préparation de chitooligosaccharides de chitine de crabe**

La chitine de carapace de crabe (CSC, Sigma C3387) est utilisée comme matériel de départ. Le bol de broyage de 50 mL en acier trempé d'un broyeur à disques vibrants RS200 (Retsch) est pré-refroidi dans de l'azote liquide, puis 10 g de chitine de carapace de crabe sont placés dans le bol et broyés 3 fois pendant 15 secondes à 1500 rpm. La poudre est tamisée sur un tamis de 100 µm de taille de maille pour éliminer les plus grosses particules. A ce stade, le contenu en hexosamine est mesuré par HPAEC-PAD. La poudre est ensuite déprotéinisée en la mettant en suspension dans du NaOH 1 M (10 mL.g<sup>-1</sup> de poudre) et en incubant à température ambiante pendant 1 h sous agitation constante. Le résidu est sédimenté par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 15°C, puis lavé par remise en suspension successive dans l'eau jusqu'à ce que le pH du surnageant atteigne la neutralité. Les protéines ont été mesurées dans le premier surnageant selon la méthode (1), ce qui donne une indication de la contamination par des protéines de l'échantillon de chitine de crabe de départ. Le culot est ensuite lavé 3 fois dans de l'éthanol à 80% (v/v), une fois dans l'éthanol à 100%, puis lyophilisé. Le résidu sec est dissout par remise en suspension dans HCl 12 M (10 mL.g<sup>-1</sup> poudre, pré-refroidi à -20°C) et incubé à -20°C pendant 30 min. Une hydrolyse partielle est réalisée en transférant la solution dans un bain-marie à 40°C pendant



100 min, sous agitation constante. L'hydrolysats est clarifié par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4°C, puis versé dans un bécher glacé. Après addition de 400 mL d'eau distillée glacée, l'hydrolysats est neutralisé par addition lente de KOH 5 M glacé. L'hydrolysats neutralisé est clarifié par centrifugation à 1000 g pendant 10 min à 4°C, puis concentré dans un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi Labortechnik) à 30°C jusqu'à ce qu'il atteigne un volume de 50 mL. L'hydrolysats est ensuite dialysé dans un sac à dialyse (membrane «Spectra/Por 6») de limite d'exclusion 1 kDa, pendant 6 h contre 10 L d'eau désionisée. Le dialysats est ultrafiltré dans un tube Sartorius Vivaspin 15RH11, et la fraction de moins de 5 kDa de poids moléculaire est lyophilisée, dont on obtient c.a. 800 mg de matière sèche. Des aliquotes de 20 mg de cette fraction sont analysés par chromatographie de filtration moléculaire sur une colonne Bio-Gel P-4 (24x250 mm, Biorad) équilibrée dans du formiate d'ammonium 100 mM, pH 6.8, calibrée avec des étalons de dextran de kDa 1.1, 5 et 50 kDa. Les fractions correspondant à des masses moléculaires apparentes entre 3 et 4 kDa, 2 et 3 kDa, 1 et 2 kDa et 0.2 à 1 kDa ont été rassemblées, résultant en 4 pools de fraction de poids moléculaires décroissant.

### 1.3.2. Préparation de $\beta$ -1,3-glucanes linéaires

Le curdlan (curdlan from *Alcaligenes faecalis*, Sigma-Aldrich) est utilisé comme matériel de départ. Vingt-cinq milligrammes de curdlan sont mis en suspension dans 25 mL d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 N, et incubés 45 min à 120°C. L'hydrolysats est clarifié par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4°C. Le TFA est éliminé par évaporation en amenant l'hydrolysats à sec avec un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi Labortechnik), et remis en suspension dans 3 mL d'eau UHQ. L'hydrolysats est ensuite analysé sur une colonne de chromatographie de filtration moléculaire BioGel P2 (V=100 mL, diamètre de la colonne 2.6 cm) équilibrée dans du formiate d'ammonium 100 mM, pH 6.8, à débit de 50 mL/h. Après le  $V_0$  de 30 mL, 15 fractions de 2 mL sont collectées, puis 45 fractions de 1 mL sont collectées. Un prélèvement de 100  $\mu$ L de chaque fraction est analysé par HPAEC-PAD (Dionex) afin de déterminer la taille des fragments présents dans chaque fraction. Des fragments de DP 7, 8, 9 et 10 sont élués entre 57 et 66 mL. Des fragments de DP 6, 7 et 8 sont élués de 67 à 78 mL. Des fragments de DP 5, 6 et 7 sont élués de 79 à 88 mL. Des fragments de DP 4 et 5 sont élués de 89 à 96 mL. La zone d'élution contenant des DP 6, 7 et



8 est utilisée en tant que fragments de  $\beta$ -1,3-glucanes linéaires dans les travaux présentés dans ce manuscrit.

### **1.3.3. Préparation des parois d'*Aphanomyces euteiches***

#### **1.3.3.1. Préparation de parois brutes**

Dix grammes de mycélium frais congelé sont placés dans le bol de broyage de 50 mL en acier trempé d'un broyeur à disques vibrants RS200 (Retsch) pré-refroidi dans l'azote liquide. Le mycélium est broyé 3 fois pendant 15 secondes à 1500 rpm. La poudre est reprise dans du tampon phosphate de potassium 200 mM, pH 6.8, à raison de 1 L pour 150 g de mycélium sec. La suspension est incubée à température ambiante sous agitation constante durant 20 min, puis centrifugée 10 min à 1000 g, à 15°C. Le culot est lavé selon ce protocole, successivement 2 fois 20 min dans le tampon, 3 fois 20 min dans de l'eau désionisée stérile, puis 2 fois 20 min dans une solution de méthanol-chloroforme (2:1, v/v). Le culot est ensuite lavé 6 fois 30 min dans de l'eau désionisée stérile. Il constitue les parois brutes. Le contenu en glucose et oses aminés est déterminé par HPAEC-PAD, et le contenu en protéine est déterminé par la méthode (3).

#### **1.3.3.2. Purification des parois**

Les parois brutes sont reprises dans une solution aqueuse de phénol à 57% final (p/v) et acide acétique à 29% (v/v), à raison de 875 mL pour 150 g de mycélium sec d'origine. Les parois brutes sont incubées dans cette solution à température ambiante sous agitation constante durant 16 h, puis centrifugées 10 min à 1000 g, à 15°C. Le culot est ensuite lavé, successivement 6 fois 20 min dans de l'eau désionisée stérile, et 2 fois 20 min dans de l'éthanol 80% (v/v). Le culot constitue les parois « PAW » pour « Phenol-acide Acetic-Water ». Les parois PAW sont ensuite traitées au NaOH 1 M à raison de 1.1L pour 150g de mycélium sec d'origine, et incubées 16 h à température ambiante sous agitation constante, puis centrifugées 10 min à 1000 g, à 15°C. Le culot est à nouveau lavé 6 fois dans de l'eau désionisée stérile, puis lyophilisé. Il constitue les parois PAW-NaOH. La quantification des protéines des parois PAW et PAW-NaOH se fait par la méthode (3).



### 1.3.4. Purification des chitosaccharides d'*A.euteiches*

#### 1.3.4.1. Hydrolyse enzymatique des parois

Les parois PAW ou PAW-NaOH sont mises en suspension dans du tampon acétate 100 mM pH 5.2 à raison de 400 mL/g de parois, puis homogénéisées par sonication 3 fois 15 min (Bandelin Sonoplus, générateur HD 2070 et sonde MS 73), à puissance maximale, cycle pulsé réglé sur 9.

Pour l'étude de la paroi d'*A.euteiches* par voie enzymatique, 20 mg de parois PAW mis en suspension sont hydrolysés à l'aide de préparations enzymatiques pures (cf. paragraphe 1.1.3). L'endochitinase et l'exochitinase issues de cellules de tabac BY2 sont utilisées à raison de 0.2 U/mg de parois et 0.3 U/mg de parois, respectivement. La  $\beta$ -1,4-endoglucanase provenant de la cellulase de Megazyme est utilisée à raison de 0.6U/mg de parois. La  $\beta$ -1,3-exoglucanase et la  $\beta$ -1,6-endoglucanase purifiées à partir de la Westase® de Takara sont utilisées à raison de 0.5 U/mg de parois chacune. Les hydrolyses sont réalisées dans un volume total de 20 mL et sont incubées au bain-marie à 40°C sous agitation magnétique constante durant 20 h. Les échantillons sont portés à ébullition au bain-marie pendant 10min, puis centrifugés 10 min à 3500 g à 4°C. La quantité d'hexosamines dans le culot et le surnageant de chaque hydrolyse est dosée par HPAEC-PAD (Dionex).

Pour la purification des chitosaccharides, les parois sont réparties dans des tubes en verre à raison de 100 mg (soit 40 mL) par tube, et additionnées de 0.1 U/mg de parois de  $\beta$ -1,3-exoglucanase et de 0.6 U/mg de parois de  $\beta$ -1,6-endoglucanase, provenant toute deux de la westase-DEAE (Matériel et Méthodes 1.1.3.2.), auxquelles sont ajoutés 0.6 U/mg de parois de  $\beta$ -1,3-endoglucanase, et 0.2 U/mg de parois de  $\beta$ -1,4-glucanase préparées à partir de cellules de tabac BY2 (Matériel et Méthodes 1.1.3.1.), et 0.6 U/mg de parois de  $\beta$ -1,4-endoglucanase de cellulase (Cellulase de *Bacillus amyloliquefaciens*, Megazyme). Les tubes sont incubés au bain-marie à 40°C sous agitation magnétique constante durant 20 h. Les hydrolysats sont traités individuellement. Ils sont centrifugés 20 min à 3500 g à 4°C. Les culots sont rassemblés et constituent le culot « parois hydrolysées ». Le surnageant de chaque hydrolyse est placé au bain-marie à 100°C pendant 10 min afin d'inactiver les enzymes en les dénaturant, puis centrifugés 20 min à 3500 g à 4°C. Les culots sont rassemblés et constituent le « culot protéique ». Les volumes sont réduits à 4 mL pour





chaque surnageant, dans un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi Labortechnik) à 30°C. Les échantillons sont ensuite précipités par addition de 9 volumes de méthanol et incubés à -20°C pendant une nuit, puis centrifugés 20 min, à 3500 g, à 4°C.

Les surnageants sont rassemblés deux à deux et réduits à 500 µL dans un évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi Labortechnik) à 30°C, puis dilués à 2 mL avec du formiate d'ammonium 100 mM, pH 6.8. Les culots sont resolubilisés un à un dans 4 mL d'eau UHQ.

Un témoin protéique est préparé selon le même protocole que celui utilisé pour les parois. L'hydrolyse est réalisée avec la quantité d'enzyme nécessaire pour 300 mg de parois, mais elle se déroule en l'absence de parois. La suite des étapes suivies pour la préparation du témoin protéique est strictement identique à celle suivie pour l'hydrolyse des parois.

#### **1.3.4.2. Analyse chromatographique**

Les surnageants et les culots de la précipitation au méthanol des hydrolysats de paroi sont fractionnés par chromatographie de filtration moléculaire dans 100 mM de formiate d'ammonium, pH 6.8, à température ambiante.

