



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité :

Biosciences Végétales

Présentée et soutenue par

Nicolas Denancé

Le vendredi 10 juin 2011 à 13h30

Titre :

Rôle de la paroi végétale dans l'interaction entre Arabidopsis thaliana et Ralstonia solanacearum : criblage de mutants "paroi" et caractérisation fine de la résistance accrue du mutant walls are thin 1 (wat1)

JURY

Matthieu Arlat, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Toulouse

Azeddine Driouich, Professeur de l'Université de Rouen, Rouen

Harald Keller, Directeur de Recherche INRA, Sophia-Antipolis

Frédérique Van Gijsegem, Chargée de Recherche INRA, Paris

Stéphane Genin, Directeur de Recherche CNRS, Toulouse

Deborah Goffner, Directrice de Recherche CNRS, Toulouse

Laurent Hoffmann, Maître de Conférences UPS, Toulouse

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

Unité de recherche : *Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV)-UMR5546 CNRS/UPS*

Directeur(s) de Thèse : *Deborah Goffner, Laurent Hoffmann*

Rapporteurs : *Harald Keller, Frédérique Van Gijsegem*

Tout d'abord, je tiens à remercier chacun des membres du Jury pour avoir jugé ce travail : merci à **Frédérique Van Gijsegem** et **Harald Keller** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, à **Azeddine Driouich** pour en avoir été examinateur, à **Stéphane Genin** pour sa présence en tant que membre invité et à **Matthieu Arlat** pour avoir accepté de présider ce jury. Je suis très honoré de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et je vous remercie pour la discussion très enrichissante que vous avez apportée.

Je remercie également **Marie Baucher**, **Emmanuelle Lauber** et **Nemo Peeters** pour leur participation lors des comités de thèse. Vos réflexions m'ont beaucoup servi et ont contribué à faire avancer ce travail.

Parce qu'une thèse est une aventure scientifique et humaine qui ne peut se réaliser tout seul, je tiens à exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui ont apporté, à leur manière, leur pierre à l'édifice. Pour cela, je dois un immense merci à **Deborah**, pour m'avoir confié ce projet. Merci pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces quelques années passées dans ton équipe. Je te suis très reconnaissant de m'avoir permis de participer à autant de congrès, tous les thésards n'ont pas cette chance. Je suis heureux d'avoir fait partie de l'aventure DX, riche en rebondissements... Mes remerciements s'adressent à toute l'équipe DX avec qui j'ai partagé le quotidien depuis quatre ans : **Laurent**, pour ton encadrement pendant le M2R puis au cours de ma thèse ; **Philippe**, sans qui il n'aurait pas été possible de présenter tout ces résultats aujourd'hui ; **Cathy**, pour les séances de microscopie au cours desquelles ton œil avisé m'a fait découvrir de nombreuses choses ; **Odile** et **Magalie**, pour votre gentillesse ; **Sarah**, qui a apporté un peu d'exotisme en provenance de « L'île de Maurice » ; profite bien de tes derniers instants de repos, dans quelques semaines, ça sera ton tour !! Bon courage pour cette fin de thèse, tu mérites de finir sur une bonne note. Et enfin, **Dom** qui, malgré un humour (parfois) douteux, a contribué à la bonne humeur de l'équipe. Il n'y a pas à dire, c'était vraiment bien quand t'étais là ! Je n'oublierai pas de te rappeler que tu nous dois encore un pot pour ton départ de l'équipe et ton entrée dans le monde des "permanents" ! C'était il y a 2 ans, non ?...

Je remercie l'ensemble des membres du LRSV pour leur sympathie et leur générosité. Un merci particulier à **Michèle**, pour s'être occupée de mon dossier et des renouvellements de contrat avec brio même lorsque les délais étaient courts ; **Catherine**, pour son efficacité à gérer nos exigences en matière de commandes ; **Nicole**, pour son efficacité à gérer les déplacements et toute la paperasse qui en découle. Merci également au personnel du service commun : **Jean-Louis**, **Patrick** et **Patricia** pour le suivi de nos cultures ; **Sylvie** et **Gisèle** pour leur aide pour la partie biochimie du projet ; **Hélène** et

Bruno pour leur appui logistique en bioinfo. Je remercie les membres de la plateforme Imagerie - Microscopie de la FR3450, **Alain, Yves** et **Cécile**, pour leur expertise sans faille. Enfin, un grand merci à **Soizic** qui m'a soutenu pour poursuivre au-delà de la Licence Pro.

Si j'ai pu en arriver là aujourd'hui, c'est aussi (et surtout) grâce à plusieurs personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au fil de mes expériences en labo. Merci tout d'abord aux Angevins du LNPV, **Bernard, Bruno, Carène, Christelle, Corinne, David, Françoise, Jean-Michel** et **Sandrine**, pour votre accueil chaleureux et pour m'avoir initié au travail en labo il y a déjà 8 ans ! Mon aventure toulousaine a débuté dans l'équipe d'**Yves Marco**. Je ne te remercierai jamais assez, Yves, pour m'avoir accueilli puis convaincu de poursuivre après la Licence Pro. Merci à **Jian**, pour m'avoir initié au pathosystème *Arabido-Ralsto* dès mon premier jour dans l'équipe ! J'ai beaucoup appris grâce à toi et j'espère avoir l'occasion de te revoir de temps en temps... Un très grand merci à **Xavier**, pour avoir pris le relais de Jian. Je te suis très reconnaissant de tout ce que tu as fait pour moi pendant mon stage et aussi au cours de ma thèse, du temps passé à discuter manips ou toute autre chose pour me changer les idées. Je tiens à remercier chaleureusement les membres de l'équipe **Laurent, Maud** et **Jocelyne**, pour les bons moments passés dans le labo. Je tiens également à remercier **Matthieu Arlat** et ses drôles de dames, **Alice, Claudine, Manue, Martine** et **Servane**. La bonne humeur qui régnait dans le labo était mémorable. Merci Matthieu pour m'avoir fait subir le rituel d'intégration dans l'équipe. Ça met directement en conditions pour passer de bons moments dans ce labo ! Merci Manue pour ton soutien toujours aussi réconfortant. Merci à vous tous pour tout ce que vous m'avez apporté.

Mon travail de thèse a pu être effectué grâce à la participation d'un certain nombre de personnes. En premier lieu, je tiens à remercier les collaborateurs du projet ANR, **Yves Marco** et **Lise Jouanin**. Merci également aux personnes qui y ont contribué en réalisant certaines expériences, en me conseillant précieusement ou en me donnant accès à des produits, des souches bactériennes ou des lignées d'*Arabidopsis* : **Matthieu Arlat, Claudine Balagué, Xavier Barlet, Pawel Bednarek, Olivier Bouchez, Gilles Clément, Taku Demura, Laurent Deslandes, Amandine Freydier, Stéphane Genin, Alice Guidot, Mathieu Larroque, Caroline Levis, Antonio Molina, Lionel Navarro, Laurent Noël, Nicolas Oría, Nemo Peeters, Sandra Pelletier, François Perreau, Jean-Pierre Renou, Marie-Pierre Rivière, Bart Thomma, Koste Yadeta** et **Zheng-Hua Ye**. Je remercie également **Hannele Thuominen** pour la collaboration initiée au cours de ma thèse et **Bo Zhang** pour les quelques jours passés à Toulouse dans le cadre de cette collaboration.

Merci à tous les non perms avec une mention spéciale à **Alex, Céline L., Céline T., Christophe, Coline, Damien, Daniel, Falah, Guitoune, Jérôme, Joanne, Johann, Laure, Marion, Mat, Nico, Philou, Pierre-Marc, Sophie, Thomas** et **Yann**, pour tous les bons moments partagés ensemble en M2R, au labo, en soirées, aux Tolosanes, ou en congrès...

Je n'oublierai pas de remercier chaleureusement tous mes amis connus en dehors du labo. Merci aux **Amboriverains, amis de toujours**, pour tout ce qu'on a vécu ensemble depuis le début : vos messages de soutien, de réconfort m'ont porté pour en arriver là. Merci aux 3 autres Mousquetards, **Portos, Rmiste** et **Tartanion** pour la formidable amitié initiée en BTS : « et si un jour, on devenait Docteur ? »... Merci aux Toulousains, **Alain, Clara, Laurent, Olivia** et **Richard**, qui m'ont accueilli lorsque je suis arrivé ici, je sais que je peux compter sur vous (sauf en cas d'inondations)...

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à ma famille sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci à **mes parents** pour m'avoir permis de poursuivre mes études, de m'avoir soutenu dans les moments difficiles ; à **Céline** et **Arnaud, Manu** et **Cyril** pour vos encouragements et bien plus encore ; à **Sylvie, Jean-Paul, Mylène, Greg, Pierre-Luc** pour toutes vos petites attentions qui font chaud au cœur ; à mes **grand-mères**. Une affectueuse pensée pour mes **grand-pères**.

Enfin, last but not least, merci à toi, **Suzy**, d'être à mes côtés depuis 5 ans, d'abord à distance avant de me rejoindre à Toulouse. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir supporté la vie d'un thésard préférant écouter ses weekends et ses vacances au profit des manip... Tu m'as apporté tout le réconfort dont j'avais besoin pour m'en sortir dans les moments difficiles. Un immense merci pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

INTRODUCTION

Figure 1. Diversité des symptômes provoqués par les microorganismes phytopathogènes	5
Figure 2. L'évolution du système immunitaire des plantes en réponse à l'adaptation du pouvoir infectieux des agents pathogènes, selon le modèle en zigzag.....	6
Figure 3. Un exemple de reconnaissance PAMP/PRR : perception de la flagelline (flg22) par le complexe FLS2-BAK1	7
Figure 4. Représentation schématique du système de sécrétion de type III (T3SS) des bactéries phytopathogènes	9
Figure 5. Le modèle génétique décrivant la reconnaissance R/Avr	10
Figure 6. Classification structurale des protéines de résistance	10
Figure 7. Illustration du modèle de garde : reconnaissance de la protéine RIN4.....	11
Figure 8. Particularité du pathosystème <i>A. thaliana</i> – <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (<i>Xcc</i>)	12
Figure 9. Représentation schématique de la stratégie visant à définir le rôle d'une voie de signalisation dans la réponse d'un mutant aux agents pathogènes.....	15
Figure 10. Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse et du métabolisme de l'acide salicylique.....	16
Figure 11. Représentation simplifiée de la mise en place de la SAR avec le MeSA comme molécule signal à longue distance	17
Figure 12. Représentation simplifiée de la voie de signalisation dépendante du SA pour la mise en place des réponses de défense.....	18
Figure 13. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA)	19
Figure 14. Modèle de fonctionnement du complexe SCF ^{COI1} et la mise en place des réponses de défense dépendantes du JA.....	19
Figure 15. Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse de l'éthylène.....	20
Figure 16. Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'auxine dépendantes du tryptophane.....	22
Figure 17. Modèle de fonctionnement du complexe SCF ^{TIR1} et la mise en place des réponses de défense dépendantes de l'auxine	23
Figure 18. Représentation simplifiée de la structure et de la voie de biosynthèse des glucosinolates	24

Figure 19. Hétérogénéité des polysaccharides composant la paroi végétale.....	26
Figure 20. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la lignine.....	28
Figure 21. Représentation schématique de la dégradation de différents composés pariétaux	29
Figure 22. Phylogénie des protéines de la famille NODULIN 21 chez Arabidopsis.....	33
Figure 23. Caractéristiques du mutant <i>wat1-1</i> au cours du développement.....	34
Figure 24. Diversité des plantes hôtes de <i>R. solanacearum</i>	35
Figure 25. Cycle infectieux de <i>R. solanacearum</i>	37
Figure 26. Représentation schématique de la cascade de signalisation déclenchée chez <i>R. solanacearum</i> , suite à la perception d'un signal émis par la plante	38
Figure 27. Pathosystème <i>A. thaliana</i> - <i>R. solanacearum</i>	39

RESULTATS

Figure 28. Le mutant <i>wat1</i> présente une résistance accrue à <i>Ralstonia solanacearum</i> suite à une inoculation avec blessure du système racinaire.....	43
Figure 29. L'âge des plantes lors de l'infection a un effet sur le développement de la maladie, mais pas sur la résistance accrue observée chez le mutant <i>wat1</i> par rapport au sauvage Col0	44
Figure 30. Le mutant <i>wat1</i> présente une résistance accrue à <i>Ralstonia solanacearum</i> suite à une inoculation sans blessure du système racinaire	45
Figure 31. Expression du gène <i>WAT1</i> en réponse à une infection par <i>R. solanacearum</i> ...	47
Figure 32. Sensibilité du mutant <i>wat1</i> à différents agents pathogènes	49
Figure 33. La résistance accrue de <i>wat1</i> à <i>R. solanacearum</i> et <i>Xcc</i> n'est effective que si les bactéries sont inoculées dans le système vasculaire.....	52
Figure 34. La restriction de l'expression de <i>WAT1</i> dans les vaisseaux du xylème en formation ne permet pas de restaurer la sensibilité du mutant <i>wat1</i> à <i>R. solanacearum</i>	53
Figure 35. La résistance accrue de <i>wat1-1</i> est dépendante du SA mais indépendante des voies ET/JA	54
Figure 36. Expression de gènes marqueurs de défense dépendants des voies hormonales ET-JA-SA	56
Figure 37. Représentation schématique du protocole expérimental employé pour réaliser les analyses transcriptomique et métabolomique primaire	57

Figure 38. Nombre de gènes plus ou moins exprimés chez le mutant <i>wat1-1</i> par rapport au sauvage Col0	58
Figure 39. La mutation du gène <i>WAT1</i> affecte l'expression des gènes de synthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques dans les racines	60
Figure 40. La mutation <i>wat1</i> affecte plus particulièrement le péricycle et le primordium des racines latérales, deux types cellulaires où sont exprimés les gènes de biosynthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques	61
Figure 41. Implication du tryptophane dans la résistance accrue de <i>wat1</i>	66
Figure 42. Implication de l'auxine dans la résistance accrue de <i>wat1</i>	67
Figure 43. Implication des glucosinolates indoliques dans la résistance accrue de <i>wat1</i> ..	68
Figure 44. Implication des glucosinolates indoliques dans la résistance accrue de <i>wat1</i> (suite)	69
Figure 45. La capacité d'Arabidopsis à accumuler ou non du SA semble coïncider avec le niveau de sensibilité des plantes à <i>R. solanacearum</i>	70
Figure 46. Bilan des résultats obtenus lors de la caractérisation de la résistance accrue de <i>wat1</i> à <i>R. solanacearum</i>	80
Figure 47. Immunité vasculaire chez <i>wat1</i> : modèle de travail.....	81
Figure 48. Spécificité des anticorps JIM7 et LM6 utilisés pour détecter les différents épitopes pectiques.....	94
Figure 49. Modification de la composition pariétale d'Arabidopsis suite à l'inoculation avec la souche GMI1000 de <i>R. solanacearum</i>	95
Figure 50. Représentation schématique de la dégradation de la paroi végétale par <i>R. solanacearum</i>	97
Figure 51. Exemples de mutants "paroi" présentant une sensibilité modifiée à <i>R. solanacearum</i>	101
Figure 52. Les mutants <i>atmc9</i> présentent une sensibilité accrue à <i>R. solanacearum</i>	102
Figure 53. Les mutants <i>prn4</i> présentent une sensibilité accrue à <i>R. solanacearum</i>	103

INTRODUCTION

Tableau I. Classification des protéines PR (Pathogenesis-Related) associées aux voies ET-JA-SA chez <i>Arabidopsis</i>	15
Tableau II. La modification de différents constituants de la paroi primaire affecte le phénotype des plantes chez <i>Arabidopsis</i>	27
Tableau III. La modification de différents constituants pariétaux affecte la réponse des plantes vis-à-vis d'agents pathogènes	30
Tableau IV. Caractéristiques générales des génomes des 6 souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> séquencées	36

RESULTATS

Tableau V. Réponse des mutants <i>wat1</i> à différents agents pathogènes	51
Tableau VI. Liste des 17 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles non infectées du mutant <i>wat1</i> par rapport au témoin sauvage Col0, ainsi que chez les mutants <i>irx1-6</i> et <i>irx5-5</i> par rapport à leur témoin sauvage	59
Tableau VII. Métabolites primaires dont la teneur est significativement différente dans les racines du mutant <i>wat1-1</i> par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec <i>R. solanacearum</i>	64
Tableau VIII. Métabolites primaires dont la teneur est comparable dans les racines du mutant <i>wat1-1</i> par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec <i>R. solanacearum</i>	64
Tableau IX. Métabolites primaires dont la teneur est significativement différente dans les feuilles du mutant <i>wat1-1</i> par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec <i>R. solanacearum</i>	64
Tableau X. Métabolites primaires dont la teneur est comparable dans les feuilles du mutant <i>wat1-1</i> par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec <i>R. solanacearum</i>	64
Tableau XI. Approches employées pour la caractérisation de la résistance accrue de <i>wat1</i> à <i>R. solanacearum</i> , basées sur les modifications connues par la mutation	65
Tableau XII. Arsenal enzymatique impliqué dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale chez <i>R. solanacearum</i>	98

Tableau XIII. Liste des 28 mutants “paroi” présentant une réponse modifiée à différents agents pathogènes..... 100

Tableau R-1. Liste des 40 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0..... 82

Tableau R-2. Liste des 148 gènes dont l'expression est modifiée dans les racines non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0..... 83

Tableau R-3. Liste des 148 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0, 4 jours après inoculation avec *R. solanacearum* 86

Tableau R-4. Liste des 210 gènes dont l'expression est modifiée dans les racines du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0, 4 jours après inoculation avec *R. solanacearum* 89

MATERIEL ET METHODES

Tableau XIV. Liste des amorces utilisées pour l'analyse des gènes par qRT-PCR 117

Tableau XV. Liste des amorces utilisées pour détecter les mutations lors de la génération de doubles/triples mutants et l'introduction de transgènes chez *wat1-1* 119

aa	acide aminé
ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AIA	Acide indolacétique
ARN	Acide ribonucléique
Avr	Avirulence
CUT	Carbohydrate utilization containing TBDT
dpi	days post-inoculation
EPS	Exopolysaccharides
ET	Ethylène
ETI	Effector-triggered immunity
ETS	Effector-triggered susceptibility
HG	Homogalacturonan
HR	Hypersensitive response
Hrc	Hrp conserved
Hrp	Hypersensitive response and pathogenicity
IGS	Indole glucosinolates
ISR	Induced systemic resistance
JA	Jasmonic acid
LRR	Leucine rich repeats
NB	Nucleotide binding
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Polygalacturonase
PL	Pectate lyase
PME	Pectin methylesterase
PNL	Pectin lyase
PR	Pathogenesis related
PRR	Pattern recognition receptor
PTI	PAMP-triggered immunity
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR
RG	Rhamnogalacturonan
RLK	Receptor-like kinase

RLP	Receptor-like protein
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase -PCR
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic acquired resistance
T3E	Type III effector
T3SS	Type III secretion system
TBDT	TonB-dependent transporter
TIR	Toll/interleukine receptor
Trp	Tryptophane

PREAMBULE.....	4
• INTRODUCTION.....	5
PARTIE 1 : STRATEGIES DE DEFENSE DES PLANTES ET D'ATTAQUE DES AGENTS PATHOGENES	5
1. CONCEPTS GENERAUX EN INTERACTIONS PLANTES – AGENTS PATHOGENES.....	5
2. EVOLUTION DES PARTENAIRES DE L'INTERACTION : LE MODELE EN ZIG-ZAG	6
2.1 La défense basale (PTI) : PAMP contre PRR	6
2.2 La défense spécifique (ETI) : Effecteurs contre protéines de résistance.....	9
2.3 Mécanismes de défense communs activés lors de la PTI et de l'ETI	12
PARTIE 2 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LES REPONSES DE DEFENSE	15
1. VOIES DE SIGNALISATION HORMONALES CLASSIQUES IMPLIQUEES DANS LES REPONSES DE DEFENSE	15
1.1 L'acide salicylique (SA).....	16
1.2 L'acide jasmonique (JA).....	18
1.3 L'éthylène (ET).....	19
2. VOIES AROMATIQUES IMPLIQUEES DANS LES REPONSES DE DEFENSE	22
2.1 L'auxine (AIA).....	22
2.2 Les Glucosinolates indoliques (IGS).....	24
PARTIE 3 : ROLE DE LA PAROI VEGETALE DANS LES INTERACTIONS PLANTES – AGENTS PATHOGENES.....	26
1. LA PAROI VEGETALE : INTERFACE ENTRE PLANTES ET AGENTS PATHOGENES	26
2. DEGRADATION DES PAROIS VEGETALES PAR LES AGENTS PATHOGENES	28
3. APPROCHE GENETIQUE : MUTANTS DE PAROI ET REPONSE AUX AGENTS PATHOGENES	29
PARTIE 4 : CONTEXTE BIOLOGIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	33
1. OBJET D'ÉTUDE : LE MUTANT <i>wat1</i> (<i>WALLS ARE THIN 1</i>)	33
2. <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> – ARABIDOPSIS, NOTRE SYSTEME D'ÉTUDE.....	35
2.1 Description de la bactérie	35
2.2 Cycle de vie de la bactérie.....	36
2.3 Pouvoir pathogène de la bactérie	37
2.4 Pathosystème <i>A. thaliana</i> - <i>R. solanacearum</i>	38
3. OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	40
• RESULTATS.....	42
CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE LA RESISTANCE ACCRUE DU MUTANT <i>wat1</i> D'ARABIDOPSIS A LA BACTERIE <i>R. SOLANACEARUM</i>.....	42
1. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA RESISTANCE ACCRUE DU MUTANT <i>wat1</i> A <i>R. SOLANACEARUM</i>	43
1.1 Analyse du niveau de résistance de <i>wat1</i> : méthode d'inoculation "classique" après blessure du système racinaire	43
1.2 Variation de la résistance du mutant <i>wat1</i> en fonction du stade de développement	44
1.3 Analyse du niveau de résistance de <i>wat1</i> à une inoculation sans blessure du système racinaire	45

1.4 Effet de la surexpression de <i>WATI</i> sur la réponse à <i>R. solanacearum</i>	46
2. CINETIQUE SPATIO-TEMPORELLE D'EXPRESSION DU GENE <i>WATI</i> EN REPONSE A <i>R. SOLANACEARUM</i>	47
2.1 Analyse du profil d'expression de <i>WATI</i> par RT-PCR quantitative.....	47
2.2 Analyse du profil d'expression du gène rapporteur <i>GUS</i> placé sous le contrôle du promoteur de <i>WATI</i>	48
3. ETUDE DE LA SPECIFICITE DE LA RESISTANCE ACCRUE DE <i>WATI</i> : VERS UNE IMMUNITE VASCULAIRE	49
3.1 Réponse immunitaire de <i>wat1</i> à différents agents pathogènes.....	49
3.2 Variation de la réponse de <i>wat1</i> à <i>R. solanacearum</i> et <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> selon la technique d'inoculation employée.....	51
3.3 Mesure de la sensibilité d'Arabidopsis lorsque l'expression de <i>WATI</i> est restreinte aux vaisseaux du xylème.....	52
4. ETUDE DES VOIES HORMONALES ET-JA-SA DANS LA RESISTANCE ACCRUE DE <i>WATI</i> A <i>R.</i> <i>SOLANACEARUM</i>	54
4.1 Réponse phénotypique des doubles mutants.....	54
4.2 Profil d'expression de gènes marqueurs de défense.....	56
5. A LA RECHERCHE DES MECANISMES DE RESISTANCE DE <i>WATI</i> : APPROCHES SANS A PRIORI.....	56
5.1 Analyse du transcriptome de <i>wat1</i> versus Col0 : remarques générales.....	57
5.2 Analyse du transcriptome de plantes non inoculées par <i>R. solanacearum</i> : recherche des mécanismes constitutifs impliqués dans la résistance de <i>wat1</i>	58
5.3 Analyse du transcriptome à 4dpi de plantes inoculées par <i>R. solanacearum</i> : impact de la bactérie et de la maladie sur l'expression génique.....	62
5.4 Etude globale du métabolome du mutant <i>wat1</i>	64
6. A LA RECHERCHE DES MECANISMES DE RESISTANCE DE <i>WATI</i> : APPROCHES CIBLEES.....	65
6.1 Le tryptophane.....	66
6.2 L'auxine.....	67
6.3 Les glucosinolates indoliques.....	68
6.4 L'acide salicylique.....	70
7. DISCUSSION DES RESULTATS ET PERSPECTIVES DE TRAVAIL.....	71
7.1 Le mutant <i>wat1</i> présente une résistance accrue à <i>R. solanacearum</i> , dépendante du stade de développement des plantes.....	71
7.2 La régulation transcriptionnelle de <i>WATI</i> n'est pas un élément clé de l'établissement de l'interaction compatible entre Arabidopsis et <i>R. solanacearum</i>	72
7.3 Le mutant <i>wat1</i> présenterait une immunité vasculaire.....	73
7.4 La résistance accrue de <i>wat1</i> est dépendante du métabolisme indolique, de l'acide salicylique	75
7.5 Connexions entre le métabolisme indolique et l'acide salicylique : vers un modèle pour expliquer la résistance accrue de <i>wat1</i>	78
CHAPITRE 2 : ROLE DE LA PAROI VEGETALE DANS LE PATHOSYSTEME ARABIDOPSIS - R. SOLANACEARUM.....	93
1. ETUDE DU PROCESSUS INFECTIEUX DE <i>R. SOLANACEARUM</i> CHEZ ARABIDOPSIS DANS UN SYSTEME <i>IN</i> <i>VITRO</i>	94
1.1 Approche microscopique.....	94
1.2 Approche bioinformatique.....	96

2. IDENTIFICATION DE MUTANTS ‘‘PAROI ET MORT CELLULAIRE’’ AFFECTES DANS LEUR REPONSE A <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	99
2.1 Crible de mutants ‘‘parois’’	99
2.2 Crible de mutants affectés dans la mort cellulaire des vaisseaux du xylème	101
3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104
• CONCLUSION GENERALE	105
• MATERIEL ET METHODES.....	109
1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	109
1.1 Matériel végétal.....	109
1.2 Souches bactériennes et fongiques	109
2. ANALYSES BIOLOGIQUES.....	110
2.1 Inoculations et détermination de la croissance des agents pathogènes <i>in planta</i>	110
2.2 Mesure de la croissance bactérienne <i>in vitro</i>	113
2.3 Détermination de la teneur en acide salicylique <i>in planta</i> par HPLC-Fluorescence	114
2.4 Analyses métabolomiques.....	115
2.5 Récolte de sève.....	117
3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	117
3.1 Extractions d’ADN, d’ARN et transcription inverse	117
3.2 Analyse de transcrit par RT-PCR.....	117
3.3 Analyse de transcrit par qRT-PCR.....	118
3.4 Analyse transcriptomique.....	118
3.5 Clonage	119
4. GENERATION DE DOUBLES/TRIPLES MUTANTS.....	120
5. MICROSCOPIE	122
5.1 Coloration GUS et observations.....	122
5.2 Immunocytologie et observations confocales	122
REMERCIEMENTS.....	123
ANNEXES.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ABSTRACT.....	190
RESUME	191

PREAMBULE

“Le plus mince avantage acquis par un individu sur ceux avec lesquels il entre en concurrence, ou une meilleure adaptation aux conditions physiques environnantes, quelque léger que soit ce perfectionnement, fera pencher la balance”.

Charles Darwin,
L'Origine des espèces, 1859.

Par nature, les plantes sont des êtres vivants immobiles et, par conséquent, incapables de se déplacer pour fuir lors d'une attaque par des agents pathogènes ou pour trouver refuge ailleurs lorsque les conditions environnementales deviennent hostiles (froid, sécheresse...). Fort heureusement pour eux, les végétaux ont su s'adapter et mettre en place plusieurs niveaux de défense pour répondre aux nombreux stress dont ils sont l'objet. Le processus d'évolution des espèces a révélé la sélection naturelle, permettant la conservation des individus les mieux adaptés à leur environnement.

Au cours de l'introduction de ce manuscrit, une première partie sera l'occasion de dresser un état des lieux des différentes stratégies de défense des plantes et d'attaque des agents pathogènes acquises au cours de l'évolution. Dans une seconde partie, une attention particulière sera prêtée aux voies de signalisation hormonales et au métabolisme aromatique afin de mieux comprendre leur implication dans la réponse à un stress biotique. Puis, dans une troisième partie, le rôle de la paroi végétale sera évalué afin de mieux comprendre en quoi sa composition et sa structure en font un élément clé des interactions entre une plante et son agresseur. Enfin, cette introduction se terminera par une description de mon projet de thèse dans un contexte générale, puis en présentant les objectifs à travers plusieurs questions auxquelles j'ai tenté de répondre pendant ma thèse.

INTRODUCTION



Figure 1. Diversité des symptômes provoqués par les microorganismes phytopathogènes.

A. Virus de la mosaïque dorée du haricot (BGMV, Bean Golden Mosaic Virus).

B. Nécrose bactérienne sur haricot.

C. Pourriture à *Sclerotinia* sur carotte.

D. Nanisme d'une plante d'orge infectée par le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BaYDV).

E. Galle du collet de la vigne causée par *Agrobacterium tumefaciens*.

F. Thylles dans des vaisseaux de xylème d'une plante de tomate infectée par *Verticillium albo-atrum*

(Sources: toutes les photographies (sauf E) sont consultables sur le site <http://www.fsagx.ac.be> ; la photographie E est extraite d'Abramovitch et al 2006).

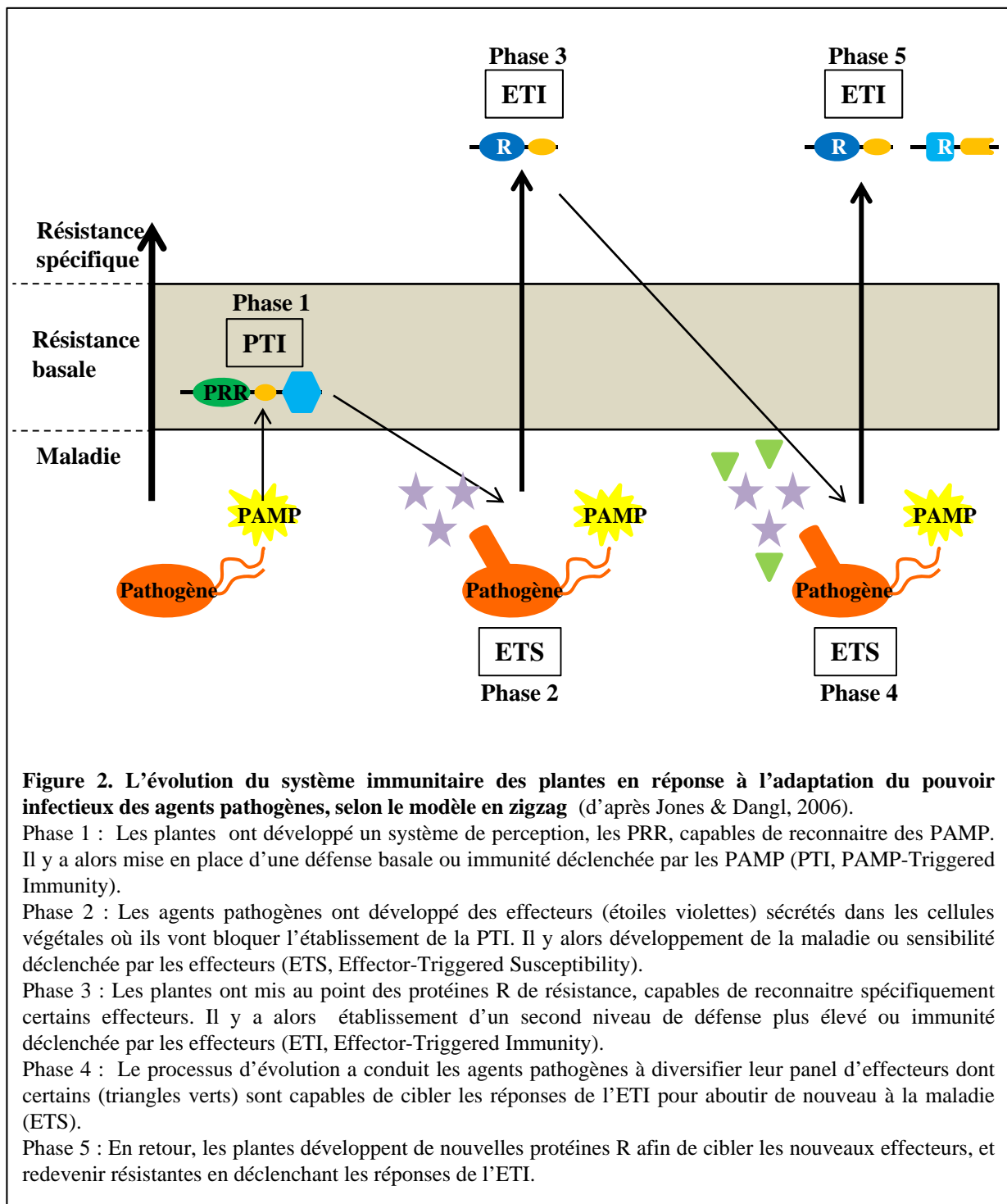
INTRODUCTION - PARTIE 1 :

STRATEGIES DE DEFENSE DES PLANTES ET D'ATTAQUE DES AGENTS PATHOGENES

1. Concepts généraux en interactions plantes – agents pathogènes

Les plantes sont en contact permanent avec de nombreux parasites, qu'il s'agisse de champignons, d'oomycètes, de bactéries, de virus ou encore de nématodes. Les espèces végétales susceptibles d'être agressées par un agent pathogène donné sont dites hôtes, les autres étant qualifiées de non hôtes. Dans le cas d'une interaction de type non hôte, il y a incompatibilité fondamentale, encore appelée défense basale qualitative, entre tous les cultivars d'une espèce végétale et tous les biotypes d'un parasite donné (Mysore and Ryu, 2004; Nurnberger and Lipka, 2005). Dans le cas d'une interaction de type hôte, deux issues sont possibles. La première correspond à l'établissement de la maladie : il y a une interaction compatible entre l'agent pathogène virulent et la plante sensible. Cela se caractérise par le développement de symptômes qui révèlent des anomalies visibles sur le matériel végétal infecté (Fig. 1). En fonction du pathosystème, il existe différents types de symptômes, notamment des changements de couleur (chlorose, mosaïque), des altérations d'organes (flétrissement, nécrose, pourriture), des modifications anatomiques (chancre, nanisme), des productions anormales de substances (exsudation)... Des symptômes microscopiques peuvent également se développer, tels que des thylles qui sont des expansions vésiculeuses se formant dans les vaisseaux à partir des cellules parenchymateuses adjacentes. Enfin, dans certains cas, il peut y avoir la formation d'excroissances pathologiques (tumeur, galle) (Fig. 1). La seconde issue d'une interaction de type hôte est la mise en place d'une résistance correspondant à une interaction incompatible : le pathogène est dit avirulent et la plante résistante. Dans ce cas, les réponses de défense de la plante sont dites gène-spécifiques (Flor, 1971).

L'issue d'une interaction (résistance ou maladie) dépend de plusieurs facteurs, incluant la nature de l'espèce végétale et de l'agent pathogène, et leur capacité à développer une stratégie de défense ou d'attaque suffisamment efficace pour gagner la bataille, soit en développant une résistance pour la plante, soit en induisant la maladie pour l'agent pathogène.



L'étude des stratégies mises en œuvre par chacun des deux partenaires d'une interaction occupe le devant de la scène dans le domaine de la phytopathologie depuis plusieurs années.

2. Evolution des partenaires de l'interaction : le modèle en zig-zag

Dans la nature, plantes et agents pathogènes ont tous deux développé des mécanismes pour prendre le dessus l'un sur l'autre et orienter l'issue de l'interaction en leur faveur. Le modèle en zigzag a été proposé pour expliquer les stratégies utilisées par les deux partenaires dans leur course à l'armement au cours du processus d'évolution des espèces (Fig. 2) (Jones and Dangl, 2006). Les microbes possèdent des signatures moléculaires très conservées, appelées PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Les plantes possèdent des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) qui détectent la présence des PAMP (Fig. 2, phase 1). Cette reconnaissance gouverne les réponses de défenses basales ou PTI (PAMPs-Triggered Immunity) (Fig. 2, phase 1) (Jones and Dangl, 2006). On parle alors de résistance basale quantitative pour décrire ce premier niveau de défense qui se met en place pour limiter l'invasion de l'agent pathogène (Dangl and Jones, 2001). Pour contourner cette première ligne de défense, les agents pathogènes ont développé un panel d'effecteurs (facteurs d'avorulence Avr), conduisant au développement de la maladie ou ETS (Effector-Triggered Susceptibility) (Fig. 2, phases 2 et 4). Afin de reprendre l'avantage sur leurs agresseurs, les plantes ont perfectionné une seconde ligne de défense ou ETI (Effector-Triggered Immunity) qui conduit à une résistance spécifique de type gène-pour-gène (Fig. 2, phases 3 et 5) (Jones and Dangl, 2006). Cette seconde ligne de défense spécifique est activée lors d'une interaction incompatible entre une plante hôte et un agent pathogène.

2.1 La défense basale (PTI) : PAMP contre PRR

Depuis plusieurs années, la reconnaissance des PAMP a émergé comme étant un processus fondamental pour la réponse immunitaire que ce soit chez les plantes ou les animaux (Boller and Felix, 2009). Ces motifs définissent des signatures moléculaires qui identifient une classe de microbes et qui sont absentes chez l'hôte infecté, ce qui correspond, lorsque ces motifs sont perçus, à une reconnaissance du non-soi.

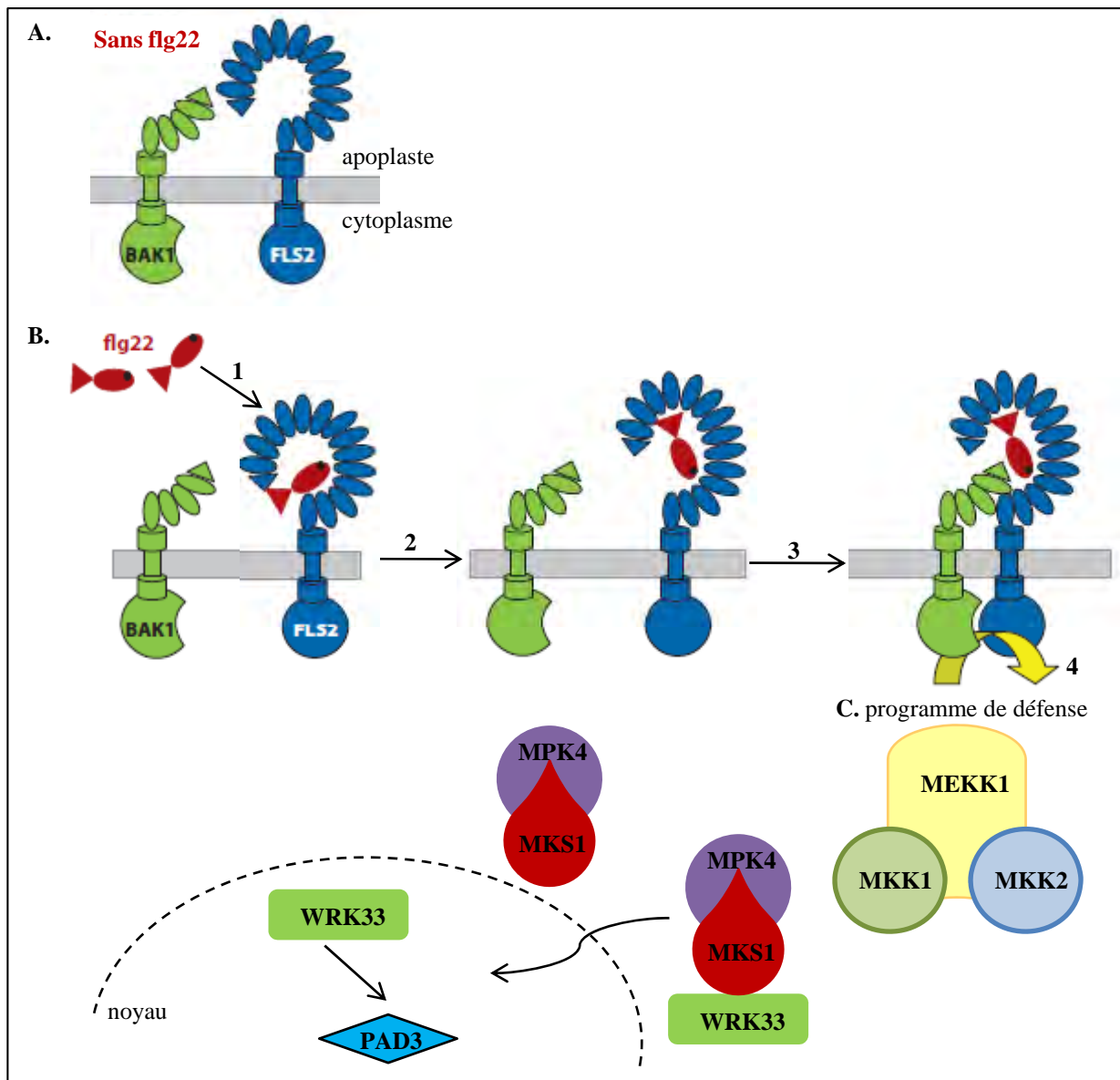


Figure 3. Un exemple de reconnaissance PAMP/PRR : perception de la flagelline (flg22) par le complexe FLS2-BAK1 (d'après Boller et Felix, 2009).

- A. En absence de flg22, les deux protéines FLS2 et BAK1 sont localisées au niveau de la membrane plasmique, à proximité l'une de l'autre, sans toutefois interagir.
- B. Lors de la perception de flg22 par le PRR FLS2 (étape 1), le récepteur va changer de conformation (étape 2), ce qui va permettre une interaction entre les domaines extracellulaires de FLS2 et BAK1 (étape 3). Cette interaction va permettre le rapprochement entre les domaines kinases intracellulaires de FLS2 et BAK1, ce qui va initier une cascade de signalisation afin d'établir une réponse de défense (étape 4).
- C. Le programme de défense nécessite une cascade de signalisation à trois composantes de type MAP kinases (MEKK1-MKK1-MKK2) qui va aboutir à la dissociation de WRKY33 de son complexe initial formé avec MPK4 et MKS1. WRKY33 ainsi libre va ensuite se fixer sur le promoteur d'un gène cible tel que PAD3 pour induire son expression et permettre la synthèse de camalexine.

La flagelline, impliquée dans la formation du flagelle bactérien, est le PAMP le plus étudié ces dernières années. En particulier, le peptide flg22 est une séquence très conservée dans la partie N-terminale de la protéine chez les bactéries (Felix et al., 1999). Chez *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), flg22 induit la formation de callose pour renforcer la paroi végétale, une accumulation de la protéine de défense PR-1 (Pathogenesis-Related 1) et une sévère inhibition de la croissance des plantules (Gómez-Gómez et al., 1999). La flagelline est également capable d'induire une alcalinisation de cultures cellulaires de tabac, de tomate ou de riz (Felix et al., 1999). Cependant, des différences entre l'activité de la flagelline existent : alors que chez la tomate, un peptide plus court de 15 acides aminés (flg15) est actif, seule la flagelline entière est active chez le riz (Takai et al., 2007). De manière intéressante, le motif flg22 de *Ralstonia solanacearum* n'est pas responsable du déclenchement des réponses de défense de la plante et, de ce fait, il ne peut pas être considéré comme un PAMP dans ce pathosystème (Pfund et al., 2004).

Les plantes ont élaboré un système de reconnaissance de flg22. Par des approches génétique et biochimique chez *Arabidopsis*, FLS2 (Flagellin-Sensing 2), une protéine de la famille des récepteurs kinases (RLK) a été identifiée comme le PRR responsable de la perception de flg22 de *Pseudomonas* (Gómez-Gómez et al., 1999; Chinchilla et al., 2006). Par la suite, il a été montré que la perception de flg22 se fait via l'interaction entre FLS2 et BAK1 (Brassinosteroid insensitive 1-Associated Kinase) (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Selon le modèle actuellement admis, les protéines FLS2 et BAK1 sont, en absence de traitement avec flg22, toutes les deux localisées au niveau de la membrane plasmique sans toutefois interagir (Fig. 3). Dès la perception de flg22 et son attachement à FLS2, un changement de conformation du domaine LRR de FLS2 va intervenir, ce qui va permettre une hétérodimérisation entre BAK1 et FLS2. La formation, au niveau extracellulaire, de ce complexe va aboutir à une interaction entre les deux domaines kinases intracellulaires de BAK1 et FLS2, permettant ainsi l'initiation d'une cascade de signalisation intracellulaire de type Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), faisant intervenir les protéines MEKK1, MKK1/2 et MPK4 (Fig. 3) (Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). En aval de cette cascade, MPK4 contrôlerait l'expression de gènes et des réponses de défense telle que la synthèse de camalexine, une phytoalexine aux propriétés antimicrobiennes. En effet, un complexe formé de MPK4, MKS1 (MAP Kinase Substrate 1) et de WRKY33 régulerait l'expression de *PAD3* (*Phytoalexin deficient 3*), gène codant l'enzyme responsable de la biosynthèse de la camalexine. En fait, lors de la perception de flg22, WRKY33 se détacherait

du complexe pour aller se fixer sur le promoteur de *PAD3*, activant ainsi sa transcription (Fig. 3) (Andreasson et al., 2005; Qiu et al., 2008).

Un autre exemple de PAMP bactérien est le facteur d'élongation EF-Tu chez *Agrobacterium tumefaciens* dont l'activité élicitrice chez *Arabidopsis* dépend d'un épitope de 18 acides aminés appelé elf18 (Kunze, 2004). Le crible d'une banque de mutants ADN-T d'*Arabidopsis* pour rechercher des mutants insensibles à un traitement avec le PAMP elf18 a été mené (Zipfel et al., 2006). C'est ainsi que le mutant *efr* (*EF-Tu receptor*) a été identifié. De façon intéressante, *efr* n'est pas altéré dans sa perception de flg22. Le gène *EFR* code, comme *FLS2*, une protéine de type RLK-LRR. Quand le gène *EFR* d'*Arabidopsis* est exprimé de façon transitoire dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, une espèce dépourvue de système de perception de EF-Tu, les feuilles infiltrées avec ERF sont capables de répondre à un traitement avec le PAMP elf18 par une production d'éthylène et un burst oxydatif, démontrant que EFR est bien le PRR pour EF-Tu (Zipfel et al., 2006).

Pour comprendre si les PAMP stimulent les mêmes réponses de défense lors de la PTI, des travaux ont été menés afin de comparer la reprogrammation génique intervenant suite à différents traitements avec des inducteurs de PTI (flg22 et elf26) (Zipfel et al., 2004; Zipfel et al., 2006). Une première étude de l'ensemble du génome d'*Arabidopsis* a révélé qu'un traitement de plantules avec le PAMP flg22 induisait une importante modification de l'expression génique puisque plus de 1000 gènes se trouvent dérégulés (induits ou réprimés) 30 minutes après le traitement (Zipfel et al., 2004). Une seconde analyse, menée cette fois-ci 60 minutes après un traitement de plantules avec le PAMP elf26, un dérivé de elf18, a mis en évidence une corrélation élevée de gènes dont l'expression est perturbée (induction ou répression) entre les plantules traitées avec flg22 et celles traitées avec elf26. Le résultat le plus marquant est l'induction de plus de 100 gènes codant des protéines de type RLK sur les 610 du génome d'*Arabidopsis* (Zipfel et al., 2006).

Un troisième exemple de PAMP bactérien est le peptide Ax21 (Activator of Xa21-mediated immunity) produit par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), un agent pathogène du riz. Plus précisément, un dérivé sulfaté d'Ax21, appelé axY^S22, est reconnu par le PRR Xa21, un récepteur kinase transmembranaire du riz (Lee et al., 2009). Enfin, chez les champignons, des fragments de chitine, le constituant majeur de leur paroi, sont considérés comme des PAMP puisque leur perception permet à la plante d'induire ses réactions de défense (Felix et al., 1993). Chez le riz, la perception de la chitine est faite par le PRR CEBiP, une protéine de type RLP (Receptor-Like Protein) à domaine extracellulaire présentant des

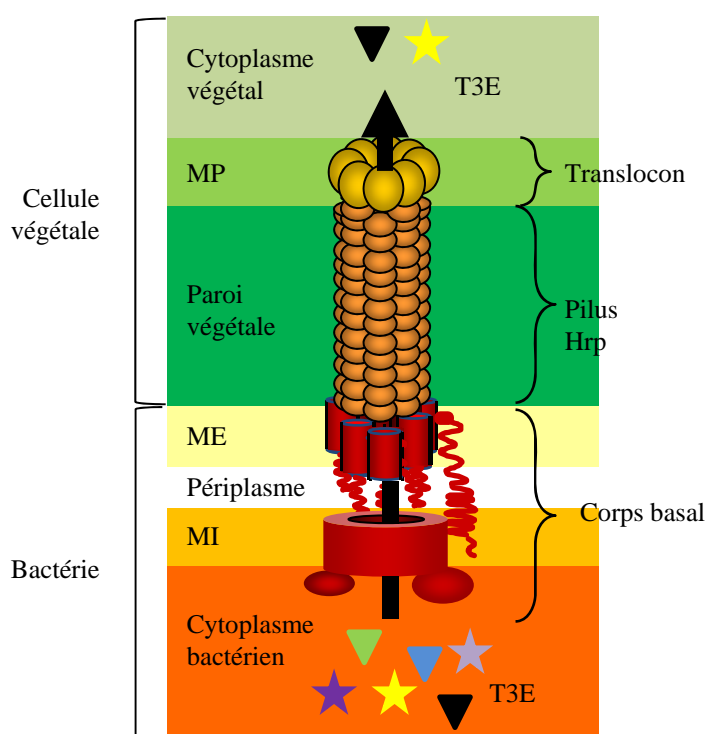


Figure 4. Représentation schématique du système de sécrétion de type III (T3SS) des bactéries phytopathogènes (d'après Blanvillain, 2007).

Le T3SS ressemble à une seringue composée d'un corps basal enchassé dans la double membrane de la cellule bactérienne. Il est prolongé par le pilus Hrp qui traverse la paroi végétale et se termine par un translocon ancré dans la membrane plasmique de la cellule végétale. Le T3SS permet l'injection d'effecteurs (T3E) dans la cellule végétale. MI, membrane interne ; ME, membrane externe ; MP, membrane plasmique ; T3E, effecteur de type III.

motifs LysM (Kaku et al., 2006) et chez *Arabidopsis*, la chitine est perçue par CERK1, une protéine de la famille RLK (Miya et al., 2007).

2.2 La défense spécifique (ETI) : Effecteurs contre protéines de résistance

Pour contourner les défenses basales des plantes, les microbes ont élaboré un second plan d'attaque, encore plus sophistiqué : la production d'effecteurs impliqués dans le pouvoir pathogène et conduisant à l'ETS (Fig. 2, phases 2 et 4). Cette stratégie nécessite la mise en place du système de sécrétion de type III (T3SS), une arme ressemblant à une seringue, capable d'injecter des munitions, les effecteurs de type III (T3E), à l'intérieur de la cellule végétale. Le T3SS est un complexe multiprotéique formé d'un corps basal intégré dans la double membrane de la cellule bactérienne avec, en prolongement, une sorte d'aiguille, appelée pilus hrp (hypersensitive response and pathogenicity), qui traverse la paroi végétale et enfin, à son extrémité, un translocon ancré dans la membrane plasmique végétale (Fig. 4). Le corps basal est constitué de protéines codées par des gènes très conservés chez les bactéries des animaux et, de ce fait, appelés gènes *hrc* (conserved *hrp* genes) (Bogdanove et al., 1996). Le pilus hrp est un canal constitué de l'assemblage de plusieurs unités d'une protéine, la piline. Différents travaux ont permis l'identification des gènes codant cette protéine : *hrpY* chez *R. solanacearum* (Van Gijsegem et al., 2000), *hrpA* chez *P. syringae* (Roine et al., 1997) ou encore *hrpE* chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Weber and Koebnik, 2005). Le translocon permet l'ancrage du T3SS à la cellule végétale et ainsi l'injection des T3E de la bactérie vers la plante. Certaines protéines impliquées dans la formation du translocon ont été identifiées : PopF1 et PopF2 chez *R. solanacearum* (Meyer et al., 2006) et HrpF chez différents *Xanthomonas* (Buttner et al., 2002; Sugio et al., 2005). Le T3SS constitue un élément majeur de la virulence des bactéries pathogènes puisque sans leur T3SS, ces bactéries sont incapables de se multiplier *in planta*, d'induire la maladie lors d'une interaction compatible ou une réaction hypersensible (HR) lors d'une interaction incompatible (Alfano and Collmer, 2004). Deux types de protéines transitent via le T3SS : des protéines dites "helper" et celles dites "effectrices" (T3E). Les protéines helper, telles que les harpines, sont sécrétées par le T3SS mais non transloquées jusque dans la cellule végétale. Elles assureraient une coopération avec le T3SS afin de faciliter la translocation des effecteurs de la bactérie à la plante (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). De nombreux T3E ont été identifiés chez différentes bactéries et leur nom dépend de l'agent pathogène dont ils sont

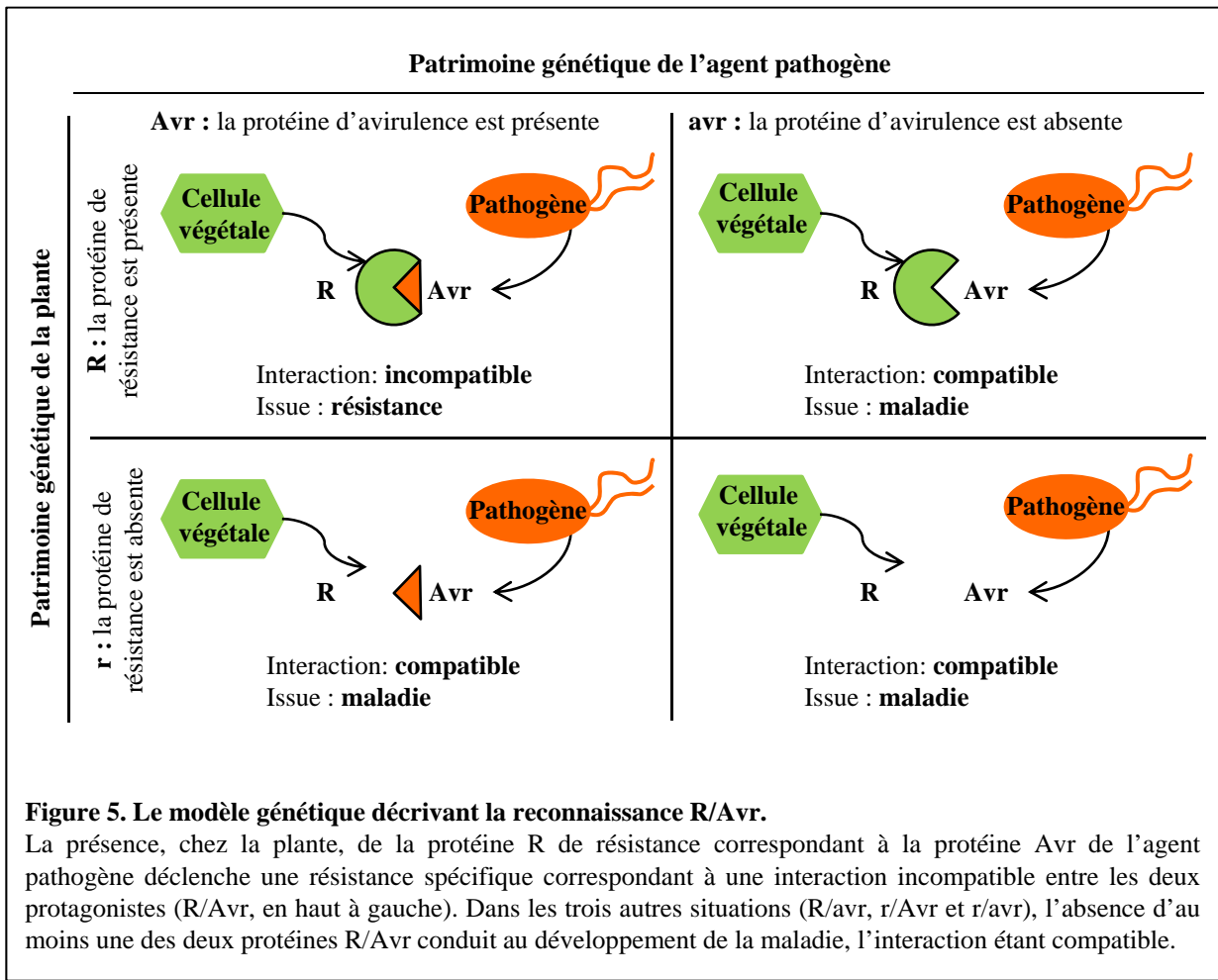
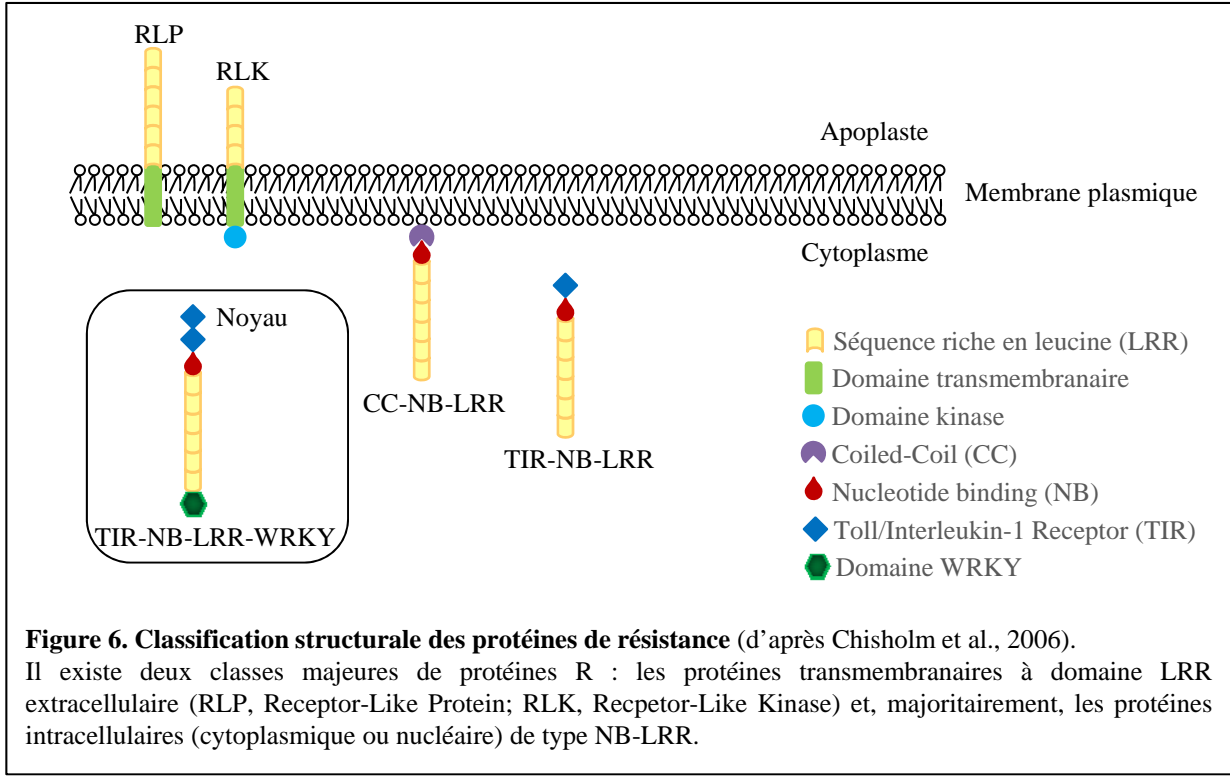