Les surnageants rassemblés deux à deux, dans le formiate d'ammonium (2 mL), sont fractionnés individuellement de 100 à 1800 Da sur Biogel P2 (V=100 mL, diamètre de la colonne 2.6 cm), à débit de 50mL/h. Soixante-cinq fractions de 2 mL sont collectées, sur lesquelles un dosage colorimétrique du glucose est effectué, tel que décrit dans chapitre 1.2.1. Sur la base du profil de concentration en glucose obtenu pour chaque surnageant analysé, les fractions sont réunies en 3 pools de poids moléculaires décroissants (>1.6 KDa, 1.6-0.75 KDa, 0.75-0.18 KDa) nommés P2F1, P2F2 et P2F3.

Les culots (4 mL) sont fractionnés individuellement de 3000 à 60000 Da sur Biogel P60 (V=120 mL, diamètre de la colonne 2.6 cm), à débit de 40 mL/h. Soixante-sept fractions de 2 mL sont collectées, et les fractions issues de la séparation des culots sont rassemblées tube à tube. Les profils de concentrations en glucose et en NAG sont déterminés par dosage par HPAEC, tel que décrit dans le chapitre 1.2.1. De même que précédemment, les fractions sont réunies en 3 pools de poids moléculaires décroissants (>51 KDa, 51-3.5 KDa, <3.5 KDa) nommés P60F1, P60F2 et P60F3. Le dosage des protéines sur les fractions poolées est réalisé avec la méthode (2).



Les fractions issues des chromatographies BioGel P2 et BioGel P60 sont déprotéinées à l'aide d'une résine échangeuse de cations (AG 50 Dowex H<sup>+</sup>, 10 mL), à débit de 20mL/h dans de l'eau UHQ acidulée par HCl, à pH compris entre 1 et 2. Les fractions déprotéinées sont ensuite lyophilisées 3 fois afin d'éliminer au maximum les restes de sels de formiate d'ammonium qui sont sublimables.

La préparation du témoin protéique se poursuit selon le même protocole utilisé pour réaliser les analyses chromatographiques des parois hydrolysées, et leur déprotéinisation. Nous obtenons six fractions de poids moléculaires décroissants : P60.1, P60.2, P60.3, P2.1, P2.2 et P2.3 qui sont les témoins respectifs des fractions P60F1, P60F2, P60F3, P2F1, P2F2 et P2F3.

## **2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **2.1. EXTRACTION D'ADN**

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique bactérien s'effectuent grâce au kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega) selon le protocole décrit par le fournisseur.

Pour l'extraction d'ADN génomique végétal, environ 100 mg de matériel biologique sont broyés au pilon dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre est reprise dans 400 µL d'une solution de bromure de cetyl triméthylammonium (CTAB) 1% (p/v), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA et 1.4 M NaCl. Après une incubation de 10 min à 50°C, suivie d'une incubation d'1 h dans la glace avec agitation brève au vortex toute les 15 min, 400 µL de phénol-chloroforme-isoamylalcool 25:24:1 (Biosolve) sont ajoutés. Le mélange est vortexé 30 s, puis centrifugé 15 min à 13000 g, 4°C. Trois cent microlitres de la phase aqueuse sont prélevés, auxquels sont ajoutés 30 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5.2 et 750 µL d'éthanol, puis incubés 2 h à -20°C. Après centrifugation 15 min à 13000 g, 4°C, le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 70% (v/v). Le culot est ensuite séché au SpeedVac (SPD SpeedVAC, SPDIIIV, Thermo Electron corporation) puis repris dans 30 µL d'eau UHQ. Le dosage est effectué au Nanodrop (NanoDrop Spectrophotometer DN-1000, Labtech).



## 2.2. ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

Les électrophorèses d'ADN et d'ARN sont réalisées en gel d'agarose 1% ou 2% (p/v), respectivement, préparé dans le tampon Tris-acétate-EDTA (TAE, Eurobio) 0.5X. Les échantillons sont ajoutés à du tampon de charge 6X (Blue-Orange Dye, Promega). La migration est effectuée dans le tampon TAE 0.5X à voltage constant (150 V). Les molécules d'ADN et d'ARN sont révélées suite à un bain dans une solution de bromure d'éthidium (0.5 µg/mL) pendant 15 min, puis lavage de quelques secondes dans de l'eau et visualisation sous rayonnement UV à 254 nm.

## 2.3. ANALYSE D'EXPRESSION GENIQUE PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Les ARN totaux sont extraits sur environ 100 mg de tissus broyés à l'aide du RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant, incluant le traitement à la DNase. Les ADNc sont synthétisés à partir de 2 µg d'ARN totaux en utilisant le High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) avec des amorces aléatoires, dans un volume total de 20 µL. La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est réalisée sur un thermocycleur ABI Prism SDS 7900HT (Applied Biosystems), en utilisant du SYBR green (Power SYBR Green, Applied Biosystems). Les ADNc sont placés dans une plaque 384-puits, dans un volume total de 10 µL contenant 2 µL d'ADNc dilués au 1:50 et 0.15 µM d'amorces spécifiques à chaque gène (**Chapitre 1 Table S1**). Le programme de RT-qPCR consiste en une incubation de 5 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 15 s à 95°C et 30 s à 60°C. La spécificité d'amplification pour chaque gène est confirmée par la courbe de dissociation générée à la fin du programme de RT-qPCR. Les réactions de RT-qPCR sont réalisées en triplicats sur trois répétitions biologiques. L'analyse des données et les calculs pour la comparaison de données d'expressions sont réalisées en utilisant la méthode du  $\Delta\Delta$  cycle threshold, en utilisant les gènes codant pour le facteur d'élongation 1 $\alpha$ , une protéine de transport d'ubiquitine et une histone, comme gènes de référence (Livak and Schmittgen, 2001). L'efficacité des amorces au cours de la PCR est évaluée en réalisant une RT-qPCR sur des dilutions sériées d'un mélange de tous les ADNc. Les séquences des amorces sont décrites dans le **Table S1** du **Chapitre 1**.

**Tableau M.3** : Amorces utilisées pour le clonage GateWay

désignation	séquences
<b>GW-PI-S</b>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGGCTGAGACAAGTGTGGAG-3'
<b>GW-PI-AS</b>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACCTGAACACACACAATATATTGATTCATTC-3'
<b>GW-PR10.2-S</b>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATTCCAATCCTTCAAACCATAAAGCTC-3'
<b>GW-PR10.2-AS</b>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTTGGTTTAATTTGATAATTTGGTGATGAAG-3'
<b>BP-PI-S</b>	5'-AGGGCTGAGACAAGTGTGGAG-3'
<b>BP-PI-AS</b>	5'-TACCTGAACACACACAATATATTGATTCATTC-3'
<b>BP-PR10.2-S</b>	5'-AATTCCAATCCTTCAAACCATAAAGCTC-3'
<b>BP-PR10.2-AS</b>	5'-TGTTTGGTTTAATTTGATAATTTGGTGATGAAG-3'
<b>LR-PI/PR10.2-S</b>	5'-CTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAGT-3'
<b>LR-PI/PR10.2-AS</b>	5'-CTCTTCATAGCCTTATGCAGTTGCTC-3'

## 2.4. GENERATION DE CONSTRUCTION RAPPORTRICE DE LA DEFENSE

Les clonages sont effectués en deux étapes de recombinaison, selon la technologie du GateWay® (Invitrogen), en suivant les protocoles du fournisseur.

Les séquences à cloner sont amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique de *M. truncatula* lignée A17, extrait au CTAB. Un fragment de 2500 pb contenant potentiellement le promoteur du gène Medtr1g075340 (**Chapitre 1, Table S1**) est amplifié à l'aide des amorces sens GW-PI-S et antisens GW-PI-AS (**Tableau M.3**). Un fragment de 800 pb contenant potentiellement le promoteur du gène Medtr4g120860 (**Chapitre 1, Table S1**) est amplifié à l'aide des amorces sens GW-PR10.2-S et antisens GW-PR10.2-AS (**Tableau M.3**). La PCR est réalisée en utilisant la GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µL contenant 50 ng d'ADN génomique, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM d'amorces spécifiques. Le programme de PCR consiste en une incubation de 2 min à 95°C, puis de 45 s à 95°C, puis une incubation de 45 s à 55°C et 2.5 min à 72°C, permettant de faire une première hybridation spécifique des amorces avec leur séquence cible (sans prendre en compte la queue flottante des amorces), et une première élongation. Ces premières incubations sont suivies de 30 cycles constitués de 3 étapes, la première est de 45 s à 95°C (prenant en compte la queue flottante des amorces), la seconde est 45 s à 65°C, et la troisième est de 2.5 min à 72°C. Le programme se termine par une dernière incubation de 5 min à 72°C.

Les fragments PCR sont purifiés par précipitation au PEG-MgCl<sub>2</sub> selon les recommandations du manuel de la Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen), excepté la dernière étape pour laquelle nous resolubilisons le précipité dans 20 µL d'eau UHQ. Le dosage des fragments est effectué au NanoDrop (NanoDrop Spectrophotometer DN-1000, Labtech).

La réaction BP est réalisée selon les recommandations du fabricant, avec le plasmide pDONR™/Zeo (Invitrogen). Cinquante microlitres d'*Escherichia coli* DH5α électrocompétentes sont transformés avec 2 µL de la réaction BP, par électroporation, dans une cuvette de 0.1 cm (capacité 25 µF, résistance 200 Ω, voltage 1.5 kV). Neuf-cent microlitres de milieu LB fraîchement préparé, sans antibiotique, sont immédiatement ajoutés après le choc électrique.





Après 1 h d'incubation à 37°C, 100 µL de chaque transformation sont étalés sur milieu LB-low salt (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L extrait de levure, 5 g/L NaCl, pH 7.0) additionné en Zeocin (Invitrogen) à 50 µg/mL. Les clones bactériens sont sélectionnés par PCR sur colonies en utilisant l'amorce sens BP-PI-S et antisens BP-PI-AS pour la région promotrice du gène Medtr1g075340, ou l'amorce sens BP-PR10.2-S et antisens BP-PR10.2-AS pour la région promotrice du gène Medtr4g120860 (**Tableau M.3**).

La réaction LR est réalisée avec le Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant, avec le plasmide pKWL7.0 (Plant Systems Biology), et une préparation d'ADN plasmidique d'un clone sélectionné précédemment. *E.coli* DH5α est transformé par électroporation, comme précédemment décrit.

Après 1 h d'incubation à 37°C, 100 µL de chaque transformation sont étalés sur milieu LB additionné de streptomycine et spectinomycine, à 100 µg/mL chacune. Pour les deux constructions, les clones bactériens sont sélectionnés par PCR en utilisant l'amorce sens LR-PI/PR10.2-S hybridant avec le vecteur, juste en amont de l'insert, et l'amorce antisens LR-PI/PR10.2-AS hybridant au début du gène de luciférase du vecteur. Des préparations d'ADN plasmidique sont effectuées, comme précédemment. L'intégrité des extrémités des inserts et la jonction entre la séquence du gène de la luciférase et les inserts sont vérifiés par séquençage, en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la sélection de clones suite à la réaction LR.

Les préparations plasmidique sont utilisées pour transformer *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 par électroporation selon le même protocole que celui utilisé pour transformer *E.coli*. Après 1 h d'incubation à 28°C, 100 µL de chaque transformation sont étalés sur milieu LB additionné de kanamycine 50 µg/mL. Les clones sont sélectionnés par PCR sur colonie comme précédemment effectué suite à la réaction LR.



### 3. BIOESSAIS

#### 3.1. DOSAGE D'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EXTRACELLULAIRE PAR CHIMIO-LUMINESCENCE ET FLUORESCENCE

Les jeunes plantes de *M.truncatula* ou d'*A.thaliana* sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 35 mm pendant 7 à 8 ou 15 jours, respectivement. Elles sont lavées en remplaçant le milieu de culture avec de l'eau UHQ et incubées dans leurs conditions de culture pendant 2 à 4 h avant d'être traitées avec des éliciteurs.

##### 3.1.1. Mesure en cinétique

La mesure en temps réel de la production de ROS est réalisée en utilisant un essai basé sur la chimioluminescence générée par l'oxydation du luminol par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'une peroxydase, adapté de (Kunze *et al.*, 2004). Le milieu de lavage est drainé et les jeunes plantes dans les boîtes de Pétri sont brièvement incubées dans 900 µL d'une solution contenant 1 U.mL<sup>-1</sup> de peroxydase de raifort (HRP, Fluka-Sigma) et 22 µM de luminol (Sigma). La boîte de Pétri est ensuite placée dans un luminomètre Sirius (Berthold Detection Systems), avant d'ajouter un volume de solution élicitrice suffisant pour ajuster le volume final à 1 mL. La chimioluminescence est enregistrée pendant 1 h. Pour étudier l'effet du diphenyliodonium chloride (DPI, Sigma-Aldrich), la solution de peroxydase/luminol est additionnée de 5 µL de 10 mM DPI solubilisé dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), ou de 5 µL DMSO comme contrôle.

##### 3.1.2. Mesure en point final

La mesure de la production de ROS en point final chez *M.truncatula* est faite en utilisant un essai basé sur la fluorescence générée par la réaction de l'Amplex-red avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'une peroxydase, adapté de (Ashtamker *et al.*, 2007). Le milieu de lavage est drainé et les jeunes plantes dans les boîtes de Petri sont traitées avec 1 mL de solution élicitrice et incubées pendant 20 min à température ambiante. Un échantillon de 20 µL du milieu est prélevé et placé dans une microplaque noire de 96 puits (Greiner). La fluorescence



est excitée à 530 nm et mesurée à 600 nm dans un lecteur multimode Berthold TriStar LB 941, deux fois avant et 4 fois après injection de 20 µL de 50 mM de tampon phosphate (pH 7.5) contenant 4 U.mL<sup>-1</sup> HRP et 0.2 mM d'amplex red (Invitrogen). En parallèle, une série de dilution de 37% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réalisée. Les unités relatives de lumière (RLU) émises pour une gamme de concentration comprise entre 0.05 et 2 µM sont linéaires ( $r^2 = 0.98 \pm 0.015$ ,  $n = 10$ ). Pour vérifier la nature des ROS produites par les jeunes plantes, une solution de catalase (catalase from *Corynebacterium glutamicum*, Sigma-Aldrich) est ajoutée aux échantillons, à une concentration finale de 200 U.mL<sup>-1</sup>, et la préparation est incubée 10 min à température ambiante avant de mesurer la fluorescence.

Pour l'analyse de l'expression génique chez *M.truncatula*, l'incubation des jeunes plantes traitées, comme précédemment décrit pour la mesure de la production de ROS en point final, se poursuit de 1 à 12 h dans les conditions de culture. Ensuite les racines sont récoltées, leur poids frais est évalué, puis elles sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

### **3.2. REVELATION DE L'EXPRESSION DES CONSTRUCTIONS PROMOTEUR-LUCIFERASE PAR IMAGERIE**

Les cultures racinaires exprimant les constructions promoteur-luciférase sont repiquées et placées dans des grandes boîtes carrées (12x12 cm) contenant du milieu M avec saccharose 10g/L, gélosé à raison de 3-4 explants par boîte. Les boîtes sont scellées et placées à la verticale dans un incubateur à l'obscurité à 20°C. Après 15 jours de croissance, les extrémités des jeunes racines (3 à 4 cm) sont prélevées et incubées 4 h en boîte de Pétri 35 mm contenant 1 mL d'eau UHQ. Le milieu est ensuite drainé et les fragments de racine sont traités avec 1 mL de solution élicitrice et incubés pendant 16 h à l'obscurité, dans les conditions de culture. Dix microlitres de Luciférine à 1 mM (Sigma Aldrich) sont ajoutés au milieu et les fragments de racines sont incubés 5 h supplémentaires.

L'activité luciférase est révélée par imagerie. Cela se fait à l'obscurité absolue, à l'aide d'une caméra electron multiplying CCD (Hamamatsu, emCCD C9100-13 back illuminated, taille de pixel 16 µm, gain EM : 200, gain CCD : 5, exposition : 5 s), équipée d'un objectif photographique (Cosmicar-Japon, 16 mm, 1:1.4, 5 cm).



### **3.3. MESURE DES VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM CYTOPLASMIQUE PAR CHIMIO-LUMINESCENCE**

Les plantes d'*A. thaliana* « aequorine », âgées de 7 jours, cultivées en plaque blanche 96 puits, sont incubées une nuit à 22°C et à l'obscurité en présence de 100 µL de coelentérazine à 2.5 µM dans de l'eau UHQ stérile. Le milieu est drainé et remplacé par 100 µL de solution élicitrice, puis la chimioluminescence est enregistrée à l'aide d'un luminomètre (SIRIUS luminometer Berthold detection system).

### **3.4. MESURE DES VARIATIONS DE CALCIUM NUCLEAIRE PAR FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)**

Afin de mesurer les oscillations calciques dans les racines, des cultures de racines transgéniques de la lignée A17 exprimant une sonde « caméléon » nucléaire ont été utilisées (NUP-YC2.1) (Sieberer *et al.*, 2009). La sonde « caméléon » a aussi été introduite dans des racines mutantes *nfp-2*, *dmi1* et *dmi2* (Chabaud *et al.*, 2011).

A partir de boîtes de collection, les racines « caméléon » sont repiquées et placées dans des grandes boîtes carrées (12x12 cm) contenant du milieu M gélosé à raison de 3-4 explants par boîte. Les boîtes sont scellées et placées à la verticale dans un incubateur à l'obscurité à 20°C.

Après 15 jours de croissance sur milieu M avec saccharose 10g/L, les extrémités des jeunes racines (environ 3 cm en partant de l'apex) sont repiquées sur du milieu M gélosé dans des petites boîtes carrées (8x8 cm), puis sont recouvertes d'eau stérile et un film Biofolie 25™ (Dutscher SAS, Brumath, France) est déposé délicatement dessus afin d'éviter le développement des poils absorbants. L'eau en surplus est éliminée et les boîtes sont scellées et placées à la verticale dans un incubateur à 20°C à l'obscurité. Après 15 jours de croissance, les racines latérales de 3<sup>ème</sup> ordre sont placées dans une chambre de 2 mm d'épaisseur sur une lame de microscopie contenant de l'eau distillée stérile. L'eau de la chambre est remplacée par 100 µL d'échantillon, et la lame est ensuite placée sous l'objectif pour être observée au microscope confocal. La Cyan Fluorescent Protein (CFP) est excitée par un laser d'Argon à 458 nm et les émissions de la CFP et de la Yellow Florescent Protein





## *Matériel et Méthodes*

(YFP) sont mesurées sur des bandes passantes de 470 à 500 nm et 530 à 570 nm respectivement. L'acquisition des images est réalisée sur des noyaux de cellules épidermiques pour la CFP et l'YFP toutes les 5 s, pendant 15 à 30 min. Le pinhole du microscope confocal est réglé sur 4 unités Airy et la résolution du balayage sur 512x512 pixels. Les images en fond clair sont acquises simultanément en utilisant le détecteur à transmission du microscope. Pour chaque traitement, un minimum de 3 racines indépendantes et 10 noyaux de cellules épidermiques par racine est observé.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adams, D.J.** (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, **150**, 2029–2035.
- Adams-Phillips, L., Briggs, A.G. and Bent, A.F.** (2010) Disruption of poly(ADP-ribosyl)ation mechanisms alters responses of Arabidopsis to biotic stress. *Plant physiology*, **152**, 267–280.
- Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J.M.** (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, **37**, 268–274.
- Ahmad, S., Hulten, M. Van, Martin, J., Pieterse, C.M.J., Wees, S.C.M. Van and Ton, J.** (2011) Genetic dissection of basal defence responsiveness in accessions of Arabidopsis thaliana. *Plant, cell & environment*, **34**, 1191–1206.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M.** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, **17**, 73–90.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K.-I. and Hayashi, H.** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **435**, 824–827.
- Albert, P., Miya, A., Hiratsuka, K., Kawakami, N. and Shibuya, N.** (2006) A high-throughput evaluation system for Arabidopsis mutants for defense signaling. *Plant Biotechnology*, **23**, 459–466.
- Alexopoulos, C.J.** (1952) *Introductory Mycology* John Wiley., New York.
- Amor, B. Ben, Shaw, S.L., Oldroyd, G.E.D., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S.R., Dénarié, J. and Gough, C.** (2003) The NFP locus of Medicago truncatula controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant journal*, **34**, 495–506.
- Anderson, J.C., Bartels, S., González Besteiro, M.A., Shahollari, B., Ulm, R. and Peck, S.C.** (2011) Arabidopsis MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *The Plant journal*, **67**, 258–268.
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S. and Loon, L.C. Van** (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*, **47**, 79–87.
- Aronson, J.M.** (1965) The cell wall. In *The Fungi*. New York: Academic Press, pp. 49–76.
- Aronson, J.M. and Bertke, C.C.** (1987) Isolation and analysis of cell walls. In *Zoosporic fungi in teaching and research*. Athens: Southeastern Publishing Corporation, pp. 175–185.
- Aronson, J.M. and Lin, C.C.** (1978) Hyphal cell wall chemistry of Leptomitosis. *Mycologia*, **70**, 363–369.
- Arrighi, J.-F., Barre, A., Amor, B. Ben, et al.** (2006) The Medicago truncatula lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology*, **142**, 265–279.
- Asai, S., Ohta, K. and Yoshioka, H.** (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in Nicotiana benthamiana. *The Plant cell*, **20**, 1390–1406.