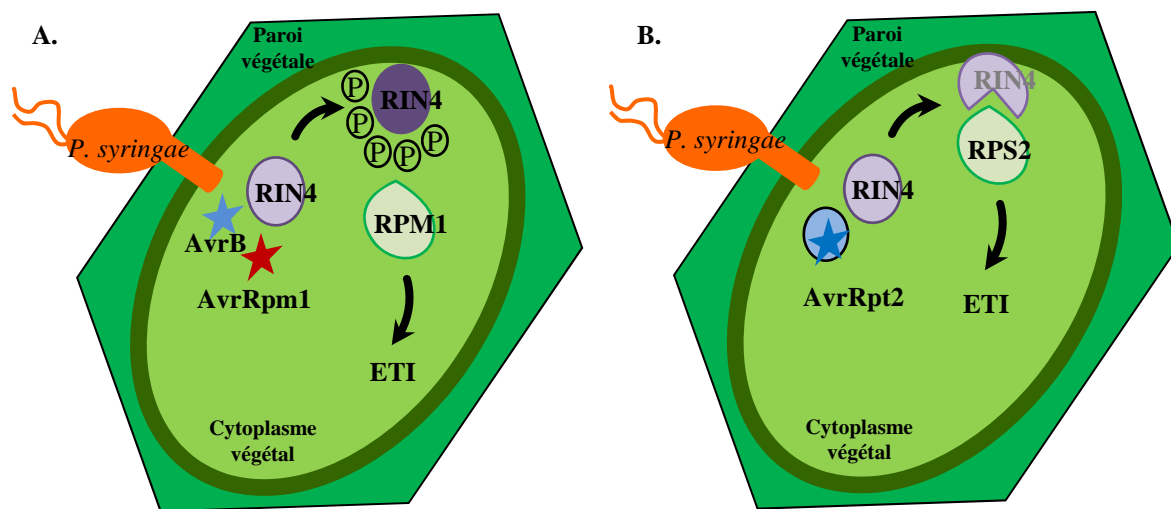
Figure 5. Le modèle génétique décrivant la reconnaissance R/Avr.

La présence, chez la plante, de la protéine R de résistance correspondant à la protéine Avr de l'agent pathogène déclenche une résistance spécifique correspondant à une interaction incompatible entre les deux protagonistes (R/Avr, en haut à gauche). Dans les trois autres situations (R/avr, r/Avr et r/avr), l'absence d'au moins une des deux protéines R/Avr conduit au développement de la maladie, l'interaction étant compatible.



issus : Hop (Hrp outer protein) chez *Pseudomonas* (Alfano and Collmer, 1997), Xop (*Xanthomonas* outer protein) chez *Xanthomonas* (Noël et al., 2001) ou Pop (*Pseudomonas* outer protein) chez *Ralstonia solanacearum* (qui faisait partie du genre *Pseudomonas* à l'époque de cette identification) (Arlat et al., 1994). D'autres effecteurs portent le nom de protéine Avr car leur reconnaissance chez une plante hôte confère l'avirulence à la bactérie. Parmi les T3E bien décrits, on peut citer AvrPto1 et HopAB2 (anciennement appelés AvrPto et AvrPtoB, respectivement) de *P. syringae* qui sont capables de bloquer la cascade de signalisation MAPKinase normalement induite en réponse à flg22 (He, 2006) ou encore HopM1 de *P. syringae* qui est capable quant à lui d'inhiber la déposition de callose, nécessaire au renforcement de la paroi végétale, en induisant la dégradation de la protéine AtMIN7 d'*Arabidopsis* (DebRoy et al., 2004; Nomura et al., 2006).

L'existence de ces effecteurs T3E a conféré aux agents pathogènes le pouvoir d'inverser la tendance (PTI) en induisant de nouveau la maladie (ETS). En réponse à cette nouvelle stratégie d'attaque, les plantes ont acquis au cours de l'évolution, en plus de la reconnaissance des PAMP par les PRR, une seconde ligne de défense, encore plus sophistiquée. Il s'agit d'une reconnaissance spécifique de certains T3E, une stratégie permettant le développement d'une résistance de type gène-pour-gène ou ETI (Fig. 2, phase 3). La mise en place de l'ETI dépend du patrimoine génétique des deux partenaires de l'interaction : la plante doit posséder la protéine R de résistance correspondante à la protéine Avr d'avirulence de l'agent pathogène (Fig. 5) (Flor, 1971). Les protéines R sont généralement classées sur la base de leur structure (Fig. 6). Une des catégories regroupe les protéines R transmembranaires ayant un domaine LRR extracellulaire : il s'agit soit de protéines RLP (Receptor-Like Protein), soit de protéines RLK (Receptor-Like Kinase) qui présentent, en plus, un domaine kinase cytoplasmique (similitude avec les récepteurs PRR des PAMP). La seconde catégorie regroupe les protéines R cytoplasmiques composées d'un domaine de fixation aux nucléotides (NB) et un domaine LRR. Les protéines de type NB-LRR sont très répandues puisque le génome d'*Arabidopsis* en possède environ 150. Parmi ces protéines, on distingue les protéines de type CC-NB-LRR ayant un domaine Coiled-Coil (CC) dont la fonction est encore mal connue, ainsi que les protéines de type TIR-NB-LRR qui possèdent un domaine Toll/Interleukine Receptor (TIR) impliqué dans la signalisation de la résistance. La protéine RRS1-R (Resistance to *Ralstonia solanacearum* 1-R) d'*Arabidopsis* est une protéine TIR-NB-LRR atypique puisqu'elle possède en plus un domaine NLS (Nuclear Localization Signal) qui implique une localisation



de cette protéine dans le noyau, ainsi qu'un domaine WRKY caractéristique de facteur de transcription (Deslandes et al., 2002).

La reconnaissance entre les protéines R et Avr s'établit soit selon le modèle ligand/récepteur, soit selon le modèle de garde. Le modèle ligand-récepteur s'applique lorsqu'il y a reconnaissance et interaction directe entre les deux acteurs R/Avr. A ce jour, quatre couples R/Avr répondent à ce critère, l'interaction entre les deux protéines étant démontrée par double hybride chez la levure. Historiquement, le couple Pi-Ta/AvrPita (riz/*Magnaporthe grisea*) a été le premier à être décrit (Jia et al., 2000). RRS1-R/PopP2 (*Arabidopsis/R. solanacearum*) est le second couple identifié et il fait l'objet d'une description plus détaillée dans la partie 4 de cette introduction (Deslandes et al., 2003). Le troisième couple R/Avr est constitué respectivement des protéines N et P50 dans le pathosystème formé par le tabac et le virus de la mosaïque du tabac (Ueda et al., 2006). Enfin, le couple R/Avr est quant à lui formé par les protéines L et AvrL567 dans le cas de l'interaction entre le lin et *Melampsora lini* (Dodds et al., 2006).

Dans le cas du modèle de garde, la reconnaissance R/Avr se fait de façon indirecte (Van der Biezen and Jones, 1998; de Wit, 2007). Un des exemples répondant au modèle de garde concerne RIN4 (RPM1 Interacting Protein 4) chez *Arabidopsis*. Une modification de la protéine en présence de certains effecteurs de *P. syringae* va être à l'origine du déclenchement de l'ETI. Par exemple, en présence des T3E AvrB1 (anciennement AvrB) et AvrRpm1, RIN4 se trouve phosphorylée, ce qui va permettre l'activation de RPM1 (protéine R) (Fig. 7-A) (Mackey et al., 2002; Desveaux et al., 2007). D'autres travaux ont montré que RIN4 est clivée en présence de l'effecteur AvrRpt2. Cette modification induit une reconnaissance par RPS2 (protéine R) (Fig. 7-B) (Mackey et al., 2003; Kim, 2005a). A travers ces deux exemples, la protéine RIN4, cible végétale de plusieurs T3E, apparaît comme un régulateur positif de l'ETI. Cependant, RIN4 a également été décrit comme un régulateur négatif de la PTI puisqu'un mutant *rin4* répond à un traitement avec flg22 avec un renforcement en callose plus important, alors que la surexpression du gène *RIN4* supprime plusieurs marqueurs de la défense basale (Kim, 2005b).

Un autre exemple de T3E concerne XopAC de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*). Cet effecteur présente l'originalité de procurer ou non l'avirulence à la souche Xcc8004 sur *Arabidopsis* selon le mode d'infection et le génotype de la plante (Xu et al., 2008). En effet, lorsque la souche sauvage Xcc8004 est inoculée par piercing de la nervure centrale de l'accession sauvage Col0, les plantes sont résistantes (Fig. 8). En revanche, la

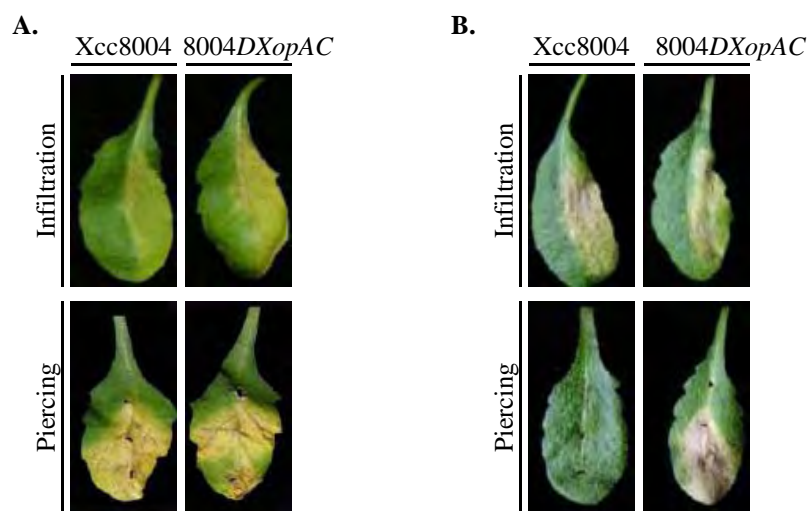


Figure 8. Particularité du pathosystème *A. thaliana* – *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) (extrait de Xu et al., 2007).

Sensibilité de deux écotypes sauvages Kashmir (A) et Columbia (Col0) (B) à deux souches de la bactérie *Xcc* (souche sauvage Xcc8004 ou la souche 8004DXopAC délétée de l'effecteur XopAC), selon deux techniques d'inoculation (infiltration ou piercing).

- A. L'écotype Kashmir est sensible à *Xcc* quelle que soit la technique d'infection employée et quelle que soit la souche utilisée.
- B. L'écotype Col0 est sensible aux deux souches de *Xcc* lorsque les bactéries sont infiltrées dans les feuilles. En revanche, après infection par piercing de la nervure centrale, seule la souche 8004DXopAC est capable d'induire la maladie chez Col0 qui présente une immunité vasculaire pour la souche sauvage 8004.

même souche sauvage Xcc8004, inoculée chez le même écotype mais cette fois par infiltration dans le mésophylle, induit le développement de la maladie (Fig. 8) (Meyer et al., 2005). La souche 8004DXopAC, dans laquelle l'effecteur XopAC n'est plus fonctionnel, devient capable d'induire la maladie chez Col0 infecté par piercing (Fig. 8) (Xu et al., 2008). Ce résultat suggère que XopAC est un effecteur qui confère spécifiquement une immunité vasculaire à Col0 (Xu et al., 2008).

2.3 Mécanismes de défense communs activés lors de la PTI et de l'ETI

La PTI et l'ETI sont deux stratégies de défenses différentes et de ce fait, on pourrait s'attendre à ce que les mécanismes intervenant dans les deux cas soient eux aussi différents. C'est effectivement le cas dans la mesure où seule l'ETI est issue de la reconnaissance R/Avr. Cependant, il existe également des réponses immunitaires communes déclenchées lors de la PTI et l'ETI.

Une analyse transcriptomique comparative a été effectuée afin de déterminer les points communs entre PTI et ETI (Navarro et al., 2004). Dans cette étude, des cultures cellulaires et des plantules d'*Arabidopsis* traitées avec flg22 pour induire la PTI, ont permis d'identifier les gènes induits par ce traitement, appelés gènes *FLARE* (*FLAgellin Rapidly Elicited*) (Navarro et al., 2004). Les auteurs ont ensuite comparé leurs données avec celles obtenues précédemment dans le cas d'une inoculation d'*Arabidopsis* avec deux souches de *Pst* possédant soit *AvrB*, soit *AvrRpt2*, deux effecteurs conférant l'avirulence (ETI) à la souche *Pst* DC3000 (Tao et al., 2003). La comparaison des données transcriptomiques entre PTI et ETI a révélé un chevauchement important entre les deux types de réponse de défense puisque 45% des gènes *FLARE* identifiés lors de la PTI sont également induits trois heures après infection avec les deux souches de *Pst* (Navarro et al., 2004). Il s'agit par exemple de facteurs de transcription de type MYB ou WRKY, de gènes impliqués dans la modification pariétale (peroxydases) ou dans la synthèse hormonale (éthylène) et de gènes codant des protéines kinases impliquées dans la transduction de signaux (Navarro et al., 2004).

Un second aspect commun intervenant à la fois lors de la PTI et l'ETI est la signalisation par les voies MAP kinase (MAPK). Dans le cas de la PTI, la perception de flg22 aboutit à l'activation du gène *PAD3*, comme nous l'avons vu précédemment (Fig. 3) (Andreasson et al., 2005; Qiu et al., 2008). Dans le cas de l'ETI, des études ont montré que deux MAP kinases, WIPK (Wound-Induced Protein Kinase) et SIPK (Salicylic acid-Induced

Protein Kinase) sont activées lors de l'inoculation du virus de la mosaïque du tabac chez un tabac possédant la protéine de résistance (appelée N) correspondante. Ces deux mêmes kinases sont également induites dans des cellules de tabac possédant le gène de résistance Cf-9 et mises en présence du facteur d'avirulence fongique Avr9 (Zhang and Klessig, 1998; Romeis et al., 1999).

Un troisième point commun entre PTI et ETI est la production massive de différentes formes réactives de l'azote (nitric oxyde, NO) et de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS ; reactive oxygen intermediates, ROI). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (OH[°]) et l'anion superoxyde (O₂⁻) sont des exemples de ROS dont la production se fait dans l'apoplaste végétal (Foyer and Noctor, 2005; Torres et al., 2006). Une enzyme, la NADPH oxydase, a été proposée comme étant la source de ROS produit lors des interactions plantes/agents pathogènes (Torres and Dangl, 2005). Chez les plantes, les NADPH oxydases portent le nom de Rboh (Respiratory burst oxydase homologs). Chez Arabidopsis, les gènes *AtrbohD* et *AtrbohF* sont responsables de la production de la majorité des ROS en réponse à des bactéries et des oomycètes avirulents (ETI) et à la reconnaissance de PAMP (PTI) (Torres et al., 2002; Zhang et al., 2007). Cependant, selon si elle intervient lors de la PTI ou de l'ETI, la production de ROS se caractérise différemment. Lors de la PTI, une seule phase non-spécifique et transitoire a lieu dans les premières minutes suivant l'interaction avec un agent pathogène virulent (par exemple, *P. syringae* DC3000 ou DC3000(*hrcC*)). Dans le cas de l'ETI, induite par exemple par la souche avirulente *P. syringae* DC3000 (*avrRpm1*), une seconde phase, plus forte, se produit en complément de la première quelques heures plus tard et est généralement associée avec la mise en place de la réponse hypersensible (HR) (Piedras et al., 1998; Grant and Loake, 2000; Torres, 2010).

Enfin, la HR est une forme de mort cellulaire rapide, intense et localisée au niveau du site d'infection et elle est classiquement associée à l'ETI. Jusqu'à présent, l'utilisation la plus courante du peptide flg22 dérivé de *P. aeruginosa* n'avait pas permis de visualiser de mort cellulaire (Naito et al., 2008). Cependant, en utilisant le peptide flg22 dérivé de *P. syringae* pv. *tabacci* 6605, des symptômes de HR ont pu être observés dans les tissus foliaires infiltrés, indiquant que la HR est également une réponse de défense pouvant intervenir lors de la PTI (Naito et al., 2008).

Comme nous venons de le voir dans cette première partie, alors que la PTI et l'ETI sont des stratégies de défenses mises en place dans des contextes différents, elles présentent des similitudes dans les réponses (reprogrammation génique, voie MAPK, ROS, HR) qu'elles font

intervenir. Un autre volet des réponses de défenses impliquées dans la PTI et l'ETI correspond aux voies de signalisations hormonales dépendantes, notamment, de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène. La seconde partie de l'introduction est une description du rôle de ces trois voies dans les réponses immunitaires des plantes, ainsi que celui du métabolisme aromatique dont l'importance est révélée de façon croissante au cours de ces dernières années.

Tableau I. Classification des protéines PR (Pathogenesis-Related) associées aux voies ET-JA-SA chez Arabidopsis.

Seules les protéines PR les plus couramment utilisées comme marqueurs de défense des trois voies hormonales chez Arabidopsis sont listées dans le tableau.

Voie	Membres	Propriétés
SA	PR-1 (AT2G14610)	Antifongique
SA	PR-2 (AT3G57260)	Endo-beta-1,3-glucanases de classes I, II et III
ET/JA	PR-3 (AT3G12500)	Endochitinases de classes I, II, IV, V, VI et VII
ET/JA	PR-4 (AT3G04720)	Antifongique, activité endochitinase
SA	PR-5 (AT1G75040)	Antifongique, protéines thaumatin-like, osmotines, zeamatines, permeatines, similaires à des inhibiteurs alpha-amylase/trypsine
ET/JA	PDF1.2 (AT1G75830)	Défensines
JA	THI2.1 (AT1G72260)	Thionines

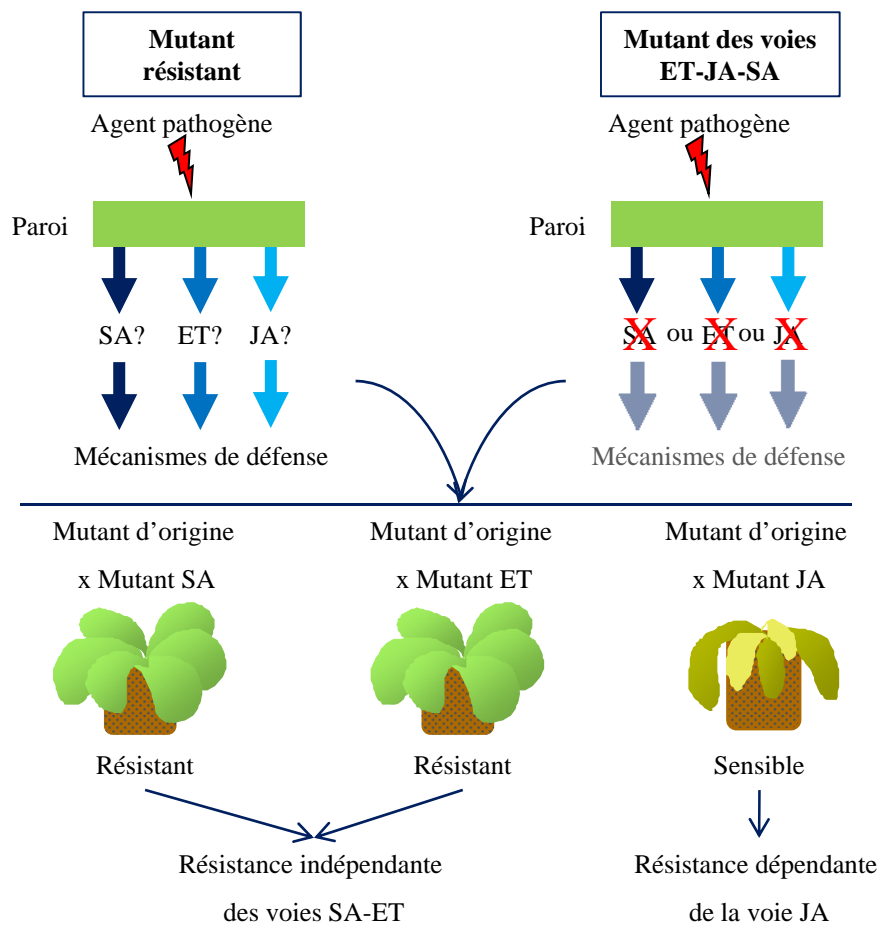


Figure 9. Représentation schématique de la stratégie visant à définir le rôle d'une voie de signalisation dans la réponse d'un mutant aux agents pathogènes.

Le mutant d'origine, résistant à un agent pathogène donné, est croisé avec différents mutants affectés dans l'une ou l'autre des voies de synthèse/signalisation dépendantes de l'acide salicylique (SA), de l'éthylène (ET) et de l'acide jasmonique (JA). La sensibilité des individus issus de ces croisements est ensuite testée. Dans le cas présenté ici, seules les plantes obtenues après le croisement avec un mutant JA présentent une sensibilité, ce qui indique que les mécanismes de résistance du mutant d'origine sont dépendants du JA.

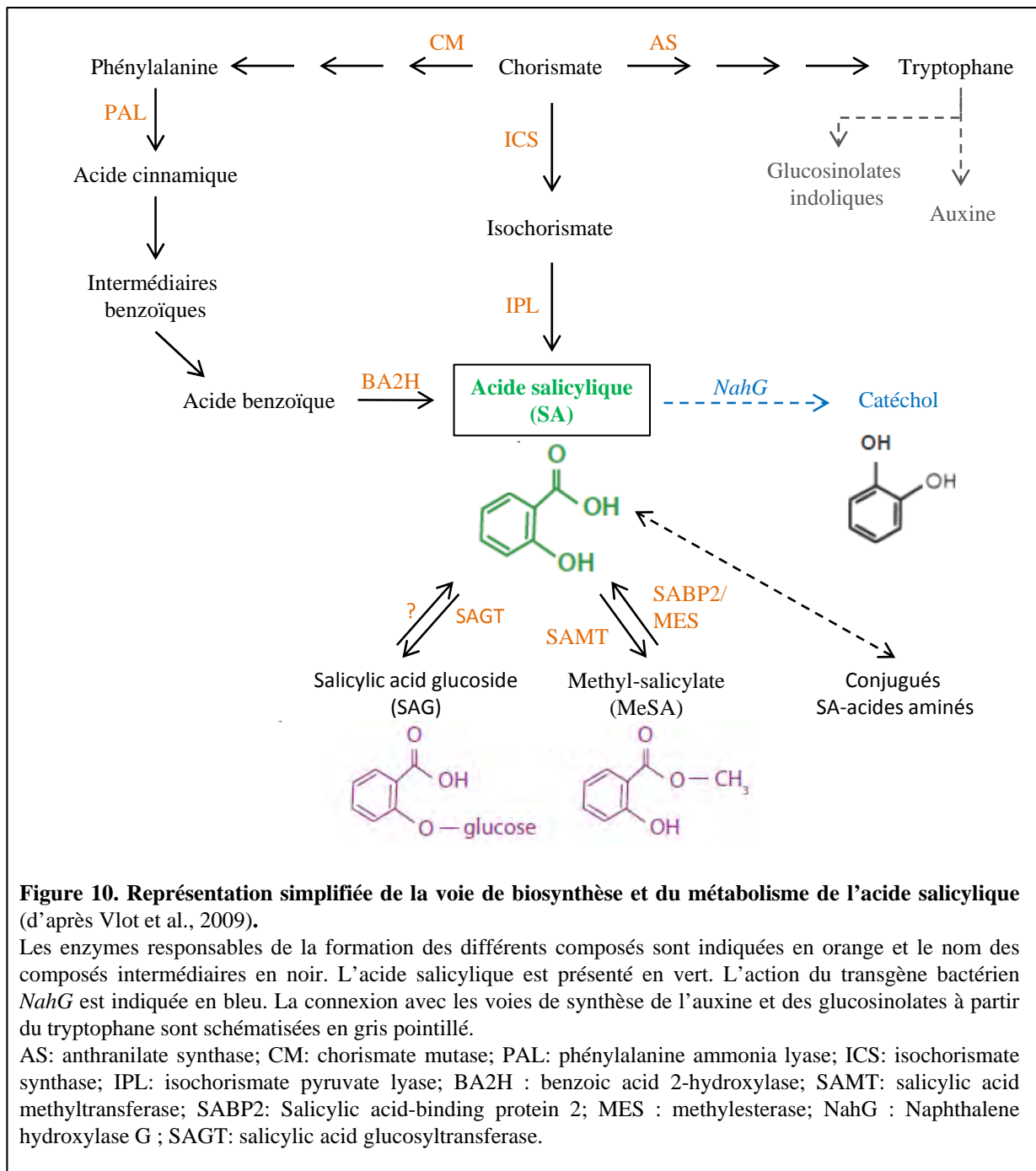
INTRODUCTION - PARTIE 2 :

VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LES REPNSES DE DEFENSE

1. Voies de signalisation hormonales classiques impliquées dans les réponses de défense

L'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont les trois hormones végétales les plus communément associées à la signalisation déclenchée en réponse à des agents pathogènes. Les nombreux travaux menés afin de décortiquer les mécanismes impliquant ces molécules ont conduit à formuler un modèle simplifié selon lequel le cycle de vie d'un agent pathogène détermine les voies hormonales impliquées dans les réponses de défense (Glazebrook, 2005). Ainsi, l'ET et le JA seraient plutôt impliqués dans la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes (se développant sur des tissus morts), alors que le SA serait impliqué dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes (se développant sur des tissus vivants) (Glazebrook, 2005). Concernant les microorganismes hémibiotrophes, ayant un profil biotrophe dans les étapes précoces d'invasion puis nécrotrophe dans les étapes tardives de l'infection, le SA serait également l'hormone impliquée (Glazebrook, 2005). De plus en plus d'interconnexions (synergiques ou antagonistes) entre ces trois voies hormonales sont mises à jour (Pieterse et al., 2009).