## Références Bibliographiques

- Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O. and Fluhr, R.** (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant physiology*, **143**, 1817–1826.
- Aslam, S.N., Newman, M.-A., Erbs, G., et al.** (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current biology : CB*, **18**, 1078–1083.
- Averyanov, A.** (2009) Oxidative burst and plant disease resistance. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, **1**, 142–152.
- Ayers, A.R., Valent, B., Ebel, J. and Albersheim, P.** (1976) Host-Pathogen Interactions XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiology*, **57**, 766–774.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bézier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Heyraud, A. and Baillieul, F.** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. *Journal of experimental botany*, **58**, 1463–1472.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M. and Pugin, A.** (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **16**, 1118–1128.
- Badreddine, I., Lafitte, C., Heux, L., et al.** (2008) Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryotic cell*, **7**, 1980–1993.
- Bahramnejad, B., Goodwin, P.H., Zhang, J., Atnaseo, C. and Erickson, L.R.** (2010) A comparison of two class 10 pathogenesis-related genes from alfalfa and their activation by multiple stresses and stress-related signaling molecules. *Plant cell reports*, **29**, 1235–1250.
- Baier, R., Schiene, K., Kohring, B., Flaschel, E. and Niehaus, K.** (1999) Alfalfa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and sinorhizobium meliloti nodulation factors. *Planta*, **210**, 157–164.
- Bailey, B.A., Dean, J.F. and Anderson, J.D.** (1990) An Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase Elicits Electrolyte Leakage and Necrosis in *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Leaves. *Plant Physiology*, **94**, 1849–1854.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M.** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology*, **57**, 233–66.
- Baker, C.J. and Orlandi, E.W.** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, **33**, 299–321.
- Baldauf, S.L.** (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science*, **300**, 1703–1706.
- Bardy, S.L. and Jarrell, K.F.** (2003) Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Molecular Microbiology*, **50**, 1339–1347.





## Références Bibliographiques

- Baron, C. and Zambryski, P.C.** (1995) The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annual review of genetics*, **29**, 107–129.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of Fungi. *Annual review of microbiology*, **22**, 87–108.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1966) Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*. *Journal of general microbiology*, **42**, 57–69.
- Bartsev, A. V., Deakin, W.J., Boukli, N.M., Mcalvin, C.B., Stacey, G., Malnoë, P., Broughton, W.J. and Staehelin, C.** (2004) NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant physiology*, **134**, 871–879.
- Basse, C.W., Bock, K. and Boller, T.** (1992) Elicitors and suppressors of the defense response in tomato cells. Purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan suppressors generated by enzymatic cleavage of yeast invertase. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 10258–10265.
- Bateman, A. and Bycroft, M.** (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *Journal of molecular biology*, **299**, 1113–1119.
- Beliën, T., Campenhout, S. Van, Robben, J. and Volckaert, G.** (2006) Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **19**, 1072–1081.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J.R., Slijper, M. and Menke, F.L.H.** (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Molecular & cellular proteomics*, **6**, 1198–1214.
- Bernard, M. and Latgé, J.P.** (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Medical Mycology*, **39 Suppl 1**, 9–17.
- Bertin, C., Yang, X. and Weston, L.A.** (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **256**, 67–83.
- Bertke, C.C. and Aronson, J.M.** (1980) Hyphal wall composition in *Apodachlyella completa*. *Current Microbiology*, **4**, 235–238.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., et al.** (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology*, **4**, e226.
- Bhuiyan, N.H., Selvaraj, G., Wei, Y. and King, J.** (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant signaling & behavior*, **4**, 158–159.
- Bielnicki, J., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Joachimiak, A. and Derewenda, Z.S.** (2006) B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins*, **62**, 144–151.
- Bocsanczy, A.M., Nissinen, R.M., Oh, C.S. and Beer, S. V.** (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 425–434.



- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 189–214.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, **60**, 379–406.
- Bonfranceschi, B.A., Flocco, C.G. and Donati, E.R.** (2009) Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. *Journal of hazardous materials*, **165**, 366–371.
- Bostock, R.M., Kuc, J. and Laine, R.A.** (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, **3**, 67–69.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H. and Sheen, J.** (2010) Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *Nature*, **464**, 418–422.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248–54.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21–30.
- Briolay, A., Bouzenzana, J., Guichardant, M., Deshayes, C., Sindt, N., Bessueille, L. and Bulone, V.** (2009) Cell wall polysaccharide synthases are located in detergent-resistant membrane microdomains in oomycetes. *Applied and environmental microbiology*, **75**, 1938–49.
- Broeckling, C.D., Huhman, D. V., Farag, M.A., Smith, J.T., May, G.D., Mendes, P., Dixon, R.A. and Sumner, L.W.** (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of experimental botany*, **56**, 323–336.
- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., et al.** (2012) Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 13859–13864.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S. and Perret, X.** (2000) Keys to symbiotic harmony. *Journal of bacteriology*, **182**, 5641–5652.
- Broughton, W.J., Zhang, F., Perret, X. and Staehelin, C.** (2003) Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*, **252**, 129–137.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. and Nürnberger, T.** (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora transglutaminases*. *EMBO Journal*, **21**, 6681–6688.
- Bryant, M.K., May, K.J., Bryan, G.T. and Scott, B.** (2007) Functional analysis of a beta-1,6-glucanase gene from the grass endophytic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal genetics and biology*, **44**, 808–817.



- Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K.J., Dabrowska, M., Venema, G. and Haandrikman, A.J.** (1995) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of bacteriology*, **177**, 1554–1563.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J. and Kuipers, O.P.** (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular microbiology*, **68**, 838–847.
- Bulone, V., Chanzy, H., Gay, L., Girard, V. and Fevre, M.** (1992) Characterization of chitin and chitin synthase from the cellulosic cell wall fungus *Saprolegnia monoïca*. *Experimental Mycology*, **16**, 8–21.
- Bécard, G. and Fortin, J.A.** (1987) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, **108**, 211–218.
- Campos-Soriano, L., García-Garrido, J.M. and San Segundo, B.** (2010) Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New phytologist*, **188**, 597–614.
- Campos-Soriano, L. and San Segundo, B.** (2011) New insights into the signaling pathways controlling defense gene expression in rice roots during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 553–557.
- Campos-Takaki, G.M., Dietrich, S.M.C. and Mascarenhas, Y.** (1982) Isolation and characterization of chitin from the cell walls of *Achlya radiosa*. *Journal of general microbiology*, **128**, 207–209.
- Cannon, M.C., Terneus, K., Hall, Q., et al.** (2008) Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 2226–2231.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., et al.** (2011) Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 14348–14353.
- Cardenas, L., Holdaway-Clarke, T.L., Sanchez, F., Quinto, C., Feijo, J.A., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K.** (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant physiology*, **123**, 443–452.
- Cavalier-Smith, T.** (1997) Sagenista and bigyra, two phyla of heterotrophic heterokont chromists. *Archiv für Protistenkunde*, **148**, 253–267.
- Cerca, F., França, A., Guimarães, R., Hinzmann, M., Cerca, N., Lobo da Cunha, A., Azeredo, J. and Vilanova, M.** (2011) Modulation of poly-N-acetylglucosamine accumulation within mature *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown in excess glucose. *Microbiology and Immunology*, **55**, 673–682.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G. and Bonfante, P.** (2011) Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New phytologist*, **189**, 347–55.
- Chandran, D., Sharopova, N., VandenBosch, K.A., Garvin, D.F. and Samac, D.A.** (2008) Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology*, **8**, 89.



- Charron, D., Pingret, J.-L., Chabaud, M., Journet, E.-P. and Barker, D.G.** (2004) Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link Rhizobium nodulation factor perception in Medicago truncatula root hairs to intracellular responses, including Ca<sup>2+</sup> spiking and specific ENOD gene expression. *Plant Physiology*, **136**, 3582–3593.
- 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. *The Plant Cell*, **18**, 465–476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497–500.
- Choi, A.H.K., Slamti, L., Avci, F.Y., Pier, G.B. and Maira-Litran, T.** (2009) The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, **191**, 5953–5963.
- Cid, V.J., Durán, A., Rey, F. Del, Snyder, M.P., Nombela, C. and Sánchez, M.** (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological reviews*, **59**, 345–386.
- Ciucanu, I. and Kerek, F.** (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*, **131**, 209–217.
- Cooper, J.E.** (2004) Multiple responses of Rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*, **41**, 1–59.
- Czaja, L.F., Hoge Kamp, C., Lamm, P., Maillet, F., Andres Martinez, E., Samain, E., Dénarié, J., Küster, H. and Hohnjec, N.** (2012) Transcriptional responses towards diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by AM fungal LCOs. *Plant physiology*, **159**, 1671–1685.
- Danna, C.H., Millet, Y.A., Koller, T., Han, S.W., Bent, A.F., Ronald, P.C. and Ausubel, F.M.** (2011) The Arabidopsis flagellin receptor FLS2 mediates the perception of Xanthomonas Ax21 secreted peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 9286–9291.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. and Bolwell, G.P.** (2012) The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant cell*, **24**, 275–287.
- Day, R.B., Okada, M., Ito, Y., Tsukada, K., Zaghouni, H., Shibuya, N. and Stacey, G.** (2001) Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant physiology*, **126**, 1162–1173.
- Desikan, R., Neill, S.J. and Hancock, J.T.** (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana. *Free Radical Biology & Medicine*, **28**, 773–778.
- Dietrich, S.M.C.** (1975) Comparative study of hyphal wall components of oomycetes: Saprolegniaceae and Pythiaceae. *Anais*, **47**, 155–162.





- Djébali, N.** (2008) *Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle Medicago truncatula vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : Phoma medicaginis et Aphanomyces euteiches.*
- Djébali, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., et al.** (2009) Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **22**, 1043–1055.
- Djébali, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M.-T., Aouani, M.E. and Jacquet, C.** (2011) Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, **131**, 559–571.
- Dodd, A.N., Kudla, J. and Sanders, D.** (2010) The language of calcium signaling. *Annual review of plant biology*, **61**, 593–620.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N. and Poovaiah, B.W.** (2009) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, **457**, 1154–1158.
- Dénarié, J., Debellé, F. and Promé, J.C.** (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, **65**, 503–35.
- D’Haeze, W., Rycke, R. De, Mathis, R., Goormachtig, S., Pagnotta, S., Verplancke, C., Capoen, W. and Holsters, M.** (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 11789–11794.
- Erbs, G. and Newman, M.-A.** (2012) The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan , two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 95–104.
- Frag, M.A., Huhman, D. V., Dixon, R.A. and Sumner, L.W.** (2008) Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant physiology*, **146**, 387–402.
- Fei, H. and Vessey, J.K.** (2009) Stimulation of nodulation in *Medicago truncatula* by low concentrations of ammonium: quantitative reverse transcription PCR analysis of selected genes. *Physiologia plantarum*, **135**, 317–330.
- 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. *The Plant journal*, **18**, 265–276.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. and Schultze, M.** (2000) How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant physiology*, **124**, 1373–1380.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. and Schultze, M.** (1995) Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *The Plant Journal*, **7**, 939–947.