Une manière d'identifier une voie de signalisation hormonale impliquée lors d'une interaction entre une plante et un agent pathogène est de déterminer l'expression de gènes marqueurs. Ces gènes codent des protéines PR (Pathogenesis-related) qui sont classées en 17 familles selon leurs propriétés biochimiques. Chez *Arabidopsis*, les protéines PR-1, PR-2 et PR-5 sont dépendantes du SA, tandis que THI1.2 (Thionin 1.2) est dépendante du JA, que PR-3 et PR-4 le sont pour l'ET, et que PDF1.2 (Plant Defensin 1.2) dépend des deux voies ET/JA (Tab. I). Une autre stratégie couramment employée pour évaluer le rôle des voies ET-JA-SA consiste à croiser un mutant ayant une réponse altérée à un agent pathogène par rapport à une plante sauvage avec un mutant déficient pour la synthèse ou la signalisation d'une de ces voies et d'étudier si cela affecte le phénotype d'origine (Fig. 9). Par exemple, si un mutant résistant est croisé avec un mutant d'une voie de signalisation JA et que cela



restaure la sensibilité à l'agent pathogène, cela démontre que l'acide jasmonique est impliqué dans les mécanismes de résistance (Fig. 9). Chez *Arabidopsis*, les croisements sont classiquement réalisés avec *sid2*, *npr1* ou *NahG* pour le SA, avec *ein2* pour l'ET et avec *coil* ou *jar1* pour le JA.

1.1 L'acide salicylique (SA)

Lors de la mise en place de la PTI ou de l'ETI, les gènes impliqués dans la synthèse d'acide salicylique sont parmi les premiers gènes à être induits, ce qui signifie qu'une production de SA est initiée très rapidement au cours de ces deux types de défense (van den Burg and Takken, 2009). Chez *Arabidopsis*, le SA est synthétisé dans les chloroplastes par deux voies enzymatiques distinctes à partir du chorismate (Fig. 10). Il est intéressant de noter que le tryptophane, précurseur d'auxine et des glucosinolates indoliques, dérive lui aussi du chorismate (Fig. 10).

Concernant la synthèse de SA, d'un côté, la L-phénylalanine, dérivée du chorismate, est convertie par la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) en acide cinnamique qui, à son tour, est converti en SA par différentes étapes enzymatiques successives (Fig. 10). D'un autre côté, la synthèse se fait en deux étapes : une IsoChorismate Synthase (ICS) convertit le chorismate en isochorismate qui lui est converti en SA par l'action d'une Isochorismate Pyruvate Lyase (IPL) (Fig. 10). Même si la voie ICS représente environ 90% de la production de SA, comme le montre la très faible quantité de SA contenue dans le double mutant *ics1 ics2*, les deux voies sont fonctionnelles chez *Arabidopsis* (Wildermuth et al., 2001; Garcion et al., 2008). Selon le contexte physiologique, la biosynthèse de SA emprunte l'une ou l'autre des voies. Par exemple, la voie des phénylpropanoïdes intervient pour promouvoir la mort cellulaire en réponse à des éliciteurs fongiques, comme par exemple une glycoprotéine de *Phytophthora megasperma* (Dorey et al., 1997). La production de SA se fait via la voie de l'isochorismate suite à l'infection par *P. syringae pv. maculicola* ou *Erysiphe orontii*, pour induire l'expression de *PR-1* et déclencher la SAR (Systemic Acquired Resistance) (Wildermuth et al., 2001).

La SAR correspond à une mise en place d'un niveau de défense basée sur l'accumulation systémique de SA, à partir d'une réponse localisée au site d'infection (Loake and Grant, 2007). Il a été proposé que le méthylsalicylate (MeSA), dérivé méthylé du SA (Fig. 10), pouvait être le signal émis pour déclencher cette réponse (Fig. 11) (Park et al.,

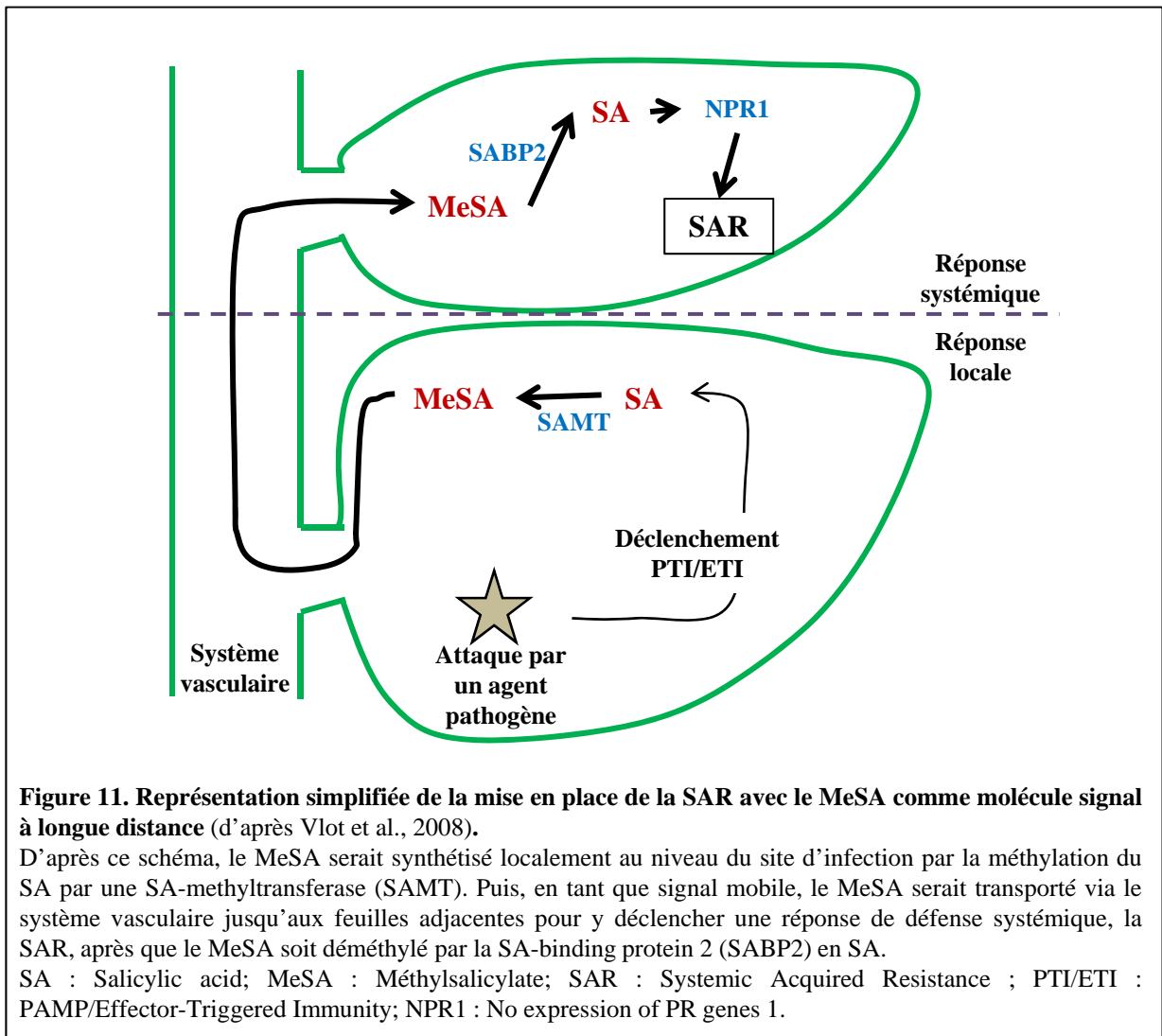


Figure 11. Représentation simplifiée de la mise en place de la SAR avec le MeSA comme molécule signal à longue distance (d’après Vlot et al., 2008).

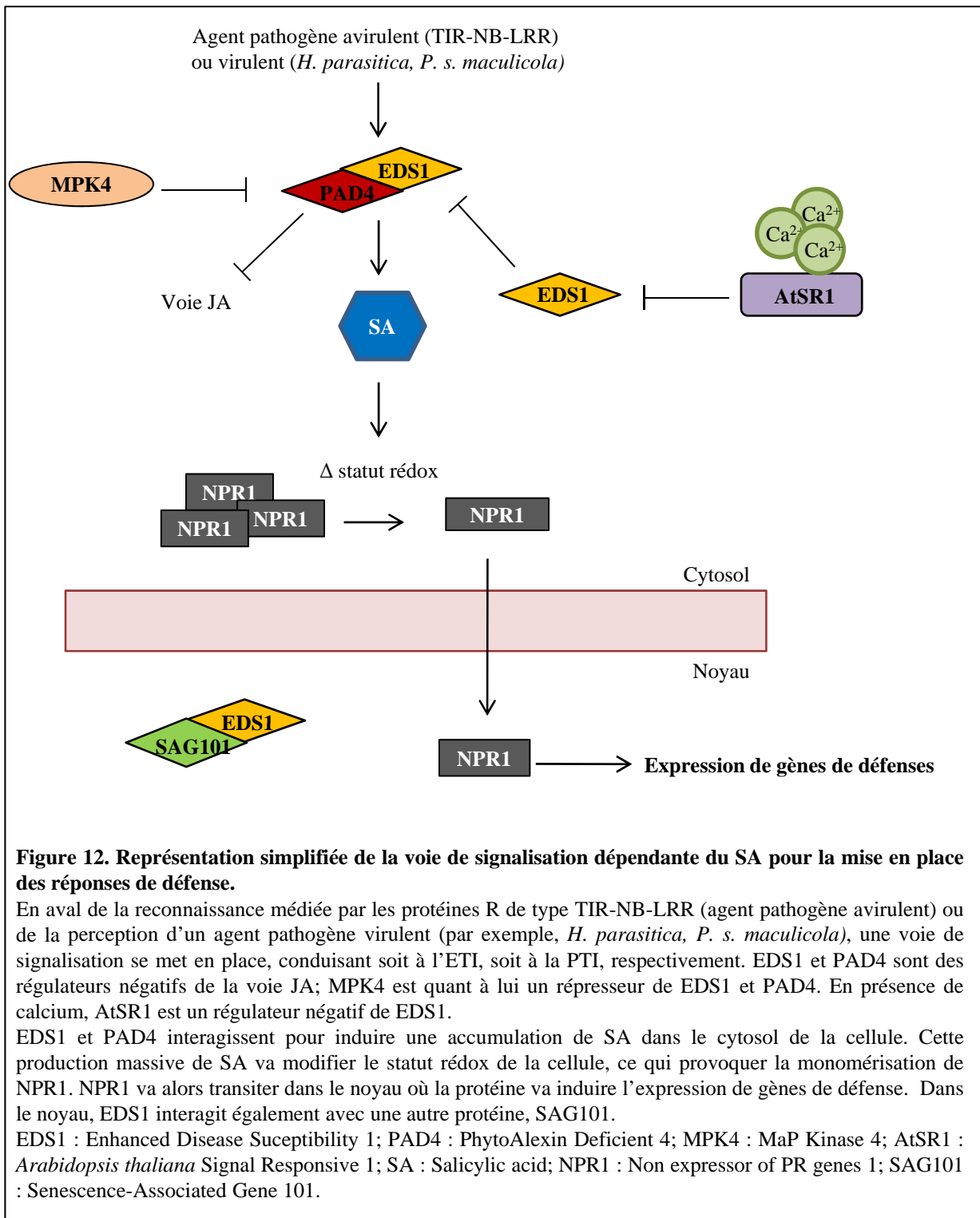
D’après ce schéma, le MeSA serait synthétisé localement au niveau du site d’infection par la méthylation du SA par une SA-méthyltransferase (SAMT). Puis, en tant que signal mobile, le MeSA serait transporté via le système vasculaire jusqu’aux feuilles adjacentes pour y déclencher une réponse de défense systémique, la SAR, après que le MeSA soit déméthylé par la SA-binding protein 2 (SABP2) en SA.

SA : Salicylic acid; MeSA : Méthylsalicylate; SAR : Systemic Acquired Resistance ; PTI/ETI : PAMP/Effector-Triggered Immunity; NPR1 : No expression of PR genes 1.

2007). Si le MeSA est un composé volatile normalement absent chez les plantes, il est fortement accumulé en réponse à une infection par le virus de la mosaïque du tabac (Park et al., 2007). Biologiquement inactif en soit, le MeSA serait ensuite véhiculé par le système vasculaire pour rejoindre une zone non attaquée de la plante. Le MeSA serait alors déméthylé pour former du SA par l'enzyme SABP2 (SA-Binding Protein 2), permettant d'initier une voie de signalisation NPR1-dépendante aboutissant à la défense (Fig. 11). Cependant, une récente étude remet en question le MeSA en tant que signal déclencheur (Attaran et al., 2009). En effet, le mutant *bsmt1* (*benzoic acid and salicylic acid methyltransferase 1*) n'est plus capable de produire du MeSA en réponse à une infection par *P. syringae* pv. *maculicola*, ce qui n'empêche pas la SAR d'être activée dans les feuilles adjacentes aux feuilles infectées (Attaran et al., 2009). Par conséquent, si la SAR est établie en absence de MeSA, alors le signal responsable de la mise en place de cette réponse de défense ne peut pas être le MeSA.

Outre la méthylation, le SA subit d'autres modifications telles que la glucosylation ou la conjugaison à des acides aminés (Fig. 10). La plupart du SA est stocké sous la forme de SA-O- β -glucoside (SAG) dans la vacuole, a priori pour favoriser la détoxification de la cellule (Dean et al., 2003; Dean et al., 2005). Il a été proposé que cette séquestration vacuolaire soit réversible et que cela jouerait un rôle dans l'homéostasie cellulaire du SA et sa disponibilité en tant que molécule signal lors des réponses de défense (Dean et al., 2005).

Plusieurs protéines impliquées dans les réponses de défense dépendantes du SA ont été identifiées (Fig. 12). Chez *Arabidopsis*, les mutants *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*) et *pad4* (*phytoAlexine deficient 4*) ont été initialement découverts lors de deux cribles de mutants affectés respectivement dans leur réponse à l'oomycète *Hyaloperonospora parasitica* (Parker et al., 1996) ou à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Glazebrook et al., 1996). Les mutants *eds1* et *pad4* présentent une sensibilité accrue aux agents pathogènes utilisés lors des cribles respectifs, ainsi qu'un défaut d'accumulation de SA et d'induction de gènes *PR* (*PR-1*, *PR-5*) (Zhou et al., 1998; Falk et al., 1999). Une application exogène de SA permet de restaurer l'induction de gènes de défense chez les mutants *eds1* et *pad4*, et dans un fond génétique sauvage, le SA induit l'expression de *EDS1* et *PAD4* (Zhou et al., 1998). *EDS1* et *PAD4*, deux protéines à domaine lipase, interagissent et interviennent dans la mise en place de la PTI (infection par *H. parasitica* et *P. s.* pv. *maculicola*) et l'ETI dépendante des gènes R de type TIR-NB-LRR (Fig. 12) (Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999). *EDS1* interagit dans le noyau avec une autre protéine de type lipase, *SAG101* (Senescence-Associated Gene 101), d'après des études de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Fig. 12) (Feys et al., 2005). Une protéine kinase, *MPK4*, a été identifiée comme répresseur d'*EDS1* et



PAD4, qui sont quant à elles des répresseurs de la voie JA (Fig. 12) (Brodersen et al., 2006). De ce fait, lorsque MPK4 agit, PAD4 et EDS1 sont inactivées et, par conséquent, la voie JA s'en trouve activée et les réponses de défense associées peuvent être mises en place (Fig. 12) (Brodersen et al., 2006). Le gène *EDS1* possède le motif CGCG dans sa séquence promotrice qui est reconnu par AtSR1 (*Arabidopsis thaliana* Signal Responsive 1), un facteur de transcription capable de lier le calcium/calmoduline (Yang and Poovaiah, 2002). AtSR1 est un régulateur négatif de la voie SA et agit comme un répresseur de *EDS1*. Initialement décrits pour leur résistance accrue à *P. syringae* et *B. cinerea* (Galon et al., 2008), des mutants *Atsr1* ayant perdu leur capacité à fixer le calcium ne sont plus capables de réprimer *EDS1*, ce qui a pour conséquence d'induire l'expression de gènes de défense SA et le développement de la HR (Fig. 12) (Du et al., 2009). Ces résultats montrent que le calcium intervient dans la régulation de la réponse SA-dépendante à une attaque par *P. syringae*. Enfin, la protéine NPR1 (Non expressor of PR genes 1) apparaît également comme un régulateur clé de l'activation des défenses SA-dépendantes (Dong, 2004). NPR1 est localisée soit dans le cytosol sous forme d'oligomères, soit dans le noyau sous forme de monomères, selon le statut redox de la cellule qui dépend de l'accumulation de SA (Fig. 12) (Dong, 2004). L'ensemble de ces données indiquent que les réponses de défense dépendantes de la voie de signalisation de l'acide salicylique sont très finement régulées.

1.2 L'acide jasmonique (JA)

La biosynthèse de JA et l'induction de gènes marqueurs de défense font partie des réponses des plantes aux agents pathogènes. Par exemple, suite à une infection par la bactérie *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, une production de JA est induite et suivie de l'activation de l'expression des gènes *PDF1.2* ou *VSP1* (Norman-Setterblad et al., 2000). Les oxylipines, dont fait partie le JA, sont synthétisées par oxydation de précurseurs lipidiques membranaires et dont la synthèse nécessite deux compartiments cellulaires, les chloroplastes et le peroxyosome. L'acide linoléique est l'acide gras qui constitue le précurseur majeur de la synthèse de JA. Dans les chloroplastes, son oxydation par une lipoxygénase (13-LOX) conduit à la formation de 13-hydroperoxyde qui va être converti en acide (9S,13S)-12-oxo-*cis*-10,15-phytodiénoïque (OPDA) par l'action d'une allène oxyde synthase (AOS) puis d'une allène oxyde cyclase (AOC). Une fois transporté dans le peroxyosome, l'OPDA va être réduit par une OPDA reductase (OPR3), formant un composé intermédiaire qui va être oxydé en

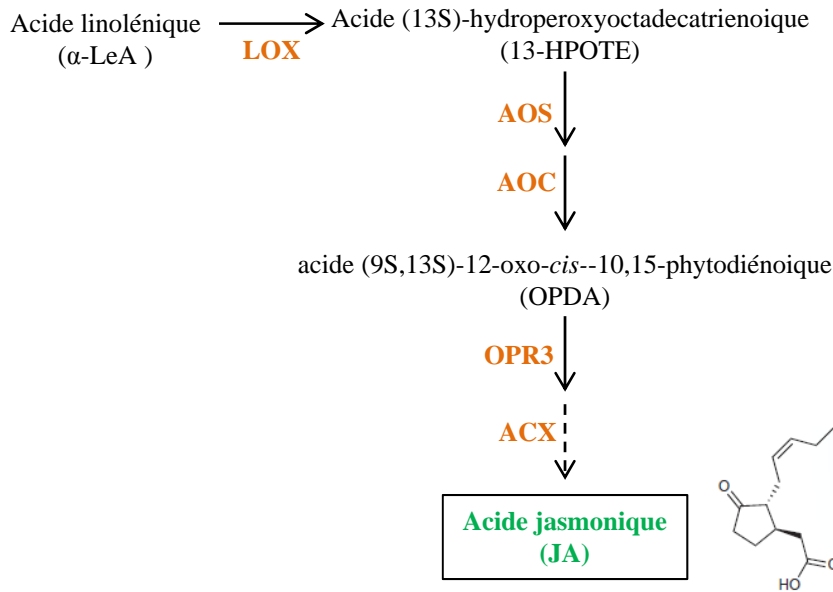


Figure 13. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) (d'après Wasternack, 2007).

Les enzymes responsables de la formation des différents composés sont indiquées en orange et le nom des composés intermédiaires en noir. L'acide jasmonique est présenté en vert.

LOX : lipoxygénase; AOS : allène oxyde synthase; AOC : allène oxyde cyclase; OPR3 : OPDA reductase 3; ACX : acyl coA oxydase.

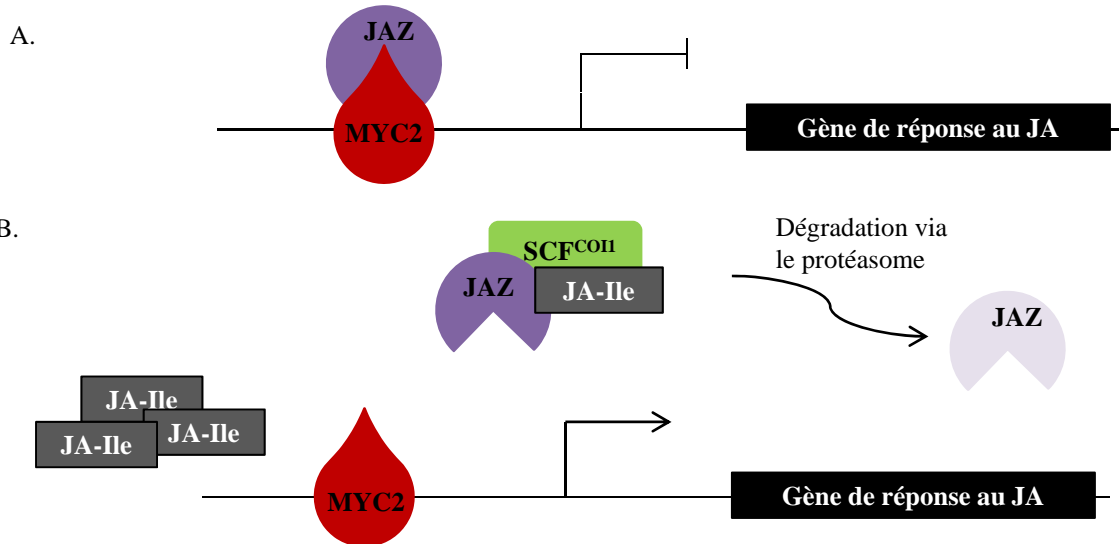


Figure 14. Modèle de fonctionnement du complexe SCF^{COI1} et la mise en place des réponses de défense dépendantes du JA.

A. Le facteur de transcription MYC2 est un régulateur positif des gènes de réponse au JA en se fixant sur leur promoteur. Lorsque la voie JA n'est pas activée, les répresseurs JAZ s'associent à MYC2 pour réprimer l'expression des gènes.

B. En présence de JA-Ile, celle-ci se fixe sur COI1, le récepteur du complexe SCF^{COI1}, provoquant le recrutement des protéines JAZ dans le complexe. Ensuite, les JAZ sont dégradées via le protéasome. MYC2, ainsi libéré de la répression par les protéines JAZ peut alors induire l'expression des gènes de réponse au JA.

trois étapes par l'action d'enzymes de type acyl-CoA oxydases (ACX) pour former du JA (Fig. 13) (Feussner and Wasternack, 2002; Taki et al., 2005; Theodoulou et al., 2005). De façon intéressante, tous les gènes de la voie de biosynthèse sont eux-mêmes induits par le JA (Wasternack, 2007; Browse, 2009).

Le JA subit plusieurs modifications dont la conjugaison à des acides aminés permettant la formation de conjugués jasmonoyl-acides aminés, comme par exemple le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile). Chez *Arabidopsis*, cette conjugaison est catalysée par JAR1 (Jasmonate resistant 1), une JA amino acid synthase et le mutant *jar1* ne produit plus de JA-Ile (Staswick and Tiryaki, 2004). Initialement identifié pour sa perte de sensibilité au méthyljasmonate (MeJA), un composé qui inhibe l'élongation racinaire, le mutant *jar1* devient sensible au champignon *Pythium irregulare*, alors que les plantes sauvages sont résistantes (Staswick et al., 1992; Staswick et al., 1998). Ces résultats ont permis de démontrer que le JA-Ile est la forme active des jasmonates (Staswick and Tiryaki, 2004). JAR1 forme un complexe avec d'autres protéines, COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) et différents JAZ (Jas/ZIM domain) (Fonseca et al., 2009). La comparaison de différentes isoformes de JA-Ile a montré que le (+)-7-iso-JA-L-Ile était le composé le plus actif pour induire l'interaction entre COI1 et JAZ3 et JAZ9 (Fonseca et al., 2009). COI1 est une protéine de type F-Box faisant partie d'un complexe SCF (SKIP-CULLIN-F-Box), noté SCF^{COI1} (Fig. 14). Ce type de complexe est constitué de protéines E3-ubiquitine ligases qui catalysent l'ubiquitination de protéines cibles destinée à la dégradation via le protéasome. La protéine F-Box est responsable de la spécificité du substrat et, dans le cas du SCF^{COI1}, il s'agit des protéines JAZ. Ces protéines sont des répresseurs de MYC2, un facteur de transcription intervenant dans la régulation de l'expression de gènes en réponse au JA (Chini et al., 2007). Dans un contexte où la voie JA n'est pas activée, les protéines JAZ sont fixées à MYC2, bloquant ainsi son activité de facteur de transcription (Fig. 14). En revanche, en présence de JA-Ile, les protéines JAZ sont dirigées vers le complexe SCF^{COI1} pour être dégradées. Par conséquent, MYC2 peut agir et induire l'expression de gènes de réponse de la voie JA (*VSP2*, *LOX2*) (Fig. 14) (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). En revanche, MYC2 est un régulateur négatif de gènes JA/ET-dépendants (*PDF1.2*) qui eux sont activés par les facteurs de transcription de la famille ERF (Ethylene Response Factor) (Lorenzo et al., 2004).

Si la mise en place de défenses dépendantes du JA est associée à la protection contre des agents pathogènes nécrotrophes, elle intervient également dans l'établissement de la réponse systémique induite (ISR, induced systemic resistance). Ce processus se déroule suite à la

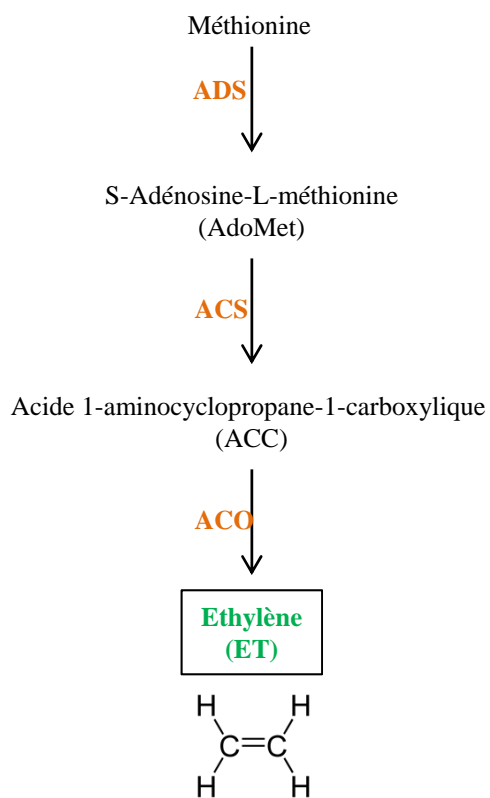


Figure 15. Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse de l'éthylène (d'après Lin et al., 2009). Les enzymes responsables de la formation des différents composés sont indiquées en orange et le nom des composés intermédiaires en noir. L'éthylène est présenté en vert.
 ADS: S-AdoMet synthase; ACS : ACC synthase; ACO: ACC oxydase.

perception de bactéries non pathogènes (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*...), regroupées sous le terme de PGPR (Plant Promoting Growth Rhizobacteria). Cette perception place la plante dans un état d'alerte, appelé "priming" ou potentialisation, en prévision d'une attaque ultérieure par un agent pathogène. Contrairement à la SAR, l'établissement de l'ISR ne s'accompagne pas d'une accumulation de protéines PR. En revanche, elle est régulée par les voies de signalisation du JA et de l'éthylène (Pieterse et al., 2009). Ces deux hormones sont connues pour leur synergisme. Par exemple, l'expression du gène de défense *PDF1.2* dépend de l'activation des deux voies JA et ET. En effet, alors qu'un traitement avec du MeJA ou de l'ET induit l'expression de *PDF1.2* chez une plante sauvage d'*Arabidopsis*, ce n'est pas le cas pour les mutants *ein2* (*ethylene insensitive 2*) et *jar1* (Penninckx et al., 1998). Un autre exemple de la connexion ET/JA concerne *ERF1*, un facteur de transcription dont l'expression est induite individuellement par le JA et l'ET, mais de façon plus accentuée lors d'un traitement simultané avec les deux hormones (Lorenzo et al., 2003).

1.3 L'éthylène (ET)

L'éthylène est un gaz dont la synthèse chez les plantes se fait en trois étapes enzymatiques à partir de la méthionine (Fig. 15). Tout d'abord, la méthionine est convertie en S-adenosine-L-méthionine (AdoMet) par une S-AdoMet synthase (ADS). Puis, du 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) est produit à partir de S-AdoMet par l'action d'une ACC synthase (ACS). Enfin, l'ACC est dégradé par une ACC oxydase (ACO) pour libérer de l'éthylène (Fig. 15) (Lin et al., 2009). La production d'éthylène est contrôlée au niveau post-transcriptionnel par la protéine ETO1 (Ethylene Overproducer 1) qui provoque la dégradation des ACS via le protéasome 26S (Wang et al., 2004). Plusieurs récepteurs de l'ET ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Il s'agit des protéines ETR1 et ETR2 (Ethylene Response 1 et 2), ERS1 et ERS2 (Ethylene Response Sensor 1 et 2) et EIN4 (Ethylene Insensitive 4). Ces cinq protéines possèdent toutes un domaine de fixation au cuivre et à l'éthylène localisé dans la partie N-terminale, ainsi qu'un domaine nécessaire à l'interaction avec la protéine CTR1 (Constitutive Triple Response 1) situé dans la partie C-terminale (Stepanova and Alonso, 2009). CTR1 est un régulateur négatif et, en absence d'éthylène, les récepteurs activent CTR1 qui bloque la cascade de signalisation en aval. Il a été démontré que CTR1 est capable de cibler EIN2, une protéine membranaire, par le complexe SCF^{ETP1/2} nécessitant deux protéines F-Box, ETP1 et ETP2 (EIN2 Targeting Protein 1 et 2), pour dégrader EIN2 via

le protéasome (Qiao et al., 2009). En présence d'éthylène, les récepteurs ETR1/2, ERS1/2 et EIN4 n'activent plus CTR1. Par conséquent, EIN2 n'est plus dégradée et peut stimuler la phosphorylation des protéines EIN3 et EIL1 (EIN3-Like 1), deux facteurs de transcription localisés dans le noyau (Solano et al., 1998; An et al., 2010). Une fois phosphorylées, EIN3 et EIL1 se fixent sur la région promotrice de certains gènes au niveau d'une séquence particulière, appelée GCC-box. Cela a pour conséquence l'induction rapide des gènes possédant cette boîte GCC en présence d'éthylène, comme par exemple ERF1 (Ethylene Response Factor 1) ou le gène de défense *PDF1.2*. La protéine EIN3 est régulée par un complexe SCF^{EBF1/2} impliquant les protéines F-Box EBF1 et EBF2 (EIN3-Binding F-Box Protein 1 et 2) (Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003).

Une fois le signal éthylène perçu, la plante réagit de différentes façons. Par exemple, des plantules de melon traitées avec de l'éthylène accumulent des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP), impliquées dans le renforcement de la paroi végétale (Toppan et al., 1982; Roby et al., 1985). La caractérisation du mutant *vad1* (*vascular-associated death 1*) d'*Arabidopsis* a révélé un rôle crucial de l'ET dans les phénotypes de mort cellulaire le long du système vasculaire des feuilles sous certaines conditions de lumière (jours courts) (Bouchez et al., 2007). Lors de la formation de ces lésions ou suite à une infection avec *P. syringae*, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène ou la voie de signalisation associée était induite chez *vad1*. Il a été proposé que l'éthylène pouvait être responsable de l'amplification de l'accumulation en ion superoxyde, ce qui aurait pour conséquence le développement accru de mort cellulaire caractérisée par la formation de lésions (Bouchez et al., 2007). Par ailleurs, *etr1-1*, *etr1-3* et *ein2-1*, tous les trois mutés dans des éléments de perception/signalisation de l'éthylène, répondent différemment à une infection par un agent pathogène : ils sont tous les trois plus résistants à une infection par le virus de la mosaïque du chou-fleur (Love et al., 2007), alors que seul *ein2-1* est aussi plus résistant à la bactérie *R. solanacearum* (Hirsch et al., 2002) et que *etr1-1* est également plus résistant au champignon *V. dahliae* (Pantelides et al., 2010). L'ensemble de ces résultats montre que l'altération à différents niveaux de la voie de l'ET conduit à une modification de la sensibilité des mutants variable d'un agent pathogène à un autre.

Des connexions entre les voies de signalisation dépendantes de l'ET et du SA ont été identifiées. Par exemple, chez *Arabidopsis*, alors que des plantes sauvages traitées avec de l'ET ne sont pas capables d'accumuler PR-1, un marqueur de défense associé à la voie SA, le mutant *edr1* (*enhanced disease resistance 1*) montre quant à lui une expression fortement accrue du gène *PR-1*. Dans ce cas, l'éthylène potentialise l'expression de *PR-1*, un processus

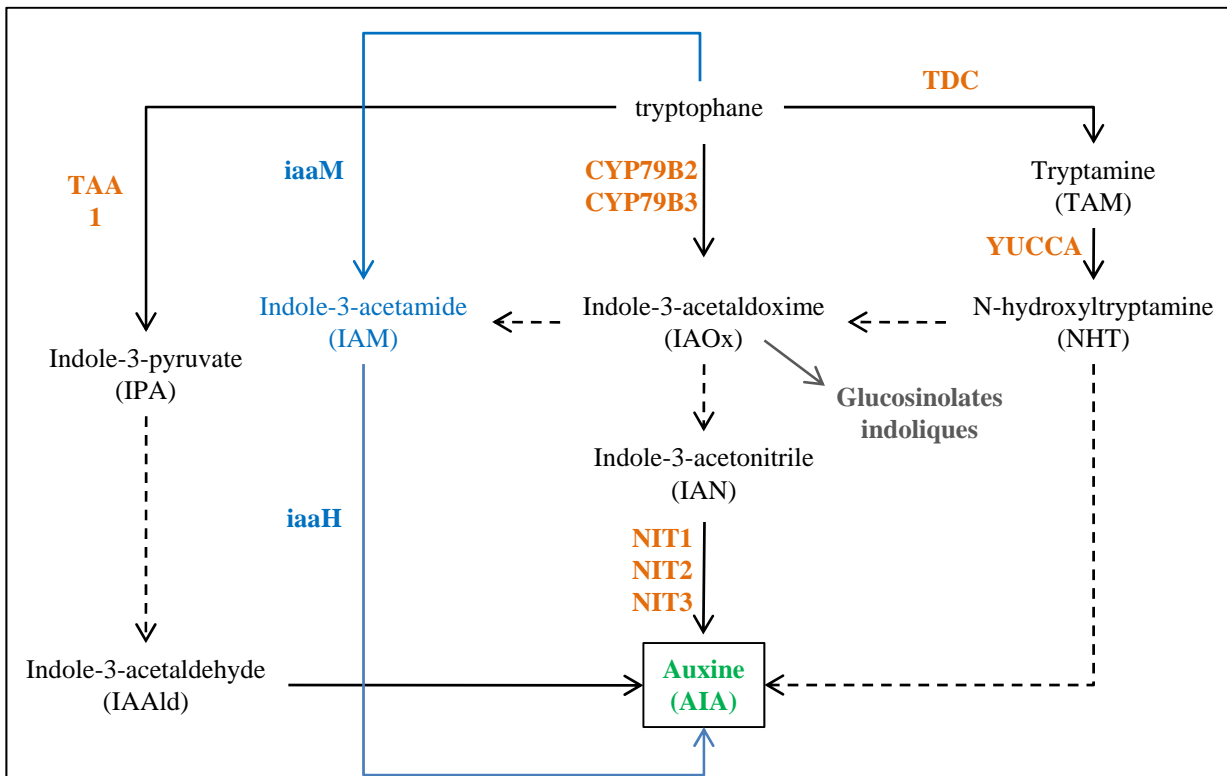


Figure 16. Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'auxine dépendantes du tryptophane (d'après Zhao, 2010).

Les enzymes responsables de la formation des différents composés sont indiquées en orange et le nom des composés intermédiaires en noir. L'auxine est présentée en vert. La voie de synthèse de l'auxine chez *Pseudomonas* et *Agrobacterium* est indiquée en bleu. Les voies de synthèse chez les plantes sont représentées en noir. La connexion avec la voie de synthèse des glucosinolates indoliques (IGS) est indiquée en gris. Les flèches pleines indiquent les étapes dont les gènes ont été identifiés; les flèches en pointillés indiquent les étapes proposées pour lesquelles les gènes responsables n'ont pas été déterminés. TDC : tryptophane decarboxylase; CYP79B2/B3 : cytochrome P450 monooxygénase 79B2/B3; NIT1/2/3 : nitrilase 1/2/3; TAA1 : tryptophane aminotransferase of Arabidopsis 1.

régulé négativement par EDR1 (Frye et al., 2001). Par ailleurs, EIN3 est un répresseur de l'expression de *SID2*, ce qui limite la quantité de SA produite. Le mutant *ein3* exprime le gène *PR-1* de façon constitutive et présente une résistance accrue à la bactérie *P. syringae* pv. *tomato* (Chen et al., 2009). Une autre étude, basée sur l'analyse globale de l'expression des gènes chez *Arabidopsis* en réponse à *P. syringae*, met en avant la connexion entre les voies ET et SA. En effet, les auteurs ont pu déterminer que de nombreux gènes de réponse au SA sont affectés chez le mutant *ein2* (Glazebrook et al., 2003).

2. Voies aromatiques impliquées dans les réponses de défense

Si les voies ET-JA-SA jouent un rôle dans beaucoup d'interactions entre plantes et agents pathogènes, des composés indoliques tels que l'auxine et les glucosinolates indoliques sont de plus en plus décrits comme des acteurs clés des réponses des plantes lors d'infections.

2.1 L'auxine (AIA)

Chez les plantes, l'acide indole-3-acétique (AIA) est la principale forme d'auxine, dont la synthèse peut se faire par plusieurs voies, essentiellement de façon dépendante du tryptophane (Trp), mais aussi de façon indépendante, à partir d'indole, le précurseur du Trp (Zhao, 2010). Les voies de biosynthèse d'AIA à partir du Trp sont décrites, en noir, dans la figure 16. L'AIA peut être produit à partir du Trp en deux étapes, via la formation d'indole-3-pyruvate (IPA) et d'indole-3-acétaldéhyde (IAAld) (Fig. 16). Une autre possibilité est la formation de tryptamine (TAM) par une Trp decarboxylase, suivie de l'hydroxylation par des flavin monooxygénases de la famille YUCCA pour obtenir une forme hydroxylée de tryptamine (NHT), avant que ce composé ne soit transformé en AIA (Fig. 16). Enfin, le tryptophane peut être converti en indole-3-acétaldoxime (IAOx) par les cytochromes CYP79B2 et CYP79B3. Ensuite, l'IAOx est converti en indole-3-acetonitrile (IAN) qui, à son tour, est catalysé par des nitrilases pour aboutir à la formation d'auxine (Fig. 16).

Certaines bactéries sont capables de produire de l'AIA. Par exemple, les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Agrobacterium* utilisent une tryptophan-2-monooxygénase, *iaaM*, pour convertir le Trp en indole-3-acétamide (IAM) qui est, à son tour, hydrolysé en auxine (AIA) par l'action de l'hydrolase *iaaH* (Fig. 16, en bleu) (Camilleri and Jouanin, 1991). Chez

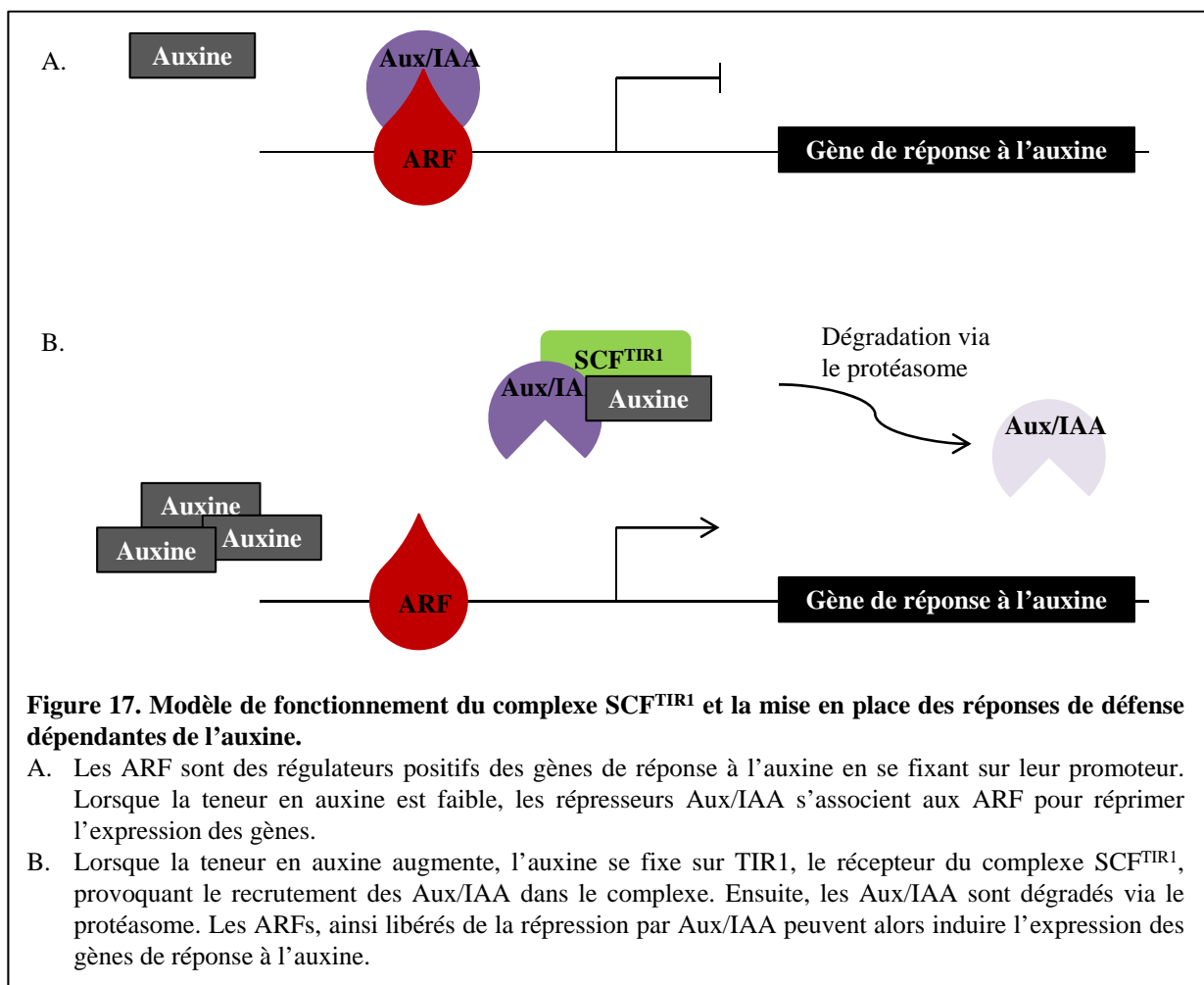


Figure 17. Modèle de fonctionnement du complexe SCF^{TIR1} et la mise en place des réponses de défense dépendantes de l'auxine.

- A. Les ARF sont des régulateurs positifs des gènes de réponse à l'auxine en se fixant sur leur promoteur. Lorsque la teneur en auxine est faible, les répresseurs Aux/IAA s'associent aux ARF pour réprimer l'expression des gènes.
- B. Lorsque la teneur en auxine augmente, l'auxine se fixe sur TIR1, le récepteur du complexe SCF^{TIR1}, provoquant le recrutement des Aux/IAA dans le complexe. Ensuite, les Aux/IAA sont dégradés via le protéasome. Les ARFs, ainsi libérés de la répression par Aux/IAA peuvent alors induire l'expression des gènes de réponse à l'auxine.

Arabidopsis, il a été montré que l'IAM est présent et qu'il peut être hydrolysé en AIA, ce qui suggère que l'IAM serait aussi un intermédiaire dans la synthèse d'auxine chez les plantes (Pollmann et al., 2009).

Une famille de récepteurs d'auxine a été identifiée. Il s'agit de la famille TIR1 (Transport Inhibitor Response 1), une protéine de type F-box qui va attribuer la spécificité de substrat au complexe E3-ubiquitine ligase SCF^{TIR1} (Gray et al., 1999; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). En présence d'auxine à faible concentration, les protéines Aux/IAA répriment les facteurs de transcription ARF (Auxin Response Factor) qui régulent la transcription de gènes de réponse à cette hormone (Fig. 17). Lorsque la concentration en AIA augmente dans la cellule, l'auxine va se fixer sur TIR1, ce qui va accroître son affinité pour ses cibles Aux/IAA. Celles-ci vont alors être ubiquitinées puis dégradées via le protéasome, permettant ainsi la libération des ARF de leur inhibition par Aux/IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid) (Fig. 17) (Lokerse and Weijers, 2009). Récemment, le rôle prépondérant joué par l'auxine dans le déterminisme de l'issue d'une interaction entre Arabidopsis et *P. syringae* a été révélé par l'utilisation d'une lignée transgénique sur-exprimant AFB1 (Auxin signaling F-Box protein 1), un membre de la famille de TIR1 (Navarro et al., 2006). Cette lignée induit de façon constitutive la voie de signalisation en réponse à l'auxine et devient plus sensible à une souche virulente de *P. syringae* pv. *tomato*, suggérant que l'auxine est un régulateur négatif de la résistance contre les agents pathogènes (hémi)biotrophes tel que *P. syringae* (Navarro et al., 2006). D'un autre côté, la surexpression du micro ARN miR393, qui cible TIR1 et AFB pour les dégrader, induit à la fois une augmentation de la résistance à cette même bactérie, mais aussi une répression de la signalisation dépendante de l'auxine (Navarro et al., 2006). Ces résultats indiquent une corrélation inverse entre le niveau de signalisation de l'auxine et la résistance d'Arabidopsis à *P. syringae* (Navarro et al., 2006). De plus, la réponse de mutants affectés dans la biosynthèse ou le transport d'auxine (*tir1*, *aux1*, *axr4* et *cyp79b2* *cyp79b3*) a été testée vis-à-vis de *P. syringae* afin de déterminer leur capacité à développer la SAR (Truman et al.). Pour cela, les mutants ont été dans un premier temps inoculés avec la souche avirulente de *P. syringae* pv. *tomato* (*AvrRpm1*) afin d'induire la SAR. Deux jours plus tard, les mêmes plantes ont été infectées avec une souche virulente de *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*). Les résultats obtenus sur l'ensemble des mutants testés montrent que la SAR n'est pas établie, comme l'atteste leur sensibilité à *Psm* (Truman et al., 2011). Ces résultats soulignent l'importance du métabolisme et de l'homéostasie de l'auxine dans l'établissement d'une réponse systémique efficace.

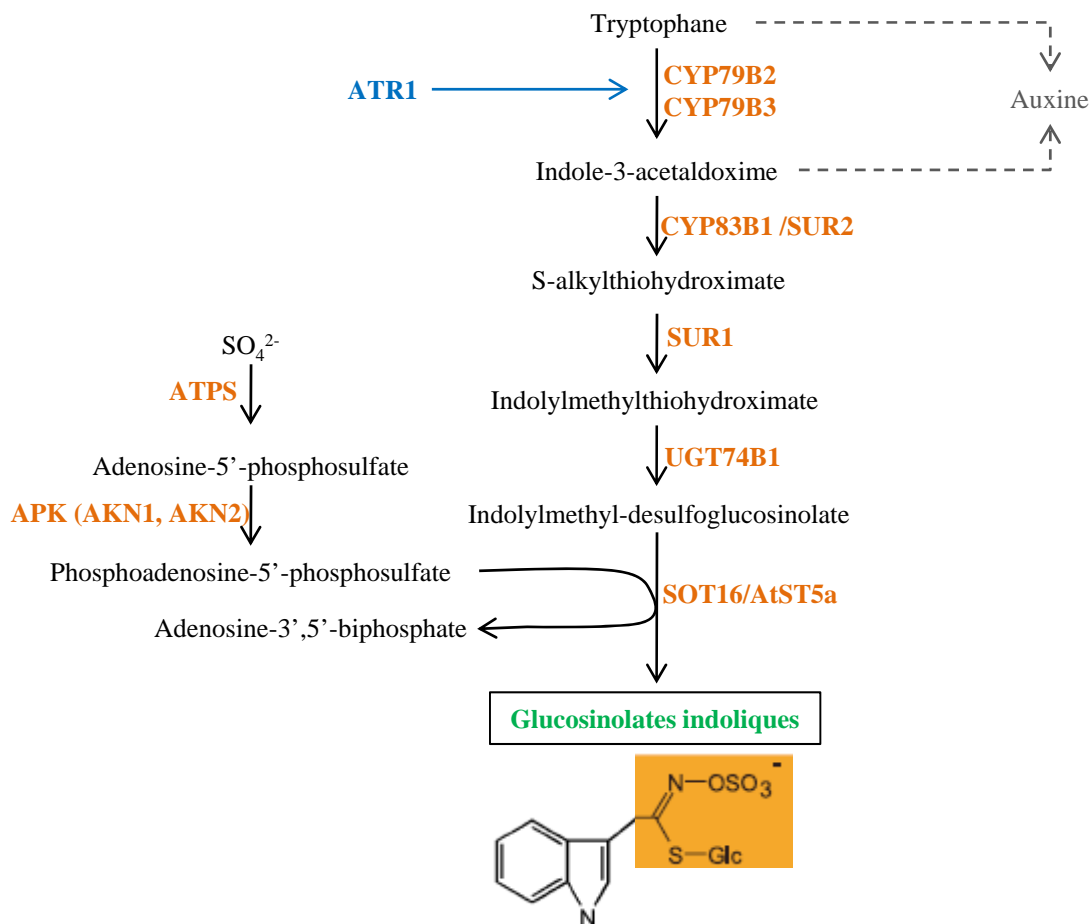


Figure 18. Représentation simplifiée de la structure et de la voie de biosynthèse des glucosinolates (d'après Halkier and Gershenzon, 2006).

Voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques (IGS). Les enzymes responsables de la formation des différents composés sont indiquées en orange et le nom des composés intermédiaires en noir. Les glucosinolates indoliques sont présentés en vert. La régulation positive de la synthèse d'IGS par ATR1 est indiquée en bleu. Les connexions avec les voies de biosynthèse de l'auxine sont schématisées en gris.

CYP79B2 : cytochrome P450 79B2; CYP79B3 : cytochrome P450 79B3; CYP83B1 : cytochrome P450 83B1; SUR1/2 : superroot 1/2; UGT74B1 : UDP-glucose :thiohydroximic acid S-glucosyltransferase 74B1; SOT16 : sulfotransferase 16; AtST5a : Arabidopsis sulfotransferase 5a; ATR1 : Altered tryptophan 1 ; ATPS : ATP sulfurylase ; APK : adenosine-5'-phosphosulfate (APS) kinase; AKN1/2 : APS kinase 1/2.

2.2 Les Glucosinolates indoliques (IGS)

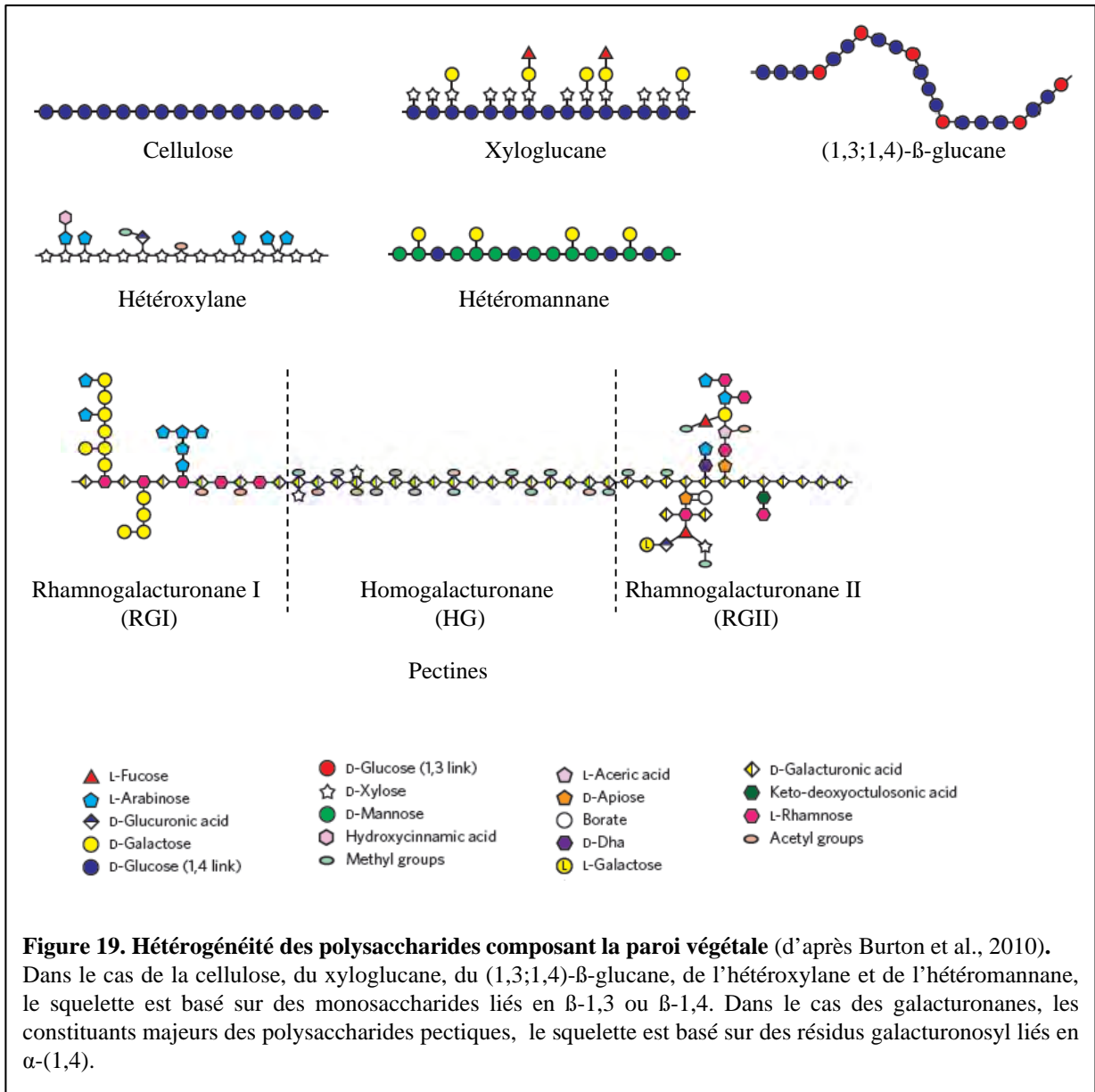
Les glucosinolates indoliques (IGS) reçoivent à présent beaucoup d'attention dans le domaine de la phytopathologie. Les IGS sont synthétisés spécifiquement chez les Capparales (incluant les Brassicacées) à partir du tryptophane (Fig. 18). La première étape de la biosynthèse des IGS consiste en la conversion du Trp en aldoxime, l'indole-3-acétaldoxime (IAOx) par deux enzymes appartenant à la famille 79 des cytochromes P450, CYP79B2 et CYP79B3. Le double mutant *cyp79b2 cyp79b3* ne produit pas d'IGS, ni leurs dérivés tels que l'acide raphanusamique (RA) et l'indol-3-ylmethylamine (I3A) et devient hôte pour des champignons non adaptés à *Arabidopsis*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Erysiphe pisi* ou certains isolats de *Plectosphaerella cucumerina* (Zhao et al., 2002; Bednarek et al., 2009; Sanchez-Vallet et al., 2010). Ce résultat renforce l'idée que les IGS et/ou leurs dérivés jouent un rôle dans la résistance à l'invasion de ces agents pathogènes fongiques. La biosynthèse des IGS se poursuit par l'oxydation de l'aldoxime formé par CYP83B1 (SUR2) pour produire du S-alkylthiohydroximate. Ensuite, ce produit formé est clivé par SUR1, une C-S lyase, pour donner de l'acide thiohydroximique (indolylmethylthiohydroximate). Puis, une UDP-glucose:thiohydroximic acid S-glucosyltransferase, UGT74B1, agit pour produire un glucosinolate désulfaté, le indolylméthyl-desulfoglucosinolate. Enfin, la dernière étape est réalisée par AtST5a (SOT16), une PAPS:desulfoglucosinolate sulfotransferase, qui catalyse la formation des IGs (Fig. 18) (Halkier and Gershenzon, 2006).

Les glucosinolates sont stockés dans la vacuole et lors d'une attaque par un herbivore, la dégradation de la cellule va permettre aux glucosinolates d'être en contact avec des myrosinases ou beta-thiogluco-side glucohydrolases (TGG). Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse des glucosinolates, formant ainsi différents produits (thiocyanates, nitriles...) actifs contre les herbivores (Grubb and Abel, 2006). Récemment, il a été montré que la myrosinase PEN2 est capable d'initier le métabolisme des IGS, notamment le 4-methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate (4MI3G), substrat majoritaire de PEN2 (PENetration 2), pour libérer des produits antimicrobiens, tels que l'acide raphanusamique (RA) et l'indol-3-ylmethylamine (I3A) (Bednarek et al., 2009). Le mutant *pen2* ne produit plus de RA et d'I3A, devient plus sensible *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* et *Erysiphe pisi* et ne produit plus de callose en réponse à un traitement avec flg22 (Bednarek et al., 2009; Clay et al., 2009).