- Fernandez-Pascual, M., Lucas, M.M., Felipe, M.R. De, Boscá, L., Hirt, H. and Golvano, M.P.** (2006) Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of experimental botany*, **57**, 2735–2742.
- Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C. and Noel, J.P.** (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant physiology and biochemistry*, **46**, 356–370.
- Fester, T. and Hause, G.** (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, **15**, 373–379.
- Field, B., Jordan, F. and Osbourn, A.** (2006) First encounters-deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist*, **172**, 193–207.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G. and Ebel, J.** (2004) An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 1132–1140.
- Fliegmann, J., Uhlenbroich, S., Shinya, T., Martinez, Y., Lefebvre, B., Shibuya, N. and Bono, J.-J.** (2011) Biochemical and phylogenetic analysis of CEBiP-like LysM domain-containing extracellular proteins in higher plants. *Plant physiology and biochemistry*, **49**, 709–720.
- Flores, H.E., Vivanco, J.M. and Loyola-Vargas, V.M.** (1999) “Radicle” biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science*, **4**, 220–226.
- Folk, J.E.** (1980) Transglutaminases. *Annual review of biochemistry*, **49**, 517–531.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M. and Latgé, J.P.** (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 27594–27607.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., et al.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442–446.
- Forsyth, A., Mansfield, J.W., Grabov, N., Torres, M. de, Sinapidou, E. and Grant, M.R.** (2010) Genetic dissection of basal resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in accessions of *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **23**, 1545–1552.
- Fossdal, C.G., Hietala, A.M., Kvaalen, H. and Solheim, H.** (2006) Changes in host chitinase isoforms in relation to wounding and colonization by *Heterobasidion annosum*: early and strong defense response in 33-year-old resistant Norway spruce clone. *Tree physiology*, **26**, 169–177.
- Francia, D., Chiltz, A., Schiavo, F. Lo, Pugin, A., Bonfante, P. and Cardinale, F.** (2011) AM fungal exudates activate MAP kinases in plant cells in dependence from cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase. *Plant physiology and biochemistry*, **49**, 963–969.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B. -r., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D. and Alfano, J.R.** (2007) A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, **447**, 284–288.



- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T. and Nishimura, M.** (2012) Surface  $\alpha$ -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants A. Andrianopoulos, ed. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002882.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., Lorenzo, G. De and Ferrari, S.** (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against Botrytis cinerea. *Plant physiology*, **148**, 1695–1706.
- Gallou, A., Jaeger, N. De, Cranenbrouck, S. and Declerck, S.** (2010) Fast track in vitro mycorrhization of potato plantlets allow studies on gene expression dynamics. *Mycorrhiza*, **20**, 201–207.
- Gaulin, E., Drame, N., Lafitte, C., et al.** (2006) Cellulose binding domains of a Phytophthora cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. , **18**, 1766–1777.
- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A. and Dumas, B.** (2007) Root rot disease of legumes caused by Aphanomyces euteiches. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 539–548.
- Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerré-Tugayé, M.-T. and Bottin, A.** (2002) The CBEL glycoprotein of Phytophthora parasitica var-nicotianae is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *Journal of Cell Science*, **115**, 4565–4575.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barker, D.G.** (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, **17**, 3489–3499.
- Genre, A., Ortu, G., Bertoldo, C., Martino, E. and Bonfante, P.** (2009) Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiology*, **149**, 1424–1434.
- Geurts, R. and Bisseling, T.** (2002) Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, **14**, S239–S249.
- Gilbert, G.** (2003) Biologie d’Aphanomyces, oomycète responsable de la pourriture des racines du pois. *Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation, Québec*.
- Glauner, B., Höltje, J.-V. and Schwarz, U.** (1988) The composition of the murein of Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry*, **263**, 10088–10095.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W. and Oldroyd, G.E.D.** (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, **441**, 1149–1152.
- Goel, M.K., Mehrotra, S. and Kukreja, A.K.** (2011) Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Applied biochemistry and biotechnology*, **165**, 1342–1355.
- Gokulakannan, G.G. and Niehaus, K.** (2010) Characterization of the Medicago truncatula cell wall proteome in cell suspension culture upon elicitation and suppression of plant defense. *Journal of plant physiology*, **167**, 1533–1541.



- Gough, C. and Cullimore, J.** (2011) Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **24**, 867–878.
- Grachev, A.A., Gerbst, A.G., Gening, M.L., Titov, D. V., Yudina, O.N., Tsvetkov, Y.E., Shashkov, A.S., Pier, G.B. and Nifantiev, N.E.** (2011) NMR and conformational studies of linear and cyclic oligo-(1→6)-β-D-glucosamines. *Carbohydrate research*, **346**, 2499–2510.
- Granado, J., Felix, G. and Boller, T.** (1995) Perception of fungal sterols in plants. *Plant physiology*, **107**, 485–490.
- Gueddari, N.E. El, Rauchhaus, U., Moerschbacher, B.M. and Deising, H.B.** (2002) Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist*, **156**, 103–112.
- Guerriero, G., Avino, M., Zhou, Q., Fugelstad, J., Clergeot, P.-H. and Bulone, V.** (2010) Chitin synthases from *Saprolegnia* are involved in tip growth and represent a potential target for anti-oomycete drugs. *PLoS pathogens*, **6**, e1001070.
- Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M. and Nürnberger, T.** (2012) Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in plant science*, **17**, 495–502.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K.** (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1264–1300.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular cell*, **5**, 1003–1011.
- Hamel, L.-P. and Beaudoin, N.** (2010) Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta*, **232**, 787–806.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481–504.
- Hartl, L., Zach, S. and Seidl-Seiboth, V.** (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, **93**, 533–543.
- He, S.Y., Huang, H.-C. and Collmer, A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**, 1255–1266.
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M.-F. and Rinaudo, M.** (2000) Solid State NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, **1**, 746–751.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C.A.** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 10098–10103.
- Hughes, T.J. and Grau, C.R.** (2007) *Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes. *The Plant Health Instructor*.





- Hématy, K., Sado, P.-E., Tuinen, A. Van, Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.-P. and Höfte, H. (2007) A receptor-like kinase mediates the response of Arabidopsis cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Current biology*, **17**, 922–931.
- Hérouart, D., Baudouin, E., Frendo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Sype, G. Van de, Touati, D. and Puppo, A. (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–Rhizobium symbiosis? *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**, 619–624.
- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology*, **45**, 101–127.
- Inui, H., Yamaguchi, Y. and Hirano, S. (1997) Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**, 975–978.
- Jabbouri, S. and Sadovskaya, I. (2010) Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of Staphylococcus epidermidis associated with medical implant infections. *FEMS immunology and medical microbiology*, **59**, 280–291.
- James, P.G., Cherniak, R. and Jones, R.G. (1990) Cell-wall glucans of Cryptococcus neoformans. *Carbohydrate research*, **198**, 23–38.
- Jarvis, M. (2003) Cellulose stacks up. *Nature*, **426**, 611–612.
- Jasiński, M., Kachlicki, P., Rodziewicz, P., Figlerowicz, M. and Stobiecki, M. (2009) Changes in the profile of flavonoid accumulation in Medicago truncatula leaves during infection with fungal pathogen Phoma medicaginis. *Plant physiology and biochemistry*, **47**, 847–853.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anshütz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D. (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant journal*, **62**, 367–378.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., *et al.* (2001) Medicago truncatula ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **14**, 737–748.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 11086–11091.
- Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D. and Tyler, B.M. (1993) A gene encoding a host-specific elicitor protein of Phytophthora parasitica. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **6**, 573–581.
- Khatib, M., Lafitte, C., Esquerré-Tugayé, M.-T., Bottin, A. and Rickauer, M. (2004) The CBEL elicitor of Phytophthora parasitica var. nicotianae activates defence in Arabidopsis thaliana via three different signalling pathways. *New Phytologist*, **162**, 501–510.



- Kjoller, R. and Rosendahl, S.** (1998) Enzymatic Activity of the Mycelium Compared with Oospore Development During Infection of Pea Roots by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, **88**, 99299–6.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B. and Fritig, B.** (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant physiology*, **124**, 1027–1038.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H.** (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant cell*, **19**, 1065–1080.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W. and Cabib, E.** (1995) Architecture of the yeast cell wall. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 1170–1178.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. and Cabib, E.** (1997) Architecture of the yeast cell wall. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 17762–17775.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E.D.** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 9823–9828.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. and Sheen, J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 2940–2945.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A.** (1998) EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochimica et biophysica acta*, **1443**, 1–22.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and Scheel, D.** (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 2256–2264.
- Kröner, A., Hamelin, G., Andrivon, D. and Val, F.** (2011) Quantitative resistance of potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: integrating PAMP-triggered response and pathogen growth. *PLoS one*, **6**, e23331.
- Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T. and Shibuya, N.** (1995) EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells Rapid communication. *Protoplasma*, **188**, 138–142.
- Kumar, D. and Klessig, D.F.** (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **13**, 347–351.
- Kunitz, M.** (1952) Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast. *The Journal of General Physiology*, **35**, 423–450.



- 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. *The Plant Cell*, **16**, 3496–3507.
- Kwaaitaal, M., Huisman, R., Maintz, J., Reinstädler, A. and Panstruga, R.** (2011) Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in Arabidopsis thaliana. *The Biochemical journal*, **440**, 355–65.
- Kyriakis, J.M. and Avruch, J.** (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 24313–24316.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, **48**, 251–275.
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, Y. and Vierheilig, H.** (2002) Flavonoid levels in roots of Medicago sativa are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of plant physiology*, **159**, 1329–1339.
- Lasa, I.** (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International microbiology*, **9**, 21–28.
- Latgé, J.P., Mouyna, I., Tekaia, F., Beauvais, A., Debeaupuis, J.P. and Nierman, W.** (2005) Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of Aspergillus fumigatus. *Medical Mycology*, **43**, 15–22.
- Leclercq, J., Fliegmann, J., Tellström, V., Niebel, A., Cullimore, J. V., Niehaus, K., Küster, H., Ebel, J. and Mithöfer, A.** (2008) Identification of a multigene family encoding putative beta-glucan-binding proteins in Medicago truncatula. *Journal of plant physiology*, **165**, 766–776.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell calcium*, **38**, 527–538.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in Nicotiana plumbaginifolia cells. *The Plant Cell*, **14**, 2627–2641.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *The New phytologist*, **171**, 249–69.
- Lee, H., Kim, J., Im, J.H., Kim, H.B., Oh, C.J. and An, C.S.** (2008) Mitogen-Activated Protein Kinase is involved in the symbiotic interaction between Bradyrhizobium japonicum USDA110 and soybean. *Journal of Plant Biology*, **51**, 291–296.
- Lee, K., Song, E.H., Kim, H.S., et al.** (2008) Regulation of MAPK phosphatase 1 (AtMKP1) by calmodulin in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 23581–23588.
- Lee, S.W., Han, S.W., Sririyanum, M., Park, C.J., Seo, Y.S. and Ronald, P.C.** (2009) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*, **326**, 850–853.



- Lei, Z., Chen, F., Watson, B.S., Nagaraj, S., Elmer, A.M., Dixon, R.A. and Sumner, L.W.** (2010) Comparative proteomics of yeast-elicited *Medicago truncatula* cell suspensions reveals induction of isoflavonoid biosynthesis and cell wall modifications. *Journal of Proteome Research*, **9**, 6220–6231.
- Leitner, M., Kaiser, R., Rasmussen, M.O., Driguez, H., Boland, W. and Mithöfer, A.** (2008) Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signalling components in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, **69**, 2029–2040.
- Lepagnol-Descamps, V., Richard, C., Lahaye, M., Potin, P., Yvin, J.-C. and Kloareg, B.** (1998) Purification and determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* laminarinase. *Carbohydrate research*, **310**, 283–289.
- Levenfors, J.** (2003) *Soil-borne pathogens in intensive legume cropping - Aphanomyces spp. and root rots.*
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y. and Zhou, J.-M.** (2010) Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant physiology*, **152**, 2222–2231.
- Liaud, M., Lichtlé, C., Apt, K., Martin, W. and Cerff, R.** (2000) Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Molecular biology and evolution*, **17**, 213–223.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. and Geurts, R.** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, **302**, 630–633.
- Lin, C.C. and Aronson, J.M.** (1970) Chitin and cellulose in the cell walls of the Oomycete, *Apodachlya* sp. *Archiv für Mikrobiologie*, **72**, 111–114.
- Lindberg, B. and McPherson, J.** (1954) Studies on the chemistry of lichens VI. The structure of pustulan. *Acta Chemica Scandinavica*, **8**, 985–988.
- Lindstrom, J.T., Sun, S. and Belanger, F.C.** (1993) A novel fungal protease expressed in endophytic infection of *Poa* species. *Plant physiology*, **102**, 645–650.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., et al.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, **310**, 1180–1183.
- Lippman, E., Erwin, D.C. and Bartnicki-Garcia, S.** (1974) Isolation and chemical composition of oospore-oogonium walls of *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Journal of general microbiology*, **80**, 131–141.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., et al.** (2012) Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science*, **336**, 1160–1164.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods*, **25**, 402–408.





- Lizasa, E., Mitsutomi, M. and Nagano, Y.** (2010) Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 2996–3004.
- Lohar, D.P., Haridas, S., Gantt, J.S. and VandenBosch, K.A.** (2007) A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *The New phytologist*, **173**, 39–49.
- Lohmann, G. V., Shimoda, Y., Nielsen, M.W., et al.** (2010) Evolution and regulation of the Lotus japonicus LysM receptor gene family. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **23**, 510–521.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- Lu, X., Tintor, N., Mentzel, T., Kombrink, E., Boller, T., Robatzek, S., Schulze-Lefert, P. and Saijo, Y.** (2009) Uncoupling of sustained MAMP receptor signaling from early outputs in an Arabidopsis endoplasmic reticulum glucosidase II allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 22522–22527.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J.** (2011) Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **24**, 183–193.
- Madsen, E.B., Antolin-Llovera, M., Grossmann, C., et al.** (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the Lotus japonicus Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *The Plant Journal*, **65**, 404–417.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., et al.** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, **425**, 637–640.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K. and Stougaard, J.** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume Lotus japonicus. *Nature communications*, **1**, 1–12.
- Maillet, F., Poinso, V., André, O., et al.** (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, **469**, 58–64.
- Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., et al.** (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infection and Immunity*, **70**, 4433–4440.
- Majeau, N., Trudel, J. and Asselin, A.** (1990) Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. *Plant Science*, **68**, 9–16.
- Manjanna, K.M., Shivakumar, B. and Pramodkumar, T.M.** (2009) Natural exopolysaccharides as novel excipients in drug delivery: A review. *Archives of Applied Science Research*, **1**, 230–253.
- Manners, D.J. and Meyers, M.T.** (1977) The molecular structure of some glucans from the cell walls of Schizosaccharomyces pombe. *Carbohydrate research*, **57**, 189–203.



- Marin-Rodriguez, M.C.** (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2115–2119.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M. and Takenaka, S.** (2011) Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses Isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and Environments*, **26**, 128–134.
- Matamoros, M.A., Dalton, D.A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C. and Becana, M.** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant physiology*, **133**, 499–509.
- Matsumoto, K.S.** (2006) Fungal chitinases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, **661**, 289–304.
- Matthysse, A.G., Deora, R., Mishra, M. and Torres, A.G.** (2008) Polysaccharides cellulose, poly-B-1,6-N-acetyl-D-glucosamine, and colanic acid are required for optimal binding of *Escherichia coli* O157:H7 strains to alfalfa sprouts and K-12 strains to plastic but not for binding to epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2384–2390.
- McCord, J.M. and Fridovich, I.** (1969) peroxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049–6055.
- McLeod, A., Smart, C.D. and Fry, W.E.** (2003) Characterization of 1,3-B-glucanase and 1,3;1,4-B-glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*, **38**, 250–263.
- Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, J., Ponstein, A.S., Sela-Burlage, M.B., Bol, J.F., Comelissen, B.J.C., Elzen, P.J.M. van den and Linthorst, H.J.M.** (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal*, **5**, 469–480.
- Metraux, J.P., Burkhart, W., Moyert, M., Dinichert, S., Middlesteadt, W., Williamst, S., Paynet, G., Carnest, M. and Ryalst, J.** (1989) Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozym/chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 896–900.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabières, F., Ricci, P. and Blein, J.P.** (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **245**, 133–139.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D. and Ausubel, F.M.** (2010) Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell*, **22**, 973–990.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Daxberger, A., Ebel, C., Neuhaus-Url, G., Bhagwat, A.A., Keister, D.L. and Ebel, J.** (2001) Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis by B-glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Letters*, **508**, 191–195.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H. and Ebel, J.** (2000) The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biological Chemistry*, **381**, 705–713.



- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D. and Long, S.R.** (2004) A Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development : Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 4701–4705.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. Van** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, **9**, 490–498.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., et al.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase , is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 19613–19618.
- Money, N.P.** (1998) Why oomycetes have not stopped being fungi. *Mycological Research*, **102**, 767–768.
- Monteiro, M.A., Slavic, D. and Michael, F. St.** (2000) The first description of a (1 → 6)-β-D-glucan in prokaryotes: (1 → 6)-β-D-glucan is a common component of *Actinobacillus suis* and is the basis for a serotyping system. *Carbohydrate research*, **329**, 121–130.
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., et al.** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant physiology*, **138**, 1516–1526.
- Mort-Bontemps, M., Gay, L. and Fèvre, M.** (1997) CHS2, a chitin synthase gene from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology (Reading, England)*, **143**, 2009–2020.
- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X.** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935–944.
- Moussart, A., Even, M.N. and Tivoli, B.** (2008) Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, **122**, 321–333.
- Moy, M., Li, H.M., Sullivan, R., White Jr., J.F. and Belanger, F.C.** (2002) Endophytic fungal B-1,6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant physiology*, **130**, 1298–1308.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J. and Imberty, A.** (2006) LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology*, **16**, 801–809.
- Mur, L.A.J., 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 ? *Journal of experimental botany*, **59**, 501–520.
- Ménard, R., Alban, S., Ruffray, P. de, Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Yvin, J.-C. and Kauffmann, S.** (2004) B-1,3 glucan sulfate, but not B-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in Tobacco and Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 3020–3032.
- Müller, J., Staehelin, C., Xie, Z.-P., Neuhaus-Url, G. and Boller, T.** (2000) Nod factors and chitooligomers elicit an increase in cytosolic calcium in aequorin-expressing soybean cells. *Plant physiology*, **124**, 733–739.



- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., et al.** (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume - Rhizobium symbiosis. *The Plant Journal*, **65**, 169–180.
- Nars, A., Rey, T., Lafitte, C., et al.** (2013) An experimental system to study responses of *Medicago truncatula* roots to chitin oligomers of high degree of polymerization and other microbial elicitors. *Plant cell reports*.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J.** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology*, **5**, 388–395.
- 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.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. and Langan, P.** (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 14300–14306.
- Nyamsuren, O., Colditz, F., Rosendahl, S., Tamasloukht, M.B., Bekel, T., Meyer, F., Kuester, H., Franken, P. and Krajinski, F.** (2003) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **63**, 17–26.
- Nühse, T.S., Bottrill, A.R., Jones, A.M.E. and Peck, S.C.** (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *The Plant journal*, **51**, 931–940.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004) Innate immunity in plants and animals : striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, **198**, 249–266.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., et al.** (2008) Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 8885–8892.
- Ohnuma, T., Onaga, S., Murata, K., Taira, T. and Katoh, E.** (2008) LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: a stability study and characterization of the chitin-binding site. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 5178–5187.
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N. and Yoshikawa, M.** (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant B-1,3-endoglucanase. *Plant Physiology*, **109**, 839–845.
- Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A.** (2006) Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current opinion in plant biology*, **9**, 351–357.
- Op den Camp, R., Streng, A., Mita, S. De, et al.** (2011) LysM-Type mycorrhizal receptor recruited for Rhizobium symbiosis in nonlegume Parasponia. *Science*, **331**, 909–912.
- Osmond, B.C., Specht, C.A. and Robbins, P.W.** (1999) Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and “stress related” chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 11206–10.





- O'Brien, J.A., Daudi, A., Finch, P., Butt, V.S., Whitelegge, J.P., Souda, P., Ausubel, F.M. and Bolwell, G.P.** (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured Arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*, **158**, 2013–2027.
- O'Brien, J.A.O., Daudi, A., Butt, V.S. and Bolwell, G.P.** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, **236**, 765–779.
- Papavizas, G.C. and Ayers, W.A.** (1974) Aphanomyces species and their root diseases in pea and sugarbeet. *Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Technical*.
- Papavizas, G.C. and Ayers, W.A.** (1964) Effect of various carbon sources on growth and sexual reproduction of Aphanomyces euteiches. *Mycologia*, **56**, 816–830.
- Pape, S., Thurow, C. and Gatz, C.** (2010) The Arabidopsis PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SNI1. *Plant physiology*, **154**, 1805–1818.
- Park, C.J., Lee, S.W., Chern, M., Sharma, R., Canlas, P.E., Song, M.Y., Jeon, J.S. and Ronald, P.C.** (2010) Ectopic expression of rice Xa21 overcomes developmentally controlled resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae. *Plant Science*, **179**, 466–471.
- Parniske, M.** (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants : a common developmental program for symbiosis and disease ? *Current opinion in plant biology*, **3**, 320–328.
- Parniske, M. and Downie, J.A.** (2003) Locks, keys and symbioses. *Nature*, **425**, 569–570.
- Pedras, M.S., Okanga, F.I., Zaharia, I.L. and Khan, A.Q.** (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry*, **53**, 161–176.
- Pedras, M.S. and Yaya, E.E.** (2010) Phytoalexins from Brassicaceae: News from the front. *Phytochemistry*, **71**, 1191–1197.
- Pedras, M.S., Yaya, E.E. and Glawischnig, E.** (2011) The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Natural Product Reports*, **28**, 1381–1405.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**, 731–734.
- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N. and Levine, A.** (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 409–415.
- Peleg-Grossman, S., Volpin, H. and Levine, A.** (2007) Root hair curling and Rhizobium infection in Medicago truncatula are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of experimental botany*, **58**, 1637–1649.
- Peng, M. and Kuc, J.** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, **82**, 696–699.