Récemment, le facteur de transcription MYB51/HIG1 (High Indolic Glucosinolate 1) a été identifié comme un régulateur de la voie de synthèse des IGS, puisqu'il cible plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du tryptophane (*DHS1* et *TSB1*) et des IGS

(*CYP79B2/B3*, *CYP83B1*, *UGT74B1* et *AtST5a*) (Gigolashvili et al., 2007). Le mutant *hig1-1* qui n'accumule plus d'IGS, n'est plus capable de produire de la callose en réponse à un traitement avec flg22 (Clay et al., 2009). De plus, chez ce mutant, le niveau d'expression de tous les gènes intervenant dans la synthèse des IGS est significativement diminué en réponse à flg22, ce qui indique que MYB51 est un régulateur positif de ces gènes dans les réponses immunitaires (Clay et al., 2009). Enfin, alors que le mutant *mlo2* (*mildew resistance locus 2*) présente une résistance accrue au champignon *Botrytis cinerea*, le croisement entre ce mutant et *pad3* (déficient en camalexine) ou *cyp79b2 cyp79b3*, conduit, par comparaison au témoin sauvage, à une sensibilité accrue à cet agent pathogène (Consonni et al., 2010). Ces résultats montrent que les dérivés du tryptophane, qu'il s'agisse d'IGS ou de camalexine sont importants pour la résistance de *mlo2* au champignon.

Dans cette seconde partie introductive, nous avons vu comment certaines voies de signalisation étaient impliquées dans les réponses de défense des plantes contre les agents pathogènes. Cette description n'est pas exhaustive et de plus en plus de travaux font état de l'importance d'autres voies, telles que l'acide abscissique, les cytokinines et les brassinostéroïdes. En amont du déclenchement de ces réponses de défense, une étape essentielle est la nécessité pour la plante, de contrôler ses envahisseurs dès les premiers temps. Pour cela, elle compte sur sa paroi cellulaire pour constituer une barrière physique. De leur côté, les agents pathogènes doivent franchir cette paroi pour poursuivre leur processus d'infection. La troisième partie de l'introduction décrit le rôle de la paroi végétale dans l'établissement des interactions entre plantes et microorganismes phytopathogènes.



INTRODUCTION - PARTIE 3 :

ROLE DE LA PAROI VEGETALE DANS LES INTERACTIONS PLANTES – AGENTS PATHOGENES

1. La paroi végétale : interface entre plantes et agents pathogènes

La paroi végétale joue un rôle clé dans le développement des plantes et dans leur réponse à l'environnement. Par sa position à la surface des cellules, à l'interface entre la plante et son environnement, il est raisonnable de penser que la structure et les propriétés physico-chimiques des parois végétales contribuent à la réussite ou à l'échec des agents pathogènes dans des interactions plantes - agents pathogènes. La paroi primaire, entourant chaque cellule végétale, est une matrice complexe composée de polymères polysaccharidiques (cellulose, hémicellulose et pectines) dans laquelle est enchevêtré un réseau de protéines. Cependant, il existe une hétérogénéité des constituants à l'échelle des espèces (monocotylédones *versus* dicotylédones), des organes et même à l'échelle cellulaire (Burton et al., 2010). Afin d'étudier la diversité des composants pariétaux, une pléiade d'anticorps spécifiques ont été générés. A ce jour, pas moins de 180 anticorps monoclonaux ont été conçus pour reconnaître spécifiquement certains épitopes, permettant d'étudier la paroi végétale, que ce soit au niveau de sa structure, de sa dynamique ou de sa biosynthèse (Pattathil et al., 2010).

La cellulose, constituant majoritaire, est composée de résidus β -(1,4)-D-glucose liés entre eux pour former des microfibrilles (Fig. 19). Quant aux polysaccharides hémicellulosiques, ils peuvent être de natures différentes selon le polymère considéré. Les xyloglucanes sont composés de glucoses substitués de résidus de D-xylose, D-galactose et L-fucose, tandis que les xylanes ont un squelette de xyloses substitués de branchements de résidus D-arabinose permettant la formation d'arabinoxylane. Le mannane se trouve sous plusieurs formes selon s'il est composé uniquement de D-mannose (mannane), de D-mannose et de D-glucose (glucomannane), et si le glucomannane est substitué de résidus D-galactose (galactoglucomannane) (Fig. 19) (Scheller and Ulvskov, 2010). Les polysaccharides pectiques sont de trois types : l'homogalacturonane (HG), le rhamnogalacturonane I (RG-I) et le rhamnogalacturonane II (RG-II). Au niveau structural, l'HG est un polymère linéaire de D-

Tableau II. La modification de différents constituants de la paroi primaire affecte le phénotype des plantes chez Arabidopsis.

Le tableau est une liste non exhaustive de quelques exemples de mutants identifiés chez Arabidopsis et décrits pour l'altération de leur phénotype suite à la mutation/surexpression d'un gène impliqué dans la formation de la paroi primaire.

Constituant pariétal	Enzyme	Lignée	Type	Phénotype développemental	Références
Cellulose	Cellulose synthase	<i>cesa1/rsw1</i>	Mutant ADN-T	Réduction de la teneur en cellulose Réduction de la taille des racines Difformité des cellules épidermiques dans tous les organes	Arioli et al, 1998
	Cellulose synthase	<i>cesa3/cev1/ixr1</i>	Mutant ADN-T	Réduction de la teneur en cellulose Réduction de la taille des racines	Ellis et al, 2002a ; Ellis et al, 2002b
	Cellulose synthase	<i>cesa6/prc1/ixr2</i>	Mutant ADN-T et EMS	Réduction de la teneur en cellulose Augmentation de la teneur en hémicellulose Diminution de la longueur de l'hypocotyle et des racines Défaut de formation de la paroi dans les cellules épidermales et corticales de l'hypocotyle	Fagard et al, 2000
	Cellulose synthase-like	<i>AtclsA9/rat4</i>	Mutant ADN-T	Diminution du nombre et de la taille des racines latérales Léger enrichissement en galactose	Zhu et al, 2003a
	Endo-1,4-β-glucanase	<i>irx2/kor1/rsw2</i>	Mutant ADN-T	Réduction de la teneur en cellulose Réduction de la teneur en rhamnogalacturonane Augmentation de la teneur en homogalacturonane	His et al, 2001
Pectine	Pectate lyase	<i>pmr6</i>	Mutant EMS	Paroi enrichie en pectines Réduction de la taille des rosettes	Vogel et al, 2002
	Arabinofuranosidase	<i>araf1</i>	Mutant ADN-T	Augmentation de la teneur en L-arabinose dans les graines	Chavez-Montez et al, 2008
	Arabinofuranosidase	<i>Pro35S:ARAF1</i>	Surexpression	Diminution de la teneur en L-arabinose dans les graines Augmentation de la teneur en D-xylose dans les racines et les hampes Diminution du nombre de hampes secondaires	Chavez-Montez et al, 2008
Xyloglucanes	Xylosidase	<i>xyl1</i>	Mutant ADN-T	Accumulation de deux oligosaccharides (XXXG et XXLG) Réduction de la longueur des siliques Augmentation de la largeur des siliques	Sampredo et al, 2010
	Xylosyltransferase	<i>xxt1</i>	Mutant ADN-T	Légère réduction de la teneur en xyloglucanes	Cavalier et al, 2008
	Xylosyltransferase	<i>xxt2</i>	Mutant ADN-T	Légère réduction de la teneur en xyloglucanes	Cavalier et al, 2008
		<i>xxt1 xxt2</i>	Double mutant	Absence de xyloglucanes Croissance réduite des plantes	
	Xylosyltransferase	<i>xxt5</i>	Mutant ADN-T	Développement aberrant des poils racinaires Réduction de la taille des poils absorbants Extrusions en forme de bulles à la pointe racinaire	Cavalier et al, 2008 Zabotina et al, 2008

acide galacturonique (GalA). Le RG-I possède un squelette linéaire composé de résidus α -(1,4)-D-GalA et de α -(1,2)-L-rhamnose (Rha). Des chaînes latérales constituées d'arabinane, de galactane ou d'arabinogalactane peuvent être substituées au Rha. Contrairement au RG-I, le RG-II, malgré son nom, ne possède pas de squelette de Rha. Le RG-II est composé de résidus GalA auxquels s'ajoutent des chaînes latérales constituées de différents monosaccharides (D-apiose, D-xylose, L-fucose, L-galactose...) (Fig. 19) (Harholt et al., 2010). Il existe des mutants de structure de la paroi primaire qui nous renseignent sur l'importance de chaque structure pour le développement des plantes, dont une liste non exhaustive est présentée dans le tableau II. Par exemple, la mutation au niveau d'une cellulose synthase (*cesa1*, *cesa3*, *cesa6*), d'une pectate lyase (*pmr6*) ou d'une xylosyltransferase (*xxt1*, *xxt2*, *xxt5*) modifie la composition pariétale et la morphologie des plantes (Tab. II). Enfin, les protéines pariétales, souvent oubliées dans la description de la paroi primaire, sont estimées à environ 500 et constituent une diversité fonctionnelle (8 familles), telle que des enzymes (estérases, lyases), ou des protéines de structure (protéines arabinogalactane, expansines) (Jamet et al., 2008).

La paroi secondaire se forme à l'intérieur de la paroi primaire lors de la différenciation des cellules spécialisées : cellules conductrices de sève (vaisseaux du xylème), tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège). La paroi secondaire est déposée en plusieurs étapes successives, donnant forme à trois couches, appelées S1, S2 et S3, qui se distinguent par l'orientation des microfibrilles de cellulose. Elle est constituée majoritairement de cellulose, d'hémicellulose (xylane) et de lignine, un polymère complexe dont la synthèse dérive de trois monolignols (alcool *p*-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique) (Fig. 20). Ces molécules sont respectivement responsables de la formation d'unités *p*-hydroxyphényl (unités H), guaiacyl (unités G) et syringyl (unités S) (Fig. 20). La composition en unités H, G et S caractérise la paroi secondaire d'un type cellulaire et, à plus grande échelle, permet de différencier les Angiospermes qui possèdent des parois riches en unités S et G, avec seulement des traces d'unités H, alors que chez les Graminées, les unités S sont absentes et les unités H sont présentes en quantités beaucoup plus élevées (Boerjan et al., 2003).

Comme nous venons de le voir, la paroi végétale est un élément clé essentiel pour le développement des plantes et qui détermine, en partie, leur morphologie. Nous allons maintenant nous focaliser sur le rôle de la paroi dans l'interaction des plantes avec les agents pathogènes.

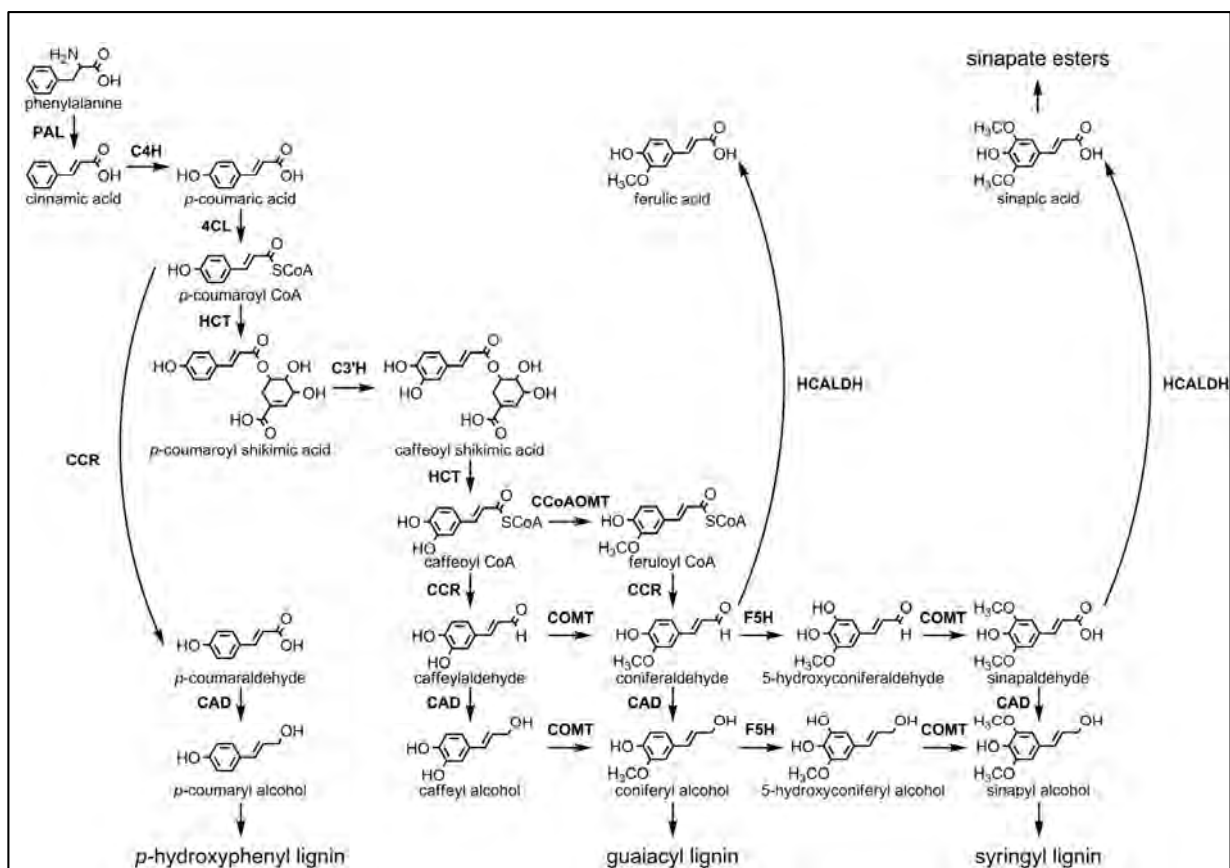


Figure 20. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la lignine (extrait de Weng et al., 2008).

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; 4CL, 4-hydroxy cinnamoyl CoA ligase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase; C3'H, p-coumaroyl shikimate/quinate 3'-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl CoA O-methyl transferase; CCR, (hydroxy) cinnamoyl CoA reductase; HCALDH, hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase; F5H, ferulic acid/coniferaldehyde/coniferyl alcohol 5-hydroxylase; COMT, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase; CAD, (hydroxy) cinnamyl alcohol dehydrogenase.

2. Dégradation des parois végétales par les agents pathogènes

L'arsenal enzymatique pour dégrader les pectines est composé de pectines méthylestérases (PME), de pectines lyases, de pectate lyases (PEL) et de polygalacturonases (PG). Les pectines méthylestérases sont responsables de la déméthylation de l'homogalacturonane, qui devient alors sensible à une action des polygalacturonases et des pectate lyases. Les polygalacturonases hydrolysent la liaison entre les acides galacturoniques présents dans l'homogalacturonane non méthylé. Les pectate et pectines lyases clivent les mêmes liaisons mais chacune a une spécificité de substrat, l'acide polygalacturonique non méthylé et méthylé, respectivement (Lagaert et al., 2009). La capacité à dégrader efficacement les pectines est essentielle dans certains cas pour le pouvoir pathogène. Par exemple, l'absence de l'enzyme PEL (Pectate Lyase) chez un mutant de la bactérie *Pseudomonas viridiflava* provoque une diminution de la virulence chez *Arabidopsis* (Jakob et al., 2007), de même que la mutation du gène *pelB* chez le champignon *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogène sur avocat (Yakoby et al., 2001). Chez *Botrytis cinerea*, la perte de la pectine méthylestérase BcPME1 a pour conséquence une réduction de la macération des pommes lors de l'infection par le champignon (Valette-Collet et al., 2003). Enfin, autre exemple, chez *Claviceps purpurea*, la mutation de deux gènes codant des polygalacturonases, CpPG1 et CpPG2, confère une perte de virulence presque totale du champignon sur le seigle (Oeser et al., 2002). Chez *Xcc*, une analyse du répertoire protéique du génome de la bactérie a révélé une surreprésentation d'un type de protéines de la membrane externe, appelées TonB-dependent transporter (TBDT) (Blanvillain et al., 2007). Alors qu'une dizaine de TBDT sont généralement présents dans le génome des bactéries, *Xcc* en possède 72. De façon intéressante, ces TBDT sont généralement organisés sous la forme de locus, appelés CUT locus (Carbohydrate Utilization containing TBDT locus) qui comprennent un TBDT, un transporteur localisé sur la membrane interne de la bactérie, un régulateur, et une ou plusieurs enzymes de dégradation (Blanvillain et al., 2007). Par exemple, le TBDT XCC0120 est situé à proximité de gènes codant une pectine méthylestérase et une pectate lyase, suggérant un système CUT impliqué dans la dégradation des pectines (Blanvillain et al., 2007). Chez *R. solanacearum*, plusieurs enzymes capables de dégrader les pectines ont été identifiées. Afin de démontrer leur implication dans le pouvoir pathogène de la bactérie, une approche, particulièrement originale, a consisté à créer de multiples combinaisons de mutations afin de générer 15 souches différentes (Liu et al., 2005). La virulence de chacune des souches a été testée sur tomate, suite à une inoculation par arrosage du sol contenant les plantes. La

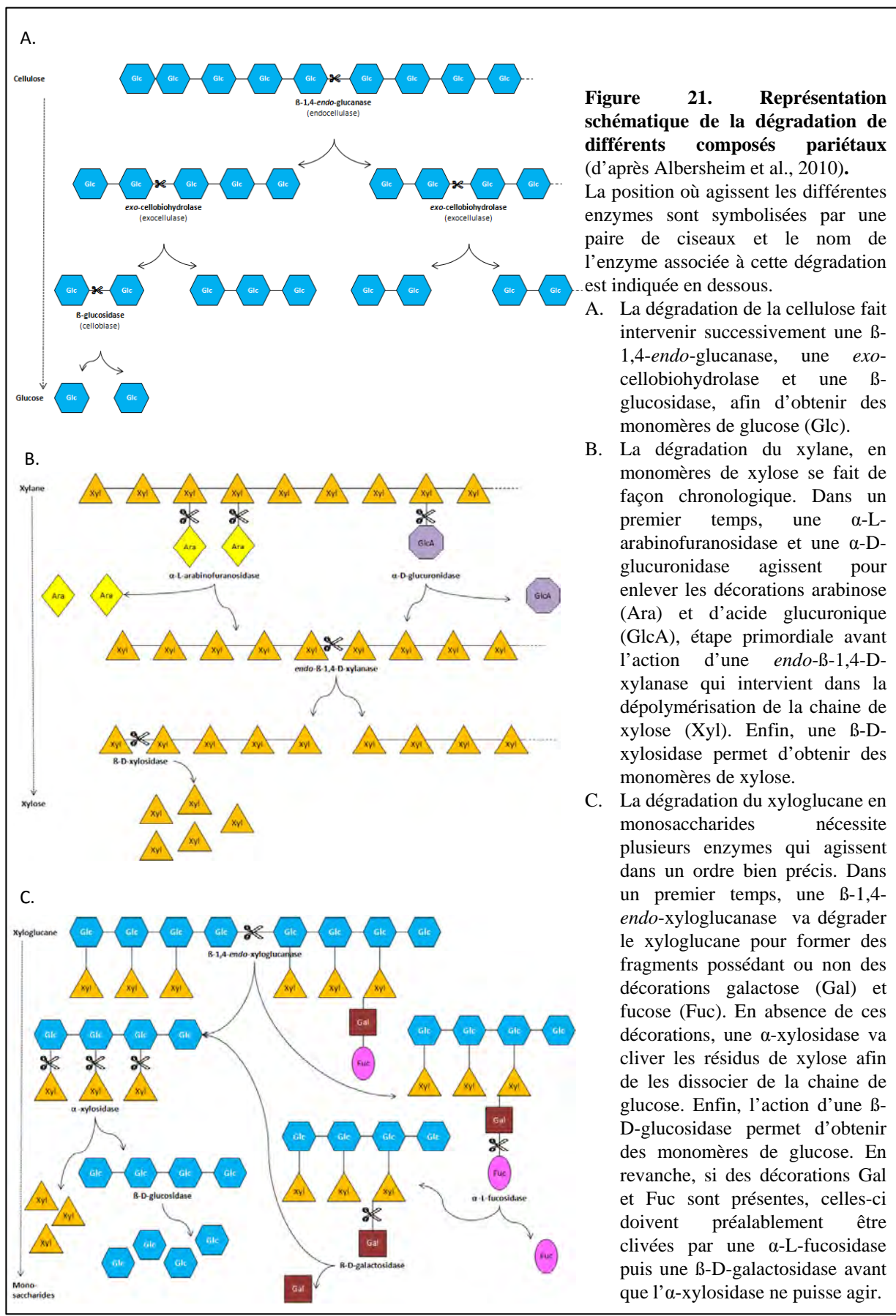


Figure 21. Représentation schématique de la dégradation de différents composés pariétaux (d'après Albersheim et al., 2010).

La position où agissent les différentes enzymes sont symbolisées par une paire de ciseaux et le nom de l'enzyme associée à cette dégradation est indiquée en dessous.

A. La dégradation de la cellulose fait intervenir successivement une β -1,4-*endo*-glucanase, une *exo*-cellobiohydrolase et une β -glucosidase, afin d'obtenir des monomères de glucose (Glc).

B. La dégradation du xylane, en monomères de xylose se fait de façon chronologique. Dans un premier temps, une α -L-arabinofuranosidase et une α -D-glucuronidase agissent pour enlever les décorations arabinose (Ara) et d'acide glucuronique (GlcA), étape primordiale avant l'action d'une *endo*- β -1,4-D-xylanase qui intervient dans la dépolymérisation de la chaîne de xylose (Xyl). Enfin, une β -D-xylosidase permet d'obtenir des monomères de xylose.

C. La dégradation du xyloglucane en monosaccharides nécessite plusieurs enzymes qui agissent dans un ordre bien précis. Dans un premier temps, une β -1,4-*endo*-xyloglucanase va dégrader le xyloglucane pour former des fragments possédant ou non des décorations galactose (Gal) et fucose (Fuc). En absence de ces décorations, une α -xylosidase va cliver les résidus de xylose afin de les dissocier de la chaîne de glucose. Enfin, l'action d'une β -D-glucosidase permet d'obtenir des monomères de glucose. En revanche, si des décorations Gal et Fuc sont présentes, celles-ci doivent préalablement être clivées par une α -L-fucosidase puis une β -D-galactosidase avant que l' α -xylosidase ne puisse agir.

mutation individuelle ou groupée des enzymes pectiques (PehA, PehB, PehC et Pme) ne modifie pas la virulence de la bactérie (Liu et al., 2005).

Les enzymes responsables de la dégradation des pectines affaiblissent la paroi végétale et exposent les autres polymères à une dégradation par des cellulases et des hémicellulases. La cellulose est dégradée en trois étapes, faisant intervenir successivement une endoglucanase (endocellulase), une exocellobiohydrolase (exocellulase) et une glucosidase (cellobiase) (Fig. 21) (Albersheim et al., 2010). Chez les dicotylédones, l'hémicellulose majoritaire est le xyloglucane. Ce polysaccharide peut être dégradé seulement par certaines endoglucanases (EG), dites spécifiques du xyloglucane (XEG). La dégradation du xyloglucane débute avec une endoxyloglucanase qui le coupe en deux fragments portant ou non des décorations de galactose (Gal) et de fucose (Fuc) (Fig. 21). Si c'est le cas, chaque résidu Fuc puis Gal est dégradé par une fucosidase et une galactosidase. C'est seulement sur un polymère formé de glucose et de xylose que peut agir une xylosidase qui va couper les liaisons entre ces deux sucres pour donner des monomères de xylose et une chaîne de glucose. Pour finir, une glucosidase va permettre l'obtention de monomères de glucose (Fig. 21) (Albersheim et al., 2010). La capacité à dégrader une autre hémicellulose, le xylane, peut également influencer également le pouvoir pathogène. Chez *Botrytis cinerea*, la mutation *xyn11A* affecte une endo- β -1,4-xylanase et diminue la capacité du champignon à induire des lésions de macération sur feuilles de tomate et baies de raisin (Brito et al., 2006). Chez *Xcc*, les TBDT XCC2828 et XCC4120 sont présents dans des groupes de gènes impliqués dans le métabolisme du xylose/xylane (Blanvillain et al., 2007). Chez *R. solanacearum*, les souches mutées pour une ou les deux enzymes cellulolytique (Egl, CbhA) sont moins virulentes (Liu et al., 2005).

3. Approche génétique : mutants de paroi et réponse aux agents pathogènes

Si la capacité des agents pathogènes à dégrader la paroi végétale joue un rôle dans l'issue des interactions, la nature et les propriétés physico-chimiques de la paroi végétale sont également des facteurs clé. En effet, des approches de génétique directe qui s'appuient sur le criblage de collections de mutants d'*Arabidopsis* ayant un comportement altéré vis-à-vis de différents agents pathogènes ont permis de mettre à la lumière l'importance de la structure de la paroi dans les réponses immunitaires (Tab. III).

Un des criblages a visé à identifier des mutants résistants au champignon *Erysiphe cichoracearum*, responsable du milidou, appelés *pmr* (*powdery mildew resistant*) (Vogel and

Tableau III. La modification de différents constituants pariétaux affecte la réponse des plantes vis-à-vis d'agents pathogènes.

Le phénotype "résistance" ou "sensibilité" correspond à une résistance/sensibilité accrue chez les lignées transformées (mutants, surexprimeurs, ARNi) par rapport aux plantes sauvages auxquelles elles sont comparées. Lorsque des mécanismes impliqués dans le phénotype observé ont été identifiés ou exclus, ils sont précisés dans le tableau.

Type de paroi	Constituant pariétal	Enzyme	Lignée	Type	Espèce	Phénotype	Agent pathogène	Mécanismes impliqués	Références
Paroi primaire	Callose	Callose synthase	<i>pmr4</i>	mutant EMS	Arabidopsis	Résistance	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	dépendants du SA	Nishimura et al, 2003
	Cellulose	Cellulose synthase-like	<i>rat4/AtclsA9</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Résistance	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		Zhu et al, 2003b
	Cellulose	Cellulose synthase	<i>cev1/ixr1/cesa3</i>	mutant EMS	Arabidopsis	Résistance	<i>E. cichoracearum</i> , <i>E. orontii</i> , <i>O. lycopersicum</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	dépendants ET-JA	Ellis & Turner, 2001; Ellis et al, 2002a; Ellis et al, 2002b
	Cellulose	Endo-β-1,4-glucanase	<i>cell1, cel2</i>	mutant	Tomate	Résistance	<i>Botrytis cinerea</i>		Flors et al, 2008
	Pectine	Pectate lyase	<i>pmr6</i>	mutant EMS	Arabidopsis	Résistance	<i>E. cichoracearum</i>	indépendants ET-JA-SA	Vogel et al, 2002
	Protéine de structure	Arabinogalactan protein	<i>rat1</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Résistance	<i>A. tumefaciens</i>	dépendants du SA	Zhu et al, 2003a; Gaspar et al, 2003
	Protéine de structure	Extansine	<i>oeEXT1</i>	surexpression	Arabidopsis	Résistance	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>		Wei et al, 2006
Paroi secondaire	Cellulose	Cellulose synthase	<i>ern1/ixr1-6/cesa8</i>	mutant EMS	Arabidopsis	Résistance	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	dépendants de l'ABA	Hernandez-Blanco et al, 2007
	Cellulose	Cellulose synthase	<i>nws2/ixs5-5/cesa4</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Résistance	<i>R. solanacearum</i> , <i>P. cucumerina</i>	dépendants de l'ABA	Hernandez-Blanco et al, 2007
	Lignine	caffeate O-méthyltransferase	<i>comt1</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Sensibilité	<i>B. cinerea</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>		Quentin et al, 2009
	Lignine	caffeate O-méthyltransferase	<i>comt1</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Résistance	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	indépendants SA-JA	Quentin et al, 2009
	Lignine	caffeate O-méthyltransferase	<i>comt</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	caffeate O-méthyltransferase et cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>comt cad</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	caffeoyle-CoA O-méthyltransferase	<i>cocoaomt</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	cinnamoyl-CoA reductase	<i>ccr</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	cinnamoyl-CoA reductase	<i>sln6</i>	ARNi	Riz	Sensibilité	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		Bart et al, 2010
	Lignine	cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>cad-d</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Sensibilité	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>		Tronchet et al, 2010
	Lignine	cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>cad-c cad-d</i>	mutant ADN-T	Arabidopsis	Sensibilité	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>		Tronchet et al, 2010
	Lignine	cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>cad</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	ferulic acid hydroxylase	<i>f5h</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009
	Lignine	hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase	<i>hct</i>	ARNi	Luzerne	Résistance	<i>Colletotrichum trifolii</i>	dépendant SA-JA	Gallego-Giraldo et al, 2011
	Lignine	phenylalanine ammonia lyase	<i>pal</i>	ARNi	Blé	Sensibilité	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Bhuiyan et al, 2009

Somerville, 2000). Parmi les mutants *pmr*, plusieurs sont altérés au niveau de la paroi. C'est le cas de *pmr4*, muté dans un gène codant une callose synthase et dont la résistance dépend de l'acide salicylique (Nishimura et al., 2003). La mutation dans un gène codant une pectate lyase chez *pmr6* confère une résistance dont les mécanismes sont indépendants des voies ET-JA-SA (Vogel et al., 2002). Un autre exemple est le crible de mutants *rat* (*resistant to Agrobacterium tumefaciens*) (Zhu et al., 2003b). Parmi eux, *rat1*, dont la résistance dépend du SA, est altéré au niveau d'un gène codant une protéine arabinogalactane, alors que *rat4*, dont les mécanismes de résistance ne sont pas connus, est déficient en une cellulose synthase-like (CSLA9) (Zhu et al., 2003a; Zhu et al., 2003b). Par ailleurs, dans une autre étude, le mutant *cev1* (*constitutive expression of VSP1*) a été identifié sur la base de son expression constitutive de *VSP1* (*Vegetative Storage Protein 1*) (Ellis and Turner, 2001). Par la suite, les auteurs ont pu associer *CEVI* à *CESA3*, un gène codant une cellulose synthase (CESA) de la paroi primaire, constituant un lien entre l'altération de la paroi végétale et la réponse immunitaire (Ellis et al., 2002b). Le mutant *cev1* est résistant à différents agents pathogènes (*E. cichoracearum*, *E. orontii*, *Oidium lycopersicum* et *P. syringae* pv. *maculicola*), une caractéristique due à une activation constitutive des voies de signalisation ET-JA (Ellis and Turner, 2001; Ellis et al., 2002a). L'ensemble de ces résultats démontre que la structure de la paroi primaire est importante pour l'interaction entre la plante et les agents pathogènes.

Plusieurs travaux ont montré que l'altération de la structure et la composition de la paroi secondaire modifient la réponse des plantes aux agents pathogènes (Tab. III). Chez *Arabidopsis*, deux cribles indépendants ont été menés afin d'identifier soit des mutants *nws* (*no wilt symptom*) résistants à la bactérie *Ralstonia solanacearum*, soit des mutants *ern* (*enhanced resistance to necrotrophs*) résistants au champignon *Plectosphaerella cucumerina* (Hernandez-Blanco et al., 2007). Ces travaux ont permis de démontrer l'importance de cellulose synthases de la paroi secondaire dans la réponse aux agents pathogènes (Hernandez-Blanco et al., 2007). En effet, *nws2* et *ern1* sont mutés dans les gènes codant CESA4/IRX5 et CESA8/IRX1, respectivement. Les mutants *nws2* et *ern1* ont donc été renommés *irx5-5* (*irregular xylem 5-5*) et *irx1-6*. Chez ces mutants, la perte de fonction des deux CESA résulte en l'activation de nouvelles voies de défense, incluant l'acide abscissique, ce qui contribue à la formation d'un environnement enrichi en composés antimicrobiens hostiles aux agents pathogènes (Hernandez-Blanco et al., 2007).

La lignification, connue comme une réponse à certains agents pathogènes, se forme autour des lésions de HR. La disponibilité de mutants pour l'ensemble de la voie de biosynthèse de la lignine (Fig. 20) offre la possibilité de déterminer l'importance de la teneur et la composition des lignines dans les interactions entre plantes et agents pathogènes.

Chez *Arabidopsis*, la mutation dans un gène codant COMT (caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase), provoque une sensibilité accrue à plusieurs agents pathogènes tels que les champignons *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ou encore les bactéries *X. campestris* pv. *campestris* et *P. syringae* pv. *tomato* (Quentin et al., 2009). Lorsqu'une autre étape de la synthèse de lignine, catalysée par les enzymes CAD-C et CAD-D (cinnamyl alcohol dehydrogenase C et D) est mutée, la sensibilité à *P. syringae* pv. *tomato* s'en trouve modifiée (Tronchet et al., 2010). En effet, alors que le simple mutant *cad-c* présente une sensibilité comparable à une plante sauvage après inoculation avec une souche virulente de la bactérie (DC3000), le simple mutant *cad-d* et le double mutant *cad-c cad-d* sont quant à eux plus sensibles. Dans le cas d'une inoculation avec une souche avirulente (DC3000AvrPphB), seul le double mutant présente une hypersensibilité à la bactérie. Les protéines CAD-C et CAD-D sont donc importantes pour les réponses immunitaires et les auteurs proposent qu'elles interviennent dans la synthèse de lignine en réponse aux agents pathogènes (Tronchet et al., 2010).

Outre la plante modèle *Arabidopsis*, des travaux visant à mieux comprendre le rôle des lignines dans la réponse aux agents pathogènes ont été réalisés sur des espèces végétales d'intérêt agronomique, comme le blé (Bhuiyan et al., 2009), le riz (Bart et al., 2010) et la luzerne (Gallego-Giraldo et al., 2011). Chez le blé (*Triticum monococcum*), plusieurs gènes de synthèse de lignine (*PAL*, *CCR*, *CCoAOMT*, *F5H*, *COMT*, *CAD*) sont induits en réponse à une attaque par le champignon *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) et les lignées pour lesquels ces gènes ont été inactivés par ARNi deviennent plus sensibles à *Bgt* (Bhuiyan et al., 2009). De façon intéressante, une co-inactivation des gènes *COMT* et *CAD* rend la lignée transgénique sensible à la pénétration de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, un champignon initialement non adapté au blé (Bhuiyan et al., 2009). Chez le riz, une recherche de suppresseurs de la formation de lésions dépendantes de NH1 (NPR1 Homolog 1) a permis d'identifier *SLN6* (*Suppressor of BTH-induced, NHI-mediated Lesion mimic 6*), un gène codant une CCR (Cinnamoyl CoA-Reductase), comme un élément essentiel pour la résistance à la bactérie *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Bart et al., 2010). Cela a été révélé en comparant une lignée surexprimant *NHI* et cette même lignée contenant en plus la mutation *sln6*. Dans le premier cas, les plantes présentent une résistance accrue à *Xoo*, une expression constitutive de

gènes de défense de la famille PR-10 et une formation accrue de symptômes de mort cellulaire suite à un traitement avec du benzothiadiazole (BTH), un composé chimique actif analogue au SA capable d'induire la SAR. L'introduction de la mutation *sln6* dans la lignée surexprimant *NHI* supprime ces phénotypes, ce qui démontre le rôle de régulateur positif de SLN6 dans la résistance à *Xoo* chez le riz (Bart et al., 2010). Enfin, chez la luzerne, une lignée antisens pour *HCT* (*hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase*) a été récemment décrite (Gallego-Giraldo et al., 2011). Cette lignée se caractérise non seulement par une diminution de la teneur en lignine, mais aussi par une diminution de la sensibilité des plantes au champignon *Colletotrichum trifolii*. Ceci s'explique par l'accumulation de SA et de JA, en absence d'agent pathogène, ainsi que par une induction de gènes de défenses associés à ces voies (*PR-1*, *PR-4*, *PR-5*, *PR-10*) (Gallego-Giraldo et al., 2011). Même si la tendance semble indiquer qu'une diminution de la teneur en lignines résulte en une augmentation de la sensibilité, l'ensemble de ces résultats ne permet pas d'établir un lien clair entre la qualité/quantité de lignines et la réponse aux agents pathogènes.

Comme nous venons de le voir, la composition de la paroi végétale est un élément clé pour l'issue des interactions plantes – microorganismes pathogènes. La découverte des mutants irx5-5 et irx1-6, résistants à R. solanacearum, décrit l'importance de la paroi secondaire dans le pathosystème entre Arabidopsis et la bactérie (Hernandez-Blanco et al., 2007). Ces résultats sont à l'origine de la définition de mon projet de thèse, décrit dans la partie 4 de cette introduction.

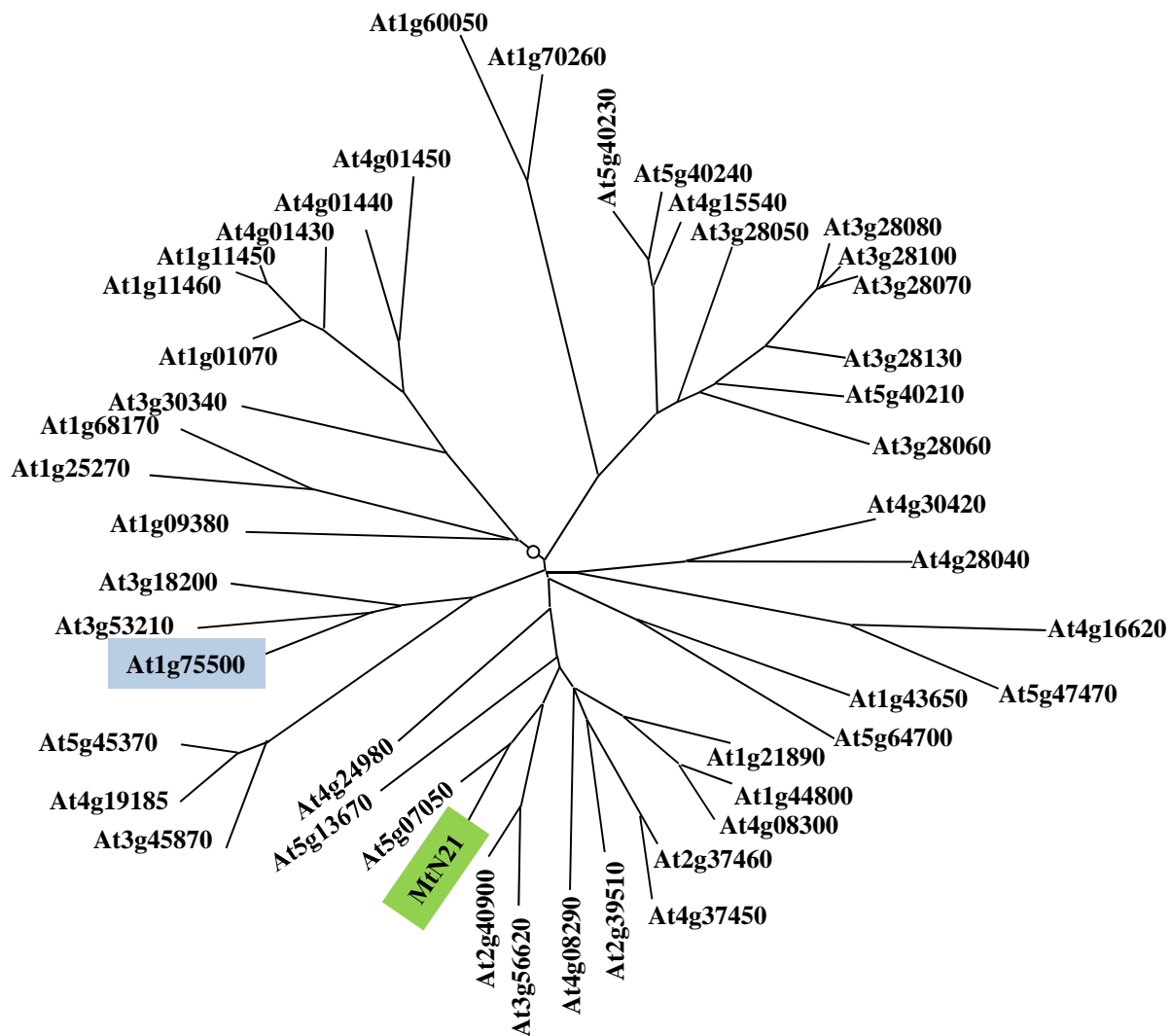


Figure 22. Phylogénie des protéines de la famille NODULIN 21 chez Arabidopsis (Deborah Goffner, communication personnelle).

L'arbre phylogénétique a été obtenu à partir des séquences protéiques des 46 membres de la famille chez Arabidopsis. Le numéro des gènes codant ces protéines est indiqué sur l'arbre. La séquence de la protéine MtN21 de Medicago décrite par Gamas et ses collaborateurs (1996) a été ajoutée et indiquée en vert. La protéine WAT1, codée par le gène At1g75500 est indiquée en bleu.

INTRODUCTION - PARTIE 4 :

CONTEXTE BIOLOGIQUE ET OBJECTIFS

DU TRAVAIL DE THESE

1. Objet d'étude : le mutant *wat1* (*walls are thin 1*)

Mon équipe d'accueil "Différentiation du xylème", dirigée par Deborah Goffner, s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués dans la xylogénèse et la formation de la paroi secondaire. Dans une étude antérieure, en s'appuyant sur un modèle de xylogénèse *in vitro* chez *Zinnia* (*Zinnia elegans*), l'équipe a identifié des centaines de gènes induits lors de la mise en place de la paroi secondaire (Pesquet et al., 2005). Les orthologues d'*Arabidopsis* ainsi que les mutants insertionnels (ADN-T) correspondants ont été obtenus, ce qui permet à l'équipe de disposer d'un panel d'environ 70 mutants homozygotes.

Parmi ces gènes, *WAT1* (At1g75500) a fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle approfondie (Ranocha et al., 2010). *WAT1* appartient à une famille multigénique de 46 membres, appelée *Nodulin21* (Fig. 22). Le nom attribué à cette famille vient de leur homologie avec le gène *MtN21*, une noduline décrite comme étant induite chez *Medicago truncatula* lors de la formation du nodule lors de l'établissement d'une symbiose avec la bactérie *Rhizobium* (Gamas et al., 1996). Ces protéines appartiennent à la famille des Plant-Drug/Metabolite Exporter (P-DME, classification 2.A.7.3), elle-même incluse dans la superfamille des Drug/Metabolite transporter (DMT) selon la base de données sur la classification des transporteurs, établie selon la structure des protéines (Transport Classification DataBase –TCDB, <http://www.tcdb.org>) (Jack et al., 2001). Au niveau structural, les protéines prédites par les séquences de cette famille possèdent un double domaine DUF6 (Domain of Unknown Function 6), arrangé en 10 domaines transmembranaires.

Il est intéressant de noter que chez les bactéries, plusieurs de ces protéines à double DUF6 ont été caractérisées. C'est le cas de la protéine YdeD d'*E. coli*, capable d'exporter la cystéine, l'asparagine et la glutamine (Franke et al., 2003) et RhtA qui exporte quant à elle la thréonine et l'homosérine (Livshits et al., 2003). Ces études démontrent un rôle dans le transport d'acides aminés pour les protéines de la famille de DME chez les bactéries.

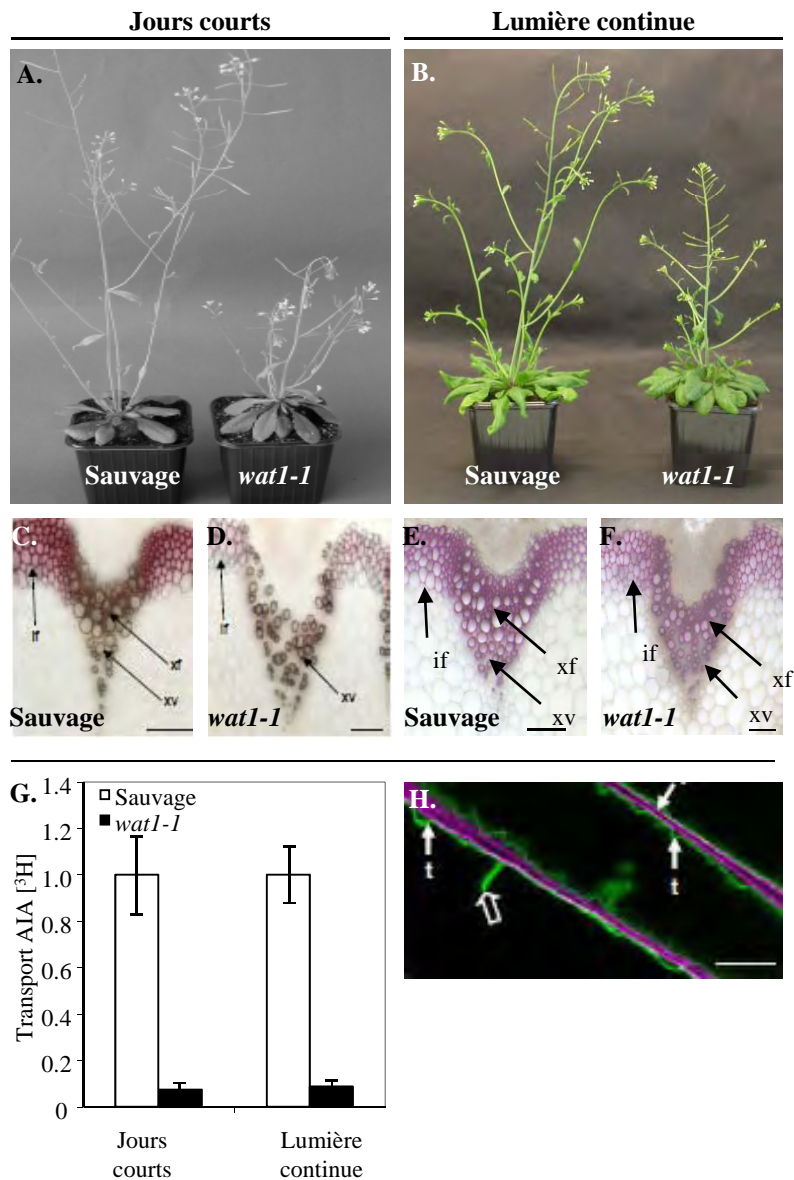


Figure 23. Caractéristiques du mutant *wat1-1* au cours du développement (d'après Ranocha et al., 2010 ; Denancé, Ranocha et al., 2010).

A et B. Plantes sauvages et mutant *wat1-1* après deux mois de culture en jours courts (A) ou en lumière continue (B).

C et D. Coupe transversale colorées au réactif de Maïle de la partie basale d'une hampe d'une plante sauvage (C) et du mutant *wat1-1* (D) ayant été cultivées en jours courts. Barre = 20 µm.

E et F. Coupe transversale colorées au phloroglucinol de la partie basale d'une hampe d'une plante sauvage (E) et du mutant *wat1-1* (F) ayant été cultivées en lumière continue. Barre = 20 µm.

G. Mesure du transport basipète d'auxine (IAA) dans les portions basales de hampes de 20cm de plantes sauvages ou du mutant *wat1-1* ayant été cultivés en jours courts ou en lumière continue. Les résultats sont présentés sous forme de ratios du transport d'AIA (cpm), avec la valeur 1 attribuée arbitrairement aux plantes sauvages.

H. Localisation subcellulaire de la protéine WAT1 au niveau du tonoplaste. Image observée par microscopie confocale dans des cellules épidermiques de racines d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant une fusion WAT1-GFP. La fluorescence du FM4-64, un marqueur de la membrane plasmique est montrée en magenta et la fluorescence de la GFP est présentée en vert. Flèche vide, membrane transvacuolaire; t = tonoplaste. Barre = 10 µm.

L'étude du gène *WAT1* menée dans l'équipe de Deborah Goffner constitue la première caractérisation fonctionnelle d'un membre de la famille Nodulin 21 d'*Arabidopsis* (Ranocha et al., 2010). *WAT1* est un gène spécifique du règne végétal puisque des orthologues existent chez des espèces telles que le peuplier, le maïs, le riz ou la mousse, mais pas chez les animaux. En exploitant des lignées transgéniques *ProWAT1:GUS*, nous avons pu montrer que l'activité GUS est localisée préférentiellement dans les tissus vasculaires que ce soit dans le xylème en développement ou dans le phloème dans les hampes, mais également dans les feuilles et les racines. L'utilisation de lignées transgéniques *Pro35S:WAT1-GFP* a permis de localiser la protéine spécifiquement au niveau du tonoplaste (Fig. 23) (Ranocha et al., 2010).

La mutation *wat1* s'accompagne d'une réduction de la taille des hampes, mais le phénotype le plus spectaculaire est la réduction de l'épaisseur de la paroi secondaire spécifiquement dans les fibres et non dans les vaisseaux. Ces phénotypes sont accompagnés par des altérations dans l'homéostasie de l'auxine puisque la base des hampes en contient moins et que le transport basipète d'auxine y est fortement réduit lorsque les plantes sont cultivées en jours courts (Fig. 23). De plus, *wat1* présente une sensibilité accrue au 5-méthyltryptophane, un analogue toxique du tryptophane (Ranocha et al., 2010). Par la suite, il a été prouvé dans l'équipe que l'épaisseur de la paroi secondaire et la taille des hampes étaient partiellement restaurées à un niveau sauvage lorsque les plantes sont cultivées en lumière continue, et ce, de façon indépendante de l'auxine. En effet, dans ces conditions de culture, la teneur et le transport d'auxine radiomarquée sont toujours très réduits chez *wat1* (Fig. 23) (Denancé, Ranocha et al., 2010).

Enfin, plus récemment, il a été montré dans l'équipe de Deborah Goffner par expression hétérologue dans la levure et, en collaboration avec Jean-Baptiste Thibault (Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes, B&PMP, Montpellier), dans les œufs de xénope, que *WAT1* définit vraisemblablement une nouvelle classe transporteur d'auxine chez les végétaux (Ranocha et al, données non publiées).

De manière quasi concomitante, Yves Marco, Directeur de Recherches au LIPM (Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes) au sein de notre IFR40, a identifié par criblage d'une collection de mutants d'*Arabidopsis*, un mutant résistant à *Ralstonia solanacearum*. Un clonage positionnel a permis d'identifier le gène muté. Il s'agit d'*IRX5/CESA4*, une cellulose synthase spécifique de la paroi secondaire (Hernandez-Blanco et al., 2007). Cette découverte a été le point de départ d'une collaboration entre notre équipe et celle d'Yves Marco, à travers le projet INRA SPE "Paroi végétale et Sensibilité". Dans ce projet, la collection de mutants de parois obtenus dans l'équipe via l'approche Zinnia (et

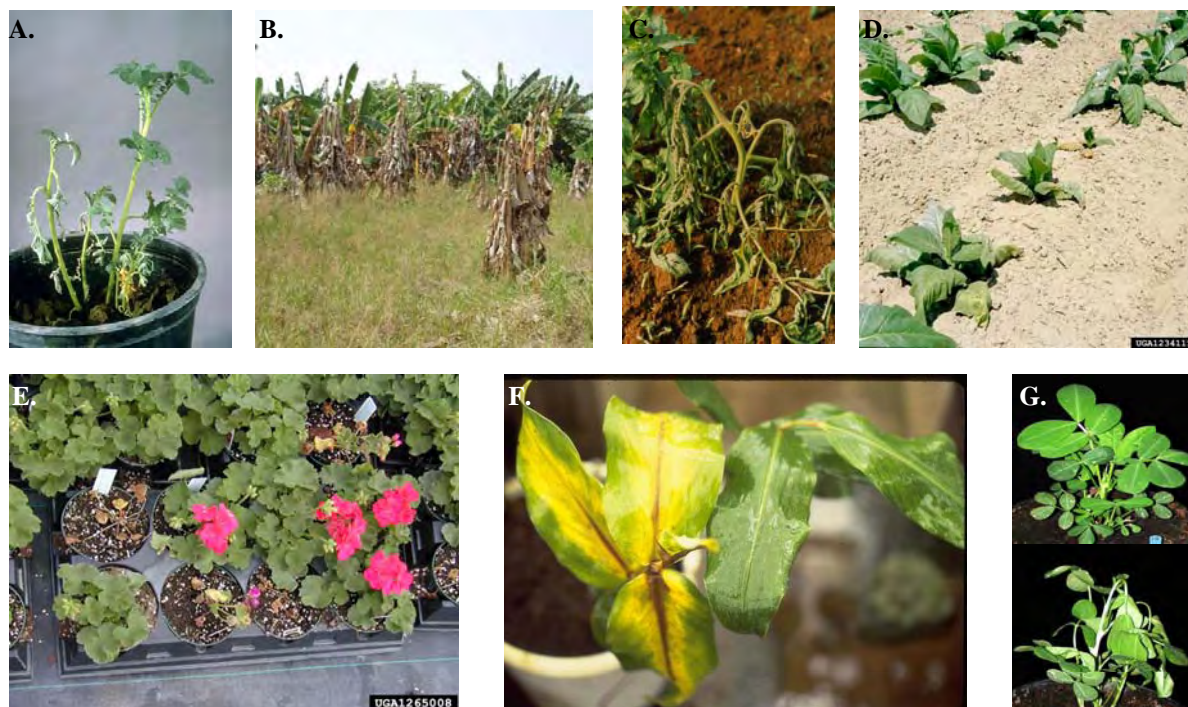


Figure 24. Diversité des plantes hôtes de *R. solanacearum*.

- A. Pomme de terre.
- B. Bananier.
- C. Tomate.
- D. Tabac.
- E. Pélargonium.
- F. Gingembre.
- G. Arachide.

(Source: les photographies A à E sont consultables sur le site www.ipmimages.org; la photographie F est consultable sur le site www.hear.org; la photographie G appartient à Stéphane Genin (LIPM)).

mentionnée précédemment) a été inoculée avec *R. solanacearum*, afin d'identifier des individus dont la réponse à cette bactérie était altérée. **Des résultats préliminaires obtenus par Yves Marco ont suggéré que le mutant *wat1* présentait une perte de sensibilité à *R. solanacearum*. Ces résultats ont constitué la base du projet ANR “Walltalk” qui m’a permis de bénéficier d’une bourse de thèse. Avant de définir mes objectifs de thèse, je souhaite décrire la biologie de la bactérie et le pathosystème *Arabidopsis* – *R. solanacearum* qui a fait l’objet d’étude de mon projet de thèse.**

2. *Ralstonia solanacearum* – *Arabidopsis*, notre système d’étude

2.1 Description de la bactérie

Ralstonia solanacearum est une β -protéobactérie d’origine tellurique capable d’infecter plus de 200 espèces végétales, parmi lesquelles des cultures d’intérêt économique chez les Solanacées (tomate, pomme de terre, tabac, aubergine, poivron), des monocotylédones (bananier, gingembre), certaines légumineuses (arachide, haricot), des plantes ornementales (pélargonium, géranium, pétunia) et quelques ligneux (eucalyptus, mûrier, olivier) (Fig. 24) (Hayward, 1991). Les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* sont également hôtes de la bactérie, ce qui permet de disposer plus facilement d’outils génétiques et moléculaires pour étudier la relation entre la bactérie et ces deux espèces (Deslandes et al., 1998; Vaillau et al., 2007). Ce très large panel de plantes hôtes font de *R. solanacearum* une des bactéries phytopathogènes les plus dévastatrices. *R. solanacearum* est particulièrement bien adaptée au climat tropical. Dans les années 1990, la bactérie a été détectée pour la première fois en Europe (Janse, 1996). Afin d’éviter au maximum toute dissémination intempestive, *R. solanacearum* a été classée sur la liste des organismes de quarantaine en Europe, ainsi que comme agent pathogène pouvant être utilisé pour un acte de bioterrorisme aux Etats-Unis (Lambert, 2002). Il existe deux types de classification de la bactérie. La première est basée sur le spectre d’hôtes et permet de différencier 5 races (pathotypes). La seconde est basée sur la variabilité des génomes et permet de différencier 4 divisions (phylotypes) : Asia (phyl. I), Americana (phyl. II.A et II.B), Africa (phyl. III) et Indonesia (phyl. IV). Le génome de la souche GMI1000 (phylotype I), isolée sur tomate en Guyane Française (Boucher et al., 1985), a été le premier séquencé (Salanoubat et al., 2002). Depuis, les génomes d’autres souches ont été séquencés et leur annotation est actuellement en cours. Il

Tableau IV. Caractéristiques générales des génomes des 6 souches de *Ralstonia solanacearum* séquencées (d'après Remenant et al., 2010).

Le phylotype (Phyl.) auquel appartient la souche est précisé, de même que l'origine géographique où a été isolée la souche. Concernant, les génomes, sa taille (en paires de bases) et le pourcentage de bases G et C sont également indiquées. Pour ces deux caractéristiques, la moyenne a été calculée à partir des données des 6 souches du tableau.