- Petutschnig, E.K., Jones, A.M.E., Serazetdinova, L., Lipka, U. and Lipka, V.** (2010) The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 28902–28911.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. and Koonin, E. V.** (1999) Eukaryotic signalling domain homologues in Archaea and Bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *Journal of molecular biology*, **289**, 729–745.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., et al.** (2005) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*, **165**, 683–701.
- Qiu, X., Lei, C., Huang, L., et al.** (2012) Endogenous hydrogen peroxide is a key factor in the yeast extract-induced activation of biphenyl biosynthesis in cell cultures of *Sorbus aucuparia*. *Planta*, **235**, 217–223.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., et al.** (2007) LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal*, **26**, 3923–3935.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., et al.** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585–592.
- Ramu, S.K., Peng, H.-M. and Cook, D.R.** (2002) Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **15**, 522–528.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. and Scheel, D.** (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, **68**, 100–113.
- Rasmussen, M.W., Roux, M., Petersen, M. and Mundy, J.** (2012) MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 1–6.
- Read, S.M., Currie, G. and Bacic, A.** (1996) Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, **281**, 187–201.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., et al.** (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **427**, 858–861.
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., et al.** (2013) NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytologist*.
- Roberts, G.A.F.** (2008) Thirty years of progress in chitin and chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*, **13**, 7–15.
- Rodriguez-Celma, J., Vazquez-Reina, S., Orduna, J., Abadia, A., Abadia, J., Alvarez-Fernandez, A. and Lopez-Millan, A.-F.** (2011) Characterization of flavins in roots of Fe-deficient strategy I plants, with focus on *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 2173–2189.



- Ron, M. and Avni, A.** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant cell*, **16**.
- Rotblat, B., Enshell-Seiffers, D., Gershoni, J.M., Schuter, S. and Avni, A.** (2002) Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *The Plant journal*, **31**, 1049–1055.
- Roux, C., Mazau, D., Rickauer, M., Fournier, J., Bertholon, E. and Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1994) Hydroxyproline-containing fragments in the cell wall of *Phytophthora parasitica*. *Phytochemistry*, **35**, 591–595.
- Rubio, M.C., James, E.K., Clemente, M.R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C.P. and Becana, M.** (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **17**, 1294–1305.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R.** (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*, **6**, 14–29.
- Ruiz-Herrera, J. and San-Blas, G.** (2003) Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. *Current Drug Target - Infections Disorders*, **3**, 77–91.
- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R. and Martinez, J.P.** (1992) Chitin biosynthesis in fungi. In D. K. Arora, R. P. Elander, and K. G. Mukerji, eds. *Handbook of Applied Mycology. Vol. 4*. New York, pp. 281–312.
- Rupley, J.A.** (1964) The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochimica et biophysica acta*, **83**, 245–255.
- Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajerowska-Mukhtar, K., Häweker, H., Dong, X., Robatzek, S. and Schulze-Lefert, P.** (2009) Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *The EMBO Journal*, **28**, 3439–3449.
- Salzer, P., Corbière, H. and Boller, T.** (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, **208**, 319–325.
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. and Puppo, A.** (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **14**, 86–89.
- Savouré, A., Sallaud, C., El-Turk, J., Zuanazzi, J., Ratet, P., Schultze, M., Kondorosi, A., Esnault, R. and Kondorosi, E.** (1997) Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *The Plant Journal*, **11**, 277–287.
- Scheidle, H., Gross, A. and Niehaus, K.** (2005) The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytologist*, **165**, 559–566.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O.** (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, **36**, 407–477.



- Sedbrook, J.C., Kronebusch, P.J., Borisy, G.G., Trewavas, A.J. and Masson, P.H.** (1996) Transgenic Aequorin reveals organ-specific cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*, **111**, 243–257.
- Sekizaki, H., Yokosawa, R., Chinen, C., Adachi, H. and Yamane, H.** (1993) Studies on zoospore attracting activity. II. Synthesis of isoflavones and their attracting activity to *Aphanomyces euteiches* zoospore. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **16**, 698–701.
- Selim, S., Negrel, J., Wendehenne, D., Ochatt, S., Gianinazzi, S. and Tuinen, D. van** (2010) Stimulation of defense reactions in *Medicago truncatula* by antagonistic lipopeptides from *Paenibacillus* sp. strain B2. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 7420–7428.
- Sels, J., Mathys, J., Coninck, B.M.A. De, Cammue, B.P.A. and Bolle, M.F.C. De** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 941–950.
- Selvendran, R.R., Stevens, B.J.H. and O’Neil, M.A.** (1985) Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. *Seminar series - Society for Experimental Biology*, **28**, 39–78.
- Serna-Sanz, A., Parniske, M. and Peck, S.C.** (2011) Phosphoproteome analysis of *Lotus japonicus* roots reveals shared and distinct components of symbiosis and defense. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **24**, 932–937.
- Shao, H., Dixon, R.A. and Wang, X.** (2007) Crystal structure of vestitone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of molecular biology*, **369**, 265–276.
- 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 Physiology*, **127**, 1089–1101.
- Sharp, J.K., Valent, B. and Albersheim, P.** (1984) Purification and partial characterization of a B-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 11312–11320.
- Shaw, L.J., Morris, P. and Hooker, J.E.** (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, **8**, 1867–1880.
- Shaw, S.L. and Long, S.R.** (2003a) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiology*, **131**, 976–984.
- Shaw, S.L. and Long, S.R.** (2003b) Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiology*, **132**, 2196–2204.
- Shibuya, N. and Minami, E.** (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**, 223–233.
- Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Okada, K., Nojiri, H. and Yamane, H.** (2012) Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 19315–19325.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., et al.** (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal*, **64**, 204–214.





- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H. and Shibuya, N.** (2012) Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and Rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant & cell physiology*, **53**, 1696–1706.
- Shiu, S.-H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.-H., Mayer, K.F.X. and Li, W.-H.** (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and Rice. *The Plant Cell*, **16**, 1220–1234.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J. and Barker, D.G.** (2009) A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiology*, **151**, 1197–1206.
- Sietsma, J.H., Child, J.J., Nesbitt, L.R. and Haskins, R.H.** (1975) Ultrastructural aspects of wall regeneration by *Pythium* protoplasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **41**, 17–23.
- Sietsma, J.H., Eveleigh, D.E. and Haskin, R.H.** (1969) Cell wall composition and protoplast formation of some oomycete species. *Biochimica et biophysica acta*, **184**, 306–317.
- Sietsma, J.H. and Wessels, J.G.H.** (1977) Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **496**, 225–239.
- Silhavy, T.J., Kahne, D. and Walker, S.** (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, 1–16.
- Singh, S. and Parniske, M.** (2012) Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, **15**, 1–10.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C. and Bisseling, T.** (2007) *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant physiology*, **145**, 183–191.
- Somogyi, M.** (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **195**, 19–23.
- Sonia, M. and Dietrich, M.** (1973) Carbohydrates from the hyphal walls of some oomycetes. *Biochimica et biophysica acta*, **313**, 95–98.
- Soto, M.J., Domínguez-ferreras, A., Pérez-mendoza, D., Sanjuán, J. and Olivares, J.** (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology*, **11**, 381–388.
- Spronsen, P.C. van, Bakhuizen, R., Brussel, A.A. van and Kijne, J.W.** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *European Journal of Cell Biology*, **64**, 88–94.
- Stacey, G. and Shibuya, N.** (1997) Chitin recognition in rice and legumes. *Plant and Soil*, **194**, 161–169.
- Strauch, L.** (1965) Ultra-mikromethode zur Stickstoff Bestimmung in biologischem Material. *Zeitschrift für Klinische Chemie*, **5**, 165–167.



- Takemoto, D., Tanaka, A. and Scott, B.** (2007) NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*, **44**, 1065–1076.
- Tellström, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Küster, H. and Niehaus, K.** (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, **143**, 825–37.
- Thieringer, H.A., Jones, P.G. and Inouye, M.** (1998) Cold shock and adaptation. *Bioessays*, **20**, 49–57.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T. and Mueller, M.J.** (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal*, **34**, 363–375.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., et al.** (2006) Deregulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, **441**, 1153–1156.
- Trapphoff, T., Beutner, C., Niehaus, K. and Colditz, F.** (2009) Induction of distinct defense-associated protein patterns in *Aphanomyces euteiches* (Oomycota)–elicited and–inoculated *Medicago truncatula* cell-suspension cultures: A proteome and phosphoproteome approach. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **22**, 421–436.
- Trevelyan, W.E. and Harrison, J.S.** (1952) Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochemistry Journal*, **50**, 298–303.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yashikawa, M., Yamaoka, N. and Ishida, I.** (1997) The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 1029–1034.
- Valdés-López, O., Thibivilliers, S., Qiu, J., et al.** (2011) Identification of quantitative trait loci controlling gene expression during the innate immunity response of soybean. *Plant physiology*, **157**, 1975–1986.
- Villalba Mateos, F., Rickauer, M. and Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding an elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* that shows cellulose-binding and lectin-like activities. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **10**, 1045–1053.
- Vink, E., Rodriguez-Suarez, R.J., Gérard-Vincent, M., Ribas, J.C., Nobel, H. de, Ende, H. van den, Duran, A., Klis, F.M. and Bussey, H.** (2004) An in vitro assay for (1→6)-β-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **21**, 1121–1131.
- Vleeshouwers, V.G., Dooijeweert, W. van, Govers, F., Kamoun, S. and Colon, L.T.** (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, **210**, 853–864.
- Walker, S.A., Viprey, V. and Downie, J.A.** (2000) Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 13413–13418.
- Wan, J., Tanaka, K., Zhang, X.-C., Son, G.H., Brechenmacher, L., Nguyen, T.H.N. and Stacey, G.** (2012) LYK4, a LysM receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Preview*, [Epub ahead of print].



- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K., Clough, S., Kim, S.-Y., Stacey, M.G. and Stacey, G.** (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **20**, 471–481.
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J.D., Katagiri, F. and Glazebrook, J.** (2009) Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathogens*, **5**, 1–14.
- Wang, X., Hadrami, A. El, Adam, L.R. and Daayf, F.** (2008) Differential activation and suppression of potato defence responses by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes. *Plant Pathology*, **57**, 1026–1037.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. and Jin, L.** (2011) Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, **159**, 3627–3633.
- Watt, S.A., Tellström, V., Patschkowski, T. and Niehaus, K.** (2006) Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. *Journal of Biotechnologies*, **126**, 78–86.
- Wei, G. and Shirsat, A.H.** (2006) Extensin over-expression in Arabidopsis limits pathogen invasiveness. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 579–592.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S. V.** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85–88.
- Werner, S., Steiner, U., Becher, R., Kortekamp, A., Zyprian, E. and Deising, H.B.** (2002) Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiology Letters*, **208**, 169–173.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., et al.** (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 19824–19829.
- Winkel-Shirley, B.** (2001) It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, **127**, 1399–1404.
- Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., et al.** (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *The Plant Cell*, **19**, 4022–4034.
- Xie, F., Murray, J.D., Kim, J., Heckmann, A.B., Edwards, A., Oldroyd, G.E.D. and Downie, J.A.** (2012) Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 633–638.
- Xie, X. and Lipke, N.** (2010) On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast*, **27**, 479–488.
- Yakandawala, N., Gawande, P. V., Lovetri, K., Cardona, S.T., Romeo, T., Nitz, M. and Madhyastha, S.** (2011) Characterization of the poly-B-1, 6-N-acetylglucosamine polysaccharide component of Burkholderia biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 8303–8309.



- Yakushiji, S., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y.** (2009) Bacterial DNA activates immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, **75**, 227–234.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T. and Ishii, T.** (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean : B-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant cell*, **12**, 817–826.
- Yang, K.-Y., Liu, Y. and Zhang, S.** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 741–746.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N.** (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91 phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant cell*, **15**, 706–718.
- Zevenhuizen, L.P. and Bartnicki-Garcia, S.** (1969) Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamomi*. *Biochemistry*, **8**, 1496–1502.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science*, **6**, 520–527.
- Zhang, X.-C., Cannon, S.B. and Stacey, G.** (2009) Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC evolutionary biology*, **9**, 183–196.
- Zhang, X.-C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H.T., Cannon, S.B. and Stacey, G.** (2007) Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiology*, **144**, 623–636.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes ? *Current opinion in plant biology*, **8**, 353–360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G.** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749–760.





# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS A DES COLLOQUES

## **Publications :**

Rey T.\* , **Nars A.\*** , Bonhomme M., Bottin A., Huguet S., Balzergue S., Jardinaud M.-F., Bono J.-J., Cullimore J., Dumas B., Gough C. and Jacquet C. (2013) NFP, a LysM protein controlling Nod Factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytologist* (sous presse).

**Nars A.\*** , Rey T.\* , Lafitte C., Vergnes S., Amatya S., Jacquet C., Dumas B., Thibaudeau C., Heux L., Bottin A.\*\* , Fliegmann J.\*\* (2013) An experimental system to study responses of *Medicago truncatula* roots to chitin oligomers and microbial elicitors. *Plant Cell Reports* (sous presse).

## **Communications orales :**

Bottin A., **Nars A.**, Rey T., Lafitte C., Brown C., Melida H., Ramirez D., Fliegmann J., Heux L., Bulone V., Jacquet C., Gaulin E., Dumas B. (2012). Insight into *Medicago truncatula* immunity and *Aphanomyces euteiches* PAMPs and effectors. Oomycete Molecular Genetics Network Meeting, May 26-28, Nanjing, China.

Dumas B., **Nars A.**, Ramirez D., Rey T., Lafitte C., Bottin A., Gaulin E., Jacquet C. (2011) Perception and role of *Aphanomyces euteiches* effectors on *Medicago truncatula* roots: Is there molecular crosstalk between symbiotic and pathogenic signals? Oomycete Molecular Genetics Network Meeting, March 13-15, Asilomar, USA.

**Nars A.**, Lafitte C., Heux L., Badreddine I., Bono J.-J., Dumas B., Fliegmann J., and Bottin A. (2010) Are chitin synthases targets for antimicrobial compounds and sources of MAMPs in oomycetes? Oomycete Molecular Genetics Network Meeting, Jun 6-8, Toulouse, France.



## **Communications sous forme d'affiches :**

**Nars A.**, Lafitte C., Lecostaouec T., Chanzy H., Badreddine I., Bono J.J., Dumas B., Bulone V., Fliegmann J., L. Heux and A. Bottin (2011) Cell wall structural polysaccharides as drug targets and host immunity inducers in oomycetes: the case of *Aphanomyces euteiches* chitosaccharides. Second International Fungal Cell Wall Meeting, October 7-10, Giens, France.

**Fliegmann J.**, Uhlenbroich S., Klaus D., **Nars A.**, Gough C., Bottin A., Cullimore J., Bono J-J. (2010) LysM-containing proteins in *Medicago truncatula*. Keystone Symposium "Receptors and Signaling in Plant Development and Biotic Interactions", March 14-19, Tahoe City, USA.

**Nars A.**, Lafitte C., Badreddine I., Heux L., Bono J-J., Dumas B., Fliegmann J., Bottin A. (2010) Identification of new MAMPs from the *Aphanomyces euteiches* cell wall. Journées Jean Chevaugéon "8<sup>èmes</sup> Rencontres de Phytopathologie - Mycologie de la Société Française de Phytopathologie", January 25-29, Aussois, France.

**Fliegmann J.**, Uhlenbroich S., Klaus D., **Nars A.**, Gough C., Bottin A., Cullimore J., Bono J-J. (2009) Fishing for function in the *Medicago truncatula* LysM-containing protein family. International Meeting of the German Botanical Society "Plants for the Future", September 6-11, Leipzig, RFA.

**Fliegmann J.**, Uhlenbroich S., Klaus D., **Nars A.**, Gough C., Bottin A., Cullimore J., Bono J-J. (2009) Fishing for function in the *Medicago truncatula* LysM-containing protein family. Model Legume Congress, July 12-16, Asilomar, USA.

**Nars A.**, Lafitte C., Badreddine I., Dumas B., Bottin A. (2009) Addressing the biological activity of *Aphanomyces euteiches* cell wall glucan-chitosaccharides in *Medicago truncatula*. Oomycete Molecular Genetics Network Workshop, March 15-17, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, CA.



*“Such order in the midst of chaos makes me woozy and disoriented.”*

*Alice*



## TITLE

Structural characterization and perception by the host plant *Medicago truncatula* of the cell wall chitosaccharides of the legume parasite *Aphanomyces euteiches*.

---

## ABSTRACT

The oomycete *Aphanomyces euteiches* is a root pathogen infecting legumes which causes important yield losses. The cell walls of *A.euteiches* contain 10% *N*-acetylglucosamine (NAG) in the form of non-crystalline chitosaccharides, which are associated to cell wall glucans. To study their biological activity, a root elicitation bioassay on the host plant *Medicago truncatula* has been set up using a preparation of chitin fragments. The purification of hydrolysed cell wall fractions enriched in NAG yielded glycan fragments which were composed of glucose and NAG. These heteropolymers possess a novel structure, which has never been described before. The root elicitation bioassay showed a biological activity different to the one of chitin fragments, on *M.truncatula*. Interestingly, one fraction induced nuclear calcium spiking in epidermal cells of *M.truncatula* root cultures, which seems to be different to the response evoked by pure chitotetramers.





**AUTEUR**

Amaury NARS

**TITRE**

Caractérisation structurale et perception par la plante hôte *Medicago truncatula* des chitosaccharides pariétaux d'*Aphanomyces euteiches*, parasite de légumineuses

**DIRECTEURS DE THESE**

Arnaud BOTTIN (Maître de Conférences, UT3, Toulouse)

Judith FLIEGMANN (Chargée de Recherche Contractuelle, INRA, Toulouse)

**DATE ET LIEU DE SOUTENANCE**

Mardi 19 Février 2013, salle de conférences Marc Ridet (INRA Toulouse)

---

**RESUME**

*Aphanomyces euteiches* est un oomycète parasite racinaire des légumineuses causant des pertes de rendement récurrentes. La paroi d'*A.euteiches* contient 10% de *N*-acétylglucosamine (NAG) sous la forme de chitosaccharides non cristallins, associés aux glucanes pariétaux. Afin de pouvoir étudier leur activité biologique, un bioessai d'élicitation du système racinaire de la plante hôte *Medicago truncatula* a été mis au point en utilisant une préparation de fragments de chitine. La purification de fractions de parois hydrolysées, enrichies en NAG a donné des fragments de glycanes composés de glucose et de NAG. Ces hétéropolymères présentent une structure nouvelle jamais décrite à ce jour. Le bioessai d'élicitation racinaire a révélé une activité biologique différente de celle des fragments de chitine chez *M.truncatula*. De façon intéressante, l'une des fractions induit des oscillations calciques nucléaires originales dans les cellules épidermiques de cultures de racines de *M.truncatula*, qui semblent différentes de la réponse provoquée par des chitotétramères purs.

---

**MOTS CLES**

*Aphanomyces euteiches* ; *Medicago truncatula* ; Oomycètes ; Paroi ; Chitosaccharides ; Chitine ; Eliciteur ; Espèces Réactives de l'Oxygène ; Gènes Relatifs à la Défense.

**DISCIPLINE**

Interactions Plantes-Microorganismes

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, LRSV, UMR 5546 CNRS-UPS, Pôle de Biotechnologies Végétales, 24 Chemin de Borde-Rouge, B.P. 42617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France.



## TITLE

Structural characterization and perception by the host plant *Medicago truncatula* of the cell wall chitosaccharides of the legume parasite *Aphanomyces euteiches*.

---

## ABSTRACT

The oomycete *Aphanomyces euteiches* is a root pathogen infecting legumes which causes important yield losses. The cell walls of *A.euteiches* contain 10% *N*-acetylglucosamine (NAG) in the form of non-crystalline chitosaccharides, which are associated to cell wall glucans. To study their biological activity, a root elicitation bioassay on the host plant *Medicago truncatula* has been set up using a preparation of chitin fragments. The purification of hydrolysed cell wall fractions enriched in NAG yielded glycan fragments which were composed of glucose and NAG. These heteropolymers possess a novel structure, which has never been described before. The root elicitation bioassay showed a biological activity different to the one of chitin fragments, on *M.truncatula*. Interestingly, one fraction induced nuclear calcium spiking in epidermal cells of *M.truncatula* root cultures, which seems to be different to the response evoked by pure chitotetramers.

**AUTEUR**

Amaury NARS

**TITRE**

Caractérisation structurale et perception par la plante hôte *Medicago truncatula* des chitosaccharides pariétaux d'*Aphanomyces euteiches*, parasite de légumineuses

**DIRECTEURS DE THESE**

Arnaud BOTTIN (Maître de Conférences, UT3, Toulouse)

Judith FLIEGMANN (Chargée de Recherche Contractuelle, INRA, Toulouse)

**DATE ET LIEU DE SOUTENANCE**

Mardi 19 Février 2013, salle de conférences Marc Ridet (INRA Toulouse)

---

**RESUME**

*Aphanomyces euteiches* est un oomycète parasite racinaire des légumineuses causant des pertes de rendement récurrentes. La paroi d'*A.euteiches* contient 10% de *N*-acétylglucosamine (NAG) sous la forme de chitosaccharides non cristallins, associés aux glucanes pariétaux. Afin de pouvoir étudier leur activité biologique, un bioessai d'élicitation du système racinaire de la plante hôte *Medicago truncatula* a été mis au point en utilisant une préparation de fragments de chitine. La purification de fractions de parois hydrolysées, enrichies en NAG a donné des fragments de glycanes composés de glucose et de NAG. Ces hétéropolymères présentent une structure nouvelle jamais décrite à ce jour. Le bioessai d'élicitation racinaire a révélé une activité biologique différente de celle des fragments de chitine chez *M.truncatula*. De façon intéressante, l'une des fractions induit des oscillations calciques nucléaires originales dans les cellules épidermiques de cultures de racines de *M.truncatula*, qui semblent différentes de la réponse provoquée par des chitotétramères purs.

---

**MOTS CLES**

*Aphanomyces euteiches* ; *Medicago truncatula* ; Oomycètes ; Paroi ; Chitosaccharides ; Chitine ; Eliciteur ; Espèces Réactives de l'Oxygène ; Gènes Relatifs à la Défense.

**DISCIPLINE**

Interactions Plantes-Microorganismes

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, LRSV, UMR 5546 CNRS-UPS, Pôle de Biotechnologies Végétales, 24 Chemin de Borde-Rouge, B.P. 42617 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan, France.