Souche	Phyl.	Origine	Taille (pb)	%GC
CFBP2957	II.A	Antilles Françaises	5 683 402	66,90%
CMR15	III	Cameroun	5 593 041	66,90%
PSI07	IV	Indonésie	5 606 288	66,30%
GMI1000	I	Guyane Française	5 810 922	67,00%
IPO1609	II.B	Pays-Bas	5 523 292	66,70%
Molk2	II.B	Indonésie	5 862 101	66,70%
		Moyenne	5 679 841	66,70%

s'agit de la souche IPO1609 (UW551) isolée sur pomme de terre aux Pays-Bas (phylotype II.B), de la souche Molk2 isolée sur banane aux Philippines (phylotype II.A) et plus récemment des souches CFBP2957 (phylotype II.A), CMR15 (phylotype III) et PSI07 (phylotype IV), toutes isolées sur tomate, respectivement aux Antilles Françaises, au Cameroun et en Indonésie (Remenant et al., 2010). Toutes ces souches sont composées d'un chromosome d'environ 3,6Mb et d'un mégaplasmide d'environ 2,1Mb, soit un génome complet d'une taille moyenne de 5,7Mb (Tableau IV). La comparaison des différents génomes a permis d'évaluer le "pan-genome" de *Ralstonia solanacearum*, c'est-à-dire l'ensemble des gènes présents dans les différentes souches. Le "pan-genome" comprend 9083 gènes, dont 2543 constituent le génome de base ou "core-genome" (gènes présents systématiquement dans toutes les souches), 3538 font partie du "dispensable-genome" (gènes présents dans plusieurs souches mais pas toutes) et 391 à 640 gènes forment le "specific genome" (gènes présents dans une seule souche uniquement) (Remenant et al., 2010).

2.2 Cycle de vie de la bactérie

L'infection se produit lorsque *Ralstonia solanacearum*, vivant à l'état saprophyte dans le sol, pénètre dans sa plante hôte par le système racinaire pour ensuite traverser l'endoderme et coloniser les vaisseaux du xylème. Le processus d'infection des racines a été décrit chez la tomate (Vasse et al., 1995), le pétunia (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006) et Medicago (Turner et al., 2009). Chez la tomate, les extrémités racinaires et les espaces intercellulaires du cortex au niveau des points d'émergence des racines secondaires sont très rapidement colonisés, entre 1 et 3 jours après infection (dpi) (Vasse et al., 1995). L'envahissement de la stèle et l'invasion du xylème sont observés dès 3dpi (Vasse et al., 1995). Chez le pétunia, suite à une inoculation par immersion du système racinaire des plantules dans une solution bactérienne de la souche GMI1000, un gonflement de la pointe racinaire est visible, ainsi qu'une réduction de l'élongation des racines primaires et secondaires et l'inhibition du développement de nouvelles racines latérales (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). En outre, de nombreuses petites "boursouflures" régulièrement espacées apparaissent sur la racine principale et les racines latérales allongées de plantules infectées. Ces différents phénotypes sont observés à la fois dans des lignées sensibles et résistantes, indiquant que les mécanismes de résistance ne sont pas liés à ces modifications structurales (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). Les "boursouflures" correspondent à des structures de racines latérales

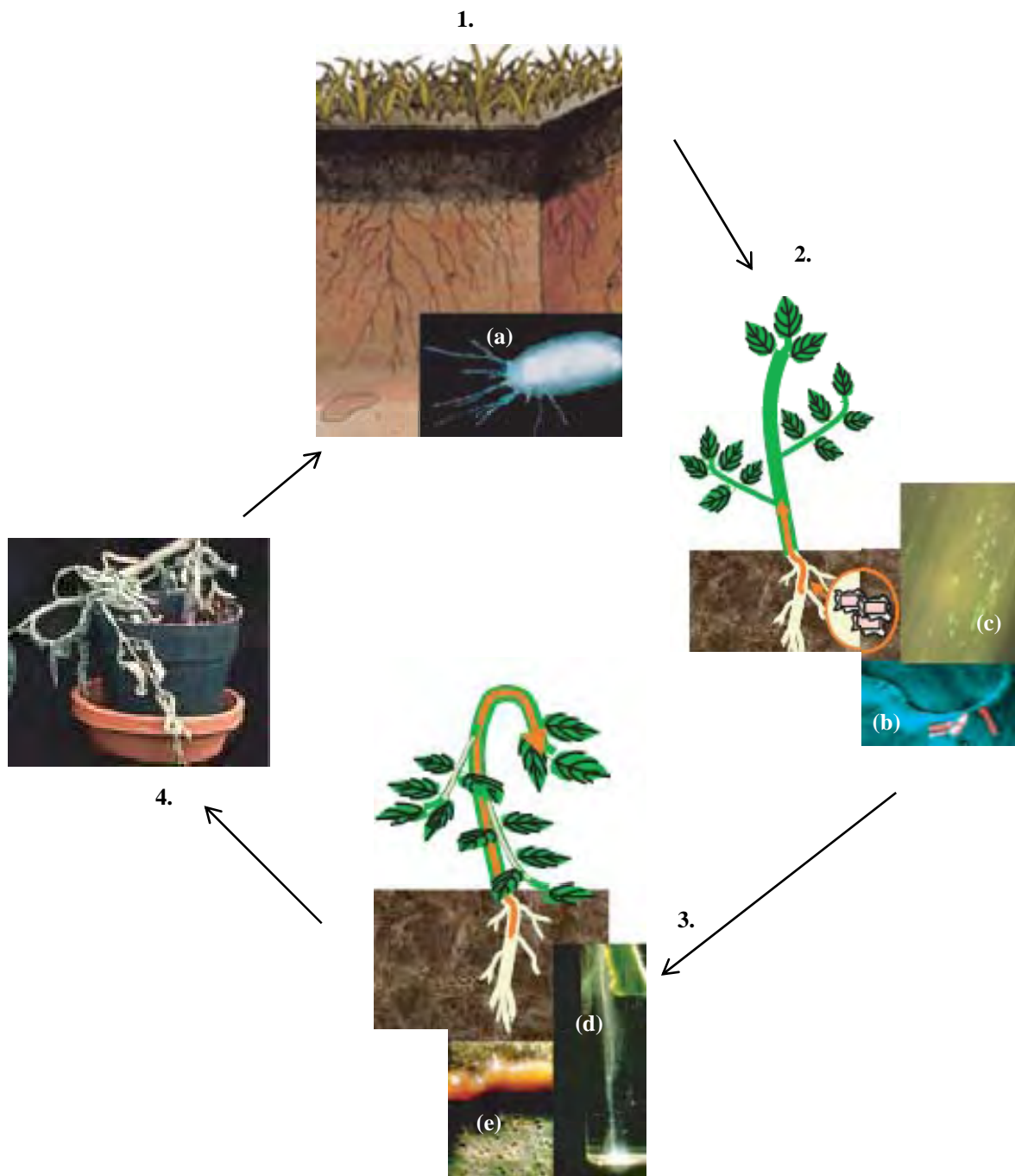


Figure 25. Cycle infectieux de *R. solanacearum* (d'après Genin, 2010).

1. Vie saprophyte/survie dans le sol. (a), observation au microscope électronique à transmission de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.
2. Les bactéries peuvent pénétrer dans les racines à la faveur de blessures, par la pointe racinaire ou au niveau de l'émergence des racines secondaires. Une fois entrées dans les tissus racinaires, les bactéries progressent à travers le cortex pour coloniser les vaisseaux. (b), observation au microscope confocal de bactéries (en rouge) attachées à la surface d'une cellule végétale et (c), bactéries exprimant la GFP (vert) visualisées à la surface d'une racine de tomate.
3. Progression des bactéries de façon systémique dans toute la plante et apparition des symptômes de flétrissement. (d), suintement de bactéries dans l'eau à partir d'une tige infectée de tomate et (e), suintement d'exopolysaccharides à partir des vaisseaux d'une tige coupée de façon transversale.
4. Mort de la plante et retour des bactéries dans le sol où elles pourront survivre et se disséminer via des environnements aqueux (effluents, cours d'eaux).

(RLS, root lateral structures) et leur formation est dépendante du système de sécrétion de type III de la bactérie, puisque l'infection avec une souche avirulente sans T3SS n'est pas capable d'induire la formation de RLS (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). Cependant, les RLS ne sont pas nécessaires à la colonisation du système vasculaire puisque celle-ci intervient dès 3dpi, alors qu'à ce stade, les RLS sont en cours de formation (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006). Chez *Medicago*, l'inoculation par l'extrémité racinaire intacte avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum*, induit un arrêt de l'élongation des poils racinaires dès 18hpi et aucune croissance racinaire n'est visible au-delà de 24hpi, que ce soit dans une lignée sensible (A17) ou résistante (F83005.5) (Turner et al., 2009). Chez la lignée sensible, des mesures de fluorescence ont démontré que l'épiderme de l'extrémité racinaire n'était plus viable à 3dpi et cela se traduit par un brunissement et un gonflement de la pointe de la racine (Turner et al., 2009). Un suivi de la cinétique d'infection à travers la racine a permis de déterminer le processus employé par la bactérie pour coloniser la plante. Ainsi, à 3dpi, les bactéries sont détectées dans les cellules du cortex et dans les espaces intercellulaires et à 7dpi, *R. solanacearum* pénètre et prolifère dans les vaisseaux de la lignée sensible, mais pas dans la lignée résistante (Turner et al., 2009). Le développement des symptômes de flétrissement résulterait en partie d'une sécrétion massive d'exopolysaccharides (EPS) dans les vaisseaux du xylème, bloquant ainsi la conduction de la sève à travers la plante. A la mort de son hôte, le cycle de vie de *R. solanacearum* se poursuit dans le sol où la bactérie peut survivre plusieurs années avant de reprendre son processus infectieux (Fig. 25) (Genin, 2010).

2.3 Pouvoir pathogène de la bactérie

L'interaction entre *R. solanacearum* et une plante hôte débute par la perception d'un signal émanant de la plante elle-même et se poursuit par l'activation d'une cascade de signalisation permettant la mise en place du système de sécrétion de type III (T3SS) et, finalement, à l'injection d'effecteurs de type III (T3E) dans la cellule végétale (Fig. 26). Le gène *PrhA* (plant regulator of *hrp* genes A) a tout d'abord été identifié comme un régulateur d'une cascade de signalisation aboutissant à l'induction des gènes *Hrp* de *R. solanacearum* et ce, uniquement en présence de cellules végétales (Fig. 26-A) (Marenda et al., 1998). En effet, les auteurs ont montré qu'une souche GMI1000 mutée pour le gène *PrhA* n'est plus capable d'induire l'expression des gènes *hrp* en co-culture avec des cellules d'*Arabidopsis*. La mutation du gène *PrhA* conduit donc à une perte de la virulence de la souche GMI1000 sur

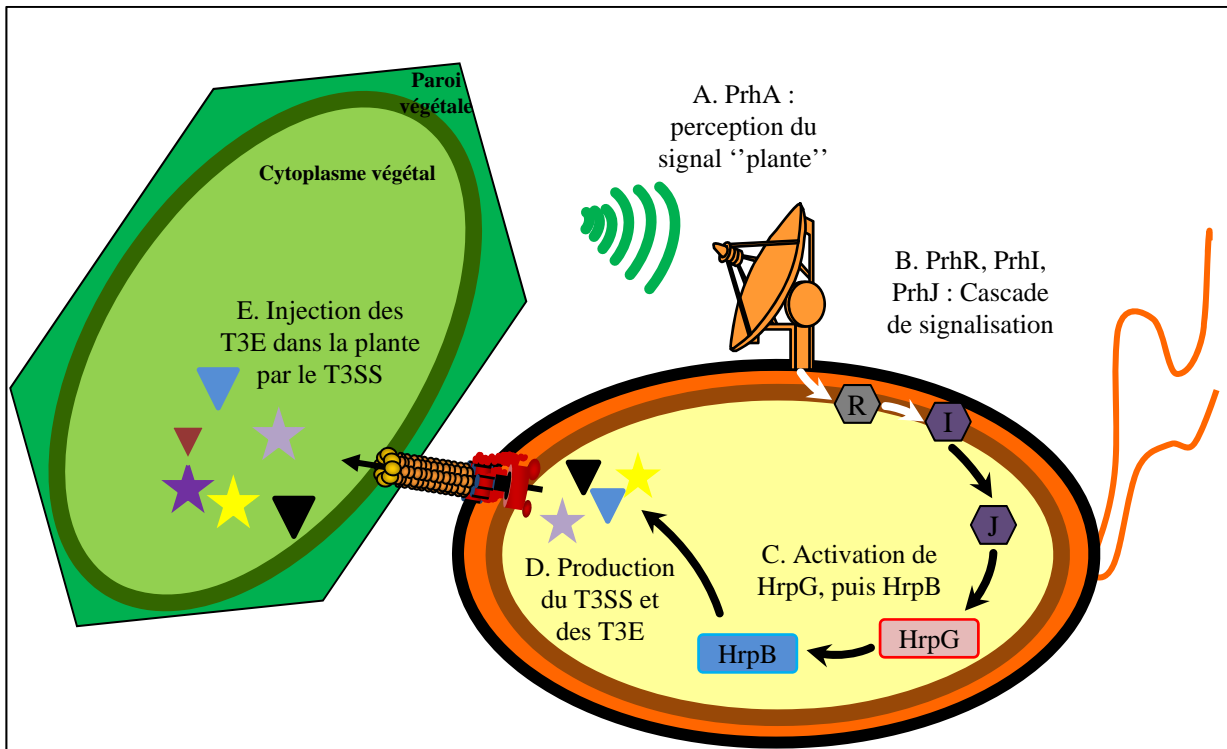


Figure 26. Représentation schématique de la cascade de signalisation déclenchée chez *R. solanacearum*, suite à la perception d'un signal émis par la plante.

Les proportions entre la cellule végétale et la cellule bactérienne ne sont pas respectées. Pour la cellule bactérienne, les différents compartiments sont représentés par le code couleur suivant : la membrane externe en noir, le périplasma en orange, la membrane interne en marron et le cytoplasme en jaune clair.

- R. solanacearum* perçoit un signal émis par la plante via PrhA, un récepteur présent sur la membrane externe de la bactérie, symbolisé ici par la parabole.
- Suite à la perception du signal, une cascade de signalisation est déclenchée, faisant intervenir successivement PrhR et PrhI, situés sur la membrane interne, et PrhJ, localisé dans le cytoplasme.
- HrpG est alors activée et va permettre l'activation de HrpB, le régulateur du pouvoir pathogène de la bactérie.
- Lorsque HrpB est activée, la bactérie produit alors une pléiade d'effecteurs de type III (T3E) et met en place son système de sécrétion de type III (T3SS).
- Lorsque le T3SS est fonctionnel, la bactérie injecte les T3E dans le cytoplasme végétal.

Arabidopsis (Marenda et al., 1998). PrhA est un récepteur de type TonB-dépendant ancré dans la membrane externe de la bactérie, capable de percevoir un signal d'origine végétale, présent dans des fractions de paroi d'Arabidopsis, mais dont la nature est encore inconnue à ce jour (Aldon et al., 2000). Une fois le signal perçu, l'information est transférée via PrhR, PrhI, deux facteurs anti-sigma, et PrhJ, un régulateur transcriptionnel, avant d'activer l'expression du gène *HrpG* (Fig. 26-B) (Brito et al., 2002). *HrpG* est notamment un activateur de l'expression du gène *HrpB*, un régulateur de la transcription des gènes codant des protéines de structure du T3SS, ainsi que des gènes codant des effecteurs qui seront injectés dans le cytoplasme végétal (Fig. 26-C et D) (Genin et al., 1992; Brito et al., 1999; Cunnac et al., 2004a; Occhialini et al., 2005). Une protéine *HrpB* fonctionnelle est prépondérante, au même titre que *HrpG*, pour la virulence de la bactérie puisque les mutants *hrpB* et *hrpG* sont incapables d'induire des symptômes de maladie sur plantes hôtes (Genin et al., 1992; Brito et al., 1999). Une fois le T3SS mis en place, *R. solanacearum* va pouvoir injecter de nombreux effecteurs dont la fonction est, pour la plupart, encore inconnue. Les T3E sont régulés par *HrpB* et une approche bioinformatique a permis d'identifier des gènes ayant dans leur promoteur un motif (Hrp_{II} -box) reconnu par *HrpB* (Cunnac et al., 2004a; Cunnac et al., 2004b). Une analyse du transcriptome d'une souche mutée pour le gène *HrpB* a également été exploitée pour identifier des gènes régulés par *HrpB* (Occhialini et al., 2005). Ces deux approches ont contribué à obtenir une liste de 74 T3E produits par la souche GMI1000, dont 28 ont, à ce jour, été démontrés comme étant excrétés en dehors de la bactérie ou injectés dans les cellules végétales via le T3SS (Poueymiro and Genin, 2009). Parmi ces 28 candidats, plusieurs T3E de *R. solanacearum* ont fait l'objet d'une étude plus détaillée. Par exemple, les sept protéines GALA sont nécessaires au pouvoir pathogène de la bactérie sur Arabidopsis, puisque seule une souche mutée pour les sept gènes *GALA* devient beaucoup moins virulente (Angot et al., 2006). En revanche, le gène *GALA7* est apparu comme étant essentiel pour la virulence de la bactérie sur *Medicago truncatula*, puisque le simple mutant *gala7* est moins virulent sur cette espèce (Angot et al., 2006). Les effecteurs GALA seraient impliqués dans le détournement de la voie ubiquitine ligase afin de promouvoir la maladie (Angot et al., 2006).

2.4 Pathosystème *A. thaliana* - *R. solanacearum*

Initialement, la sensibilité de dix-sept accessions d'Arabidopsis vis-à-vis de *R. solanacearum* a permis d'identifier deux accessions au comportement diamétralement opposé

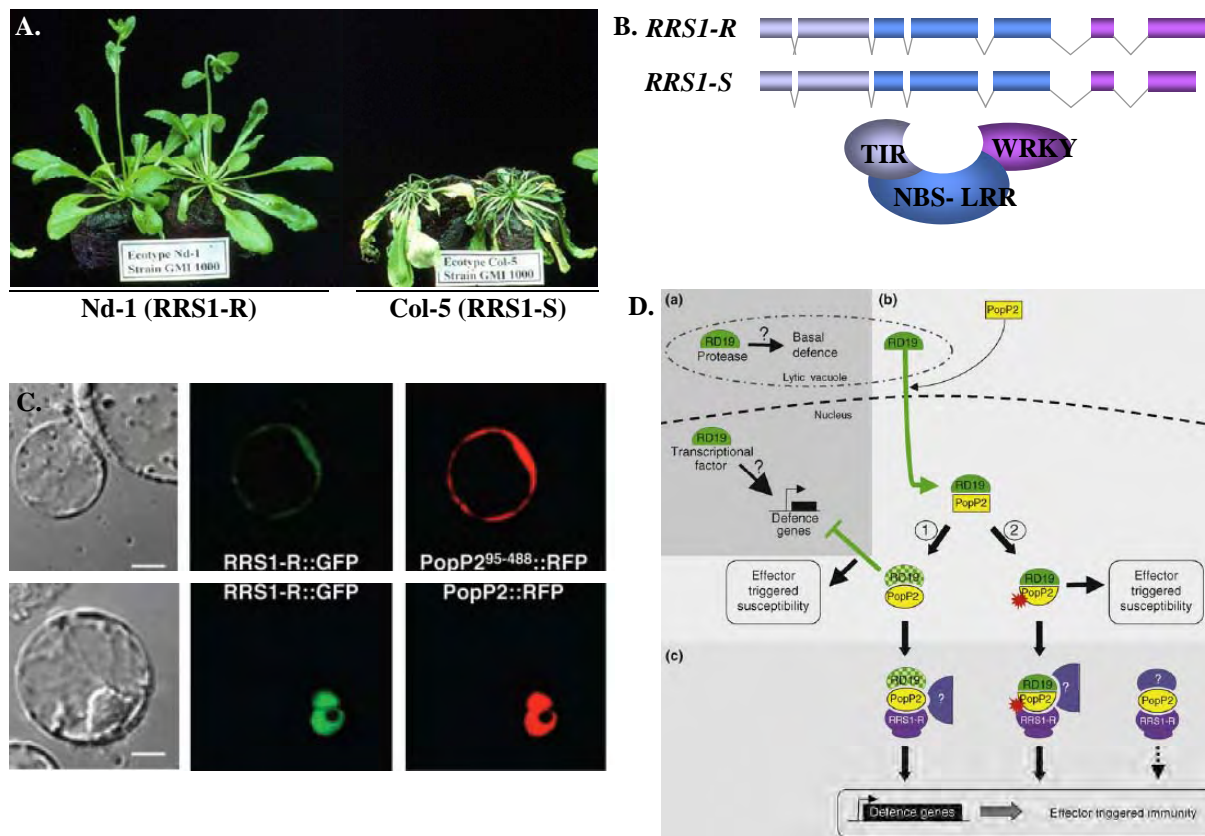


Figure 27. Pathosystème *A. thaliana* - *R. solanacearum*.

- A. Réponse phénotypique des écotypes sauvages Nd-1 (à gauche) et Col-5 (à droite), porteurs respectivement des protéines RRS1-R et RRS1-S (d'après Deslandes et al, 1998).
- B. Structure prédite des protéines RRS1-R et RRS1-S, composées de trois domaines (TIR, NB-LRR et WRKY). La protéine RRS1-S possède un domaine WRKY tronqué de 90 acides aminés (d'après Deslandes et al, 2002).
- C. Localisation subcellulaire de la protéine RRS1-R visualisée par microscopie confocale après co-infiltration de protoplastes d'*Arabidopsis* (extrait de Deslandes et al, 2003). Sur le panel du haut, la protéine RRS1-R (fusionnée au marqueur GFP) est infiltrée avec une protéine PopP2 ayant perdu sa séquence d'adressage nucléaire (PopP2⁹⁵⁻⁴⁸⁸ fusionnée à un marqueur RFP). Dans ce cas, la protéine PopP2 n'est plus fonctionnelle et le marquage de la protéine est cytoplasmique. Un marquage cytoplasmique est également observé pour RRS1-R. Sur le panel du bas, la protéine RRS1-R est co-infiltrée avec la protéine PopP2 fonctionnelle localisée dans le noyau. Dans ce cas, RRS1-R est alors observée dans le noyau.
- D. Modèle d'action proposé pour l'effecteur PopP2 (extrait de Poueymiro & Genin, 2009).
- (a) RD19, une cible vacuolaire de PopP2, jouerait un rôle dans l'induction des défenses via une activité protéase et/ou en tant que régulateur transcriptionnel dans le noyau.
- (b) Chez une plante sensible, sous l'effet de PopP2, RD19 est relocalisée au niveau du noyau où les deux protéines interagissent. Deux situations conduisant à l'ETS sont alors proposées. Dans la situation 1, PopP2 inhibe RD19, bloquant ainsi l'expression de gènes de défense ce qui se traduit par une sensibilité de la plante. Dans la situation 2, PopP2 serait modifiée par RD19 et cette modification permettrait à PopP2 d'induire la virulence.
- (c) Chez une plante résistante, la protéine de résistance RRS1-R reconnaît l'interaction entre RD19 et PopP2. Deux situations conduisant à l'ETI sont alors proposées. Dans la situation 1, l'altération de RD19 par PopP2 permet la reconnaissance du complexe par RRS1-R. Dans la situation 2, RRS1-R détecte la modification de PopP2. Dans les deux cas, cet événement de perception de RD19/PopP2 par RRS1-R active l'expression de gènes de défense via le domaine WRKY de RRS1-R. Enfin, il est possible que d'autres facteurs de la plante (marqués d'un point d'interrogation) soient impliqués dans la résistance dépendante de RRS1-R.

en réponse à une inoculation avec la souche GMI1000 : Nd-1 (Niedersenz) ne présente aucun symptôme et est totalement résistante à la bactérie, alors que Col-5 (Columbia) développe rapidement les symptômes de flétrissement caractéristiques de la maladie (Fig. 27-A) (Deslandes et al., 1998). Les auteurs ont pu mettre en évidence par clonage positionnel que la résistance à *R. solanacearum* était due au gène *RRS1* (*Resistance to R. solanacearum 1* ; At5g45260), codant une protéine de type TIR-NB-LRR-WRKY. Ce gène est présent chez l'écotype Nd-1 sous la forme *RRS1-R* conférant la résistance à la bactérie, tandis que chez l'écotype Columbia, *RRS1-S* confère la sensibilité à cet agent pathogène (Deslandes et al., 2002). Les deux allèles *RRS1-R* (Nd-1) et *RRS1-S* (Col-5) diffèrent entre eux au niveau de la position du codon stop. En effet, il se situe à une position avancée chez *RRS1-S* par rapport à *RRS1-R*, ce qui aboutit à la formation d'une protéine tronquée de 90 acides aminés dans le domaine WRKY chez l'écotype sensible (Col-5) (Fig. 27-B) (Deslandes et al., 2002). Par la suite, la protéine Avr correspondante a été identifiée chez *R. solanacearum* lors d'un crible de souches délétées de différents effecteurs. Parmi elles, la souche délétée du gène *PopP2* (GMI1000ΔPopP2) est virulente sur l'accession Nd-1 en provoquant le développement de symptômes de flétrissement (Deslandes et al., 2003). Il a été montré que les deux protéines du couple R/Avr, *RRS1-R* et *PopP2* interagissaient dans des expériences de double hybride chez la levure. Des expériences de localisation subcellulaire sur des protoplastes d'*Arabidopsis* ont révélé que *RRS1-R* est localisée dans le noyau, mais uniquement en présence de *PopP2* (Fig. 27-C) (Deslandes et al., 2003). Depuis, la recherche des partenaires végétaux pouvant interagir avec la protéine *PopP2* a permis de mettre en évidence une interaction avec *RD19*, une protéine de type protéase à cystéine localisée dans la vacuole lytique des cellules végétales (Bernoux et al., 2008). Un mutant *rd19* dans le fond génétique Nd-1 est altéré dans sa résistance à la bactérie, ce qui attribue un rôle à *RD19* dans la résistance médiée par *RRS1-R* (Bernoux et al., 2008). Différents modèles ont été proposés afin d'expliquer les rôles respectifs de *PopP2*, *RRS1-R* et *RD19* dans l'interaction entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum* (Fig. 27-D) (Poueymiro and Genin, 2009). Récemment, il a été démontré qu'une autre protéine, *RPS4* (*Resistance to Pseudomonas syringae 4*), initialement découverte pour la résistance qu'elle procure à une souche de *Pst* possédant la protéine d'avirulence *avrRPS4*, est également requise pour la résistance vis-à-vis *R. solanacearum* (Narusaka et al., 2009). De façon intéressante, non seulement *RRS1* et *RPS4* sont codées par deux gènes juxtaposés dans le génome d'*Arabidopsis* (At5g45250 et At5g45260), mais elles sont toutes les deux impliquées dans la résistance au champignon *Colletotrichum higginsianum* (Birker et al., 2009; Narusaka et al., 2009).

Enfin, les accessions Nd-1 (résistante) et Col-5 (sensible) ont été exploitées pour déterminer la modulation de l'expression globale des gènes lors d'une infection réussie (Col-5/GMI1000 et Nd-1/GMI1000 Δ PopP2) ou échouée (Nd-1/GMI1000) (Hu et al., 2008). Les données transcriptomiques obtenues pour les deux systèmes menant à la maladie ont été comparées à celles obtenues dans le système menant à la résistance. Les résultats indiquent que très peu de gènes voyaient leur expression modifiée dans les temps précoces de l'interaction, alors que l'apparition des symptômes coïncide avec de nombreux changements d'expression, notamment pour des gènes impliqués dans la biosynthèse et la voie de signalisation de l'ABA (40% des gènes induits), des gènes dont l'expression est modifiée au cours de la sénescence (37% des gènes induits), mais aussi des gènes qui avaient préalablement été identifiés comme induits suite à un traitement avec flg22 (46% des gènes induits) (Hu et al., 2008).

3. Objectifs de travail

Les résultats préliminaires démontrant une perte de sensibilité de *wat1* vis-à-vis de *R. solanacearum* ont conduit à la rédaction d'un projet sélectionné et financé par l'ANR sur la période 2008-2011. Ce projet, nommé "Walltalk: where microbe meet plants" est coordonné par Deborah Goffner et implique les équipes d'Yves Marco (LIPM, Toulouse) et Lise Jouanin (IJPB, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles).

Mon travail, commencé en M2R et poursuivi en thèse, s'inscrit dans le cadre de ce programme et vise principalement à élucider les mécanismes de résistance de *wat1*. L'objectif de la première et majeure partie de ma thèse était de tenter de répondre à plusieurs questions. Tout d'abord, il était essentiel de déterminer le degré de spécificité de la résistance accrue à *R. solanacearum* : est-ce également le cas vis-à-vis d'autres agents pathogènes ? Pour répondre à cette question, la sensibilité du mutant *wat1* a été testée après inoculation avec des microorganismes pathogènes variés. Ensuite, il était important d'évaluer le rôle des voies de signalisation ET-JA-SA, classiquement impliquées dans les réponses de défense, dans la résistance accrue de *wat1*. Pour cela, une approche génétique "double mutants" a été exploitée, de même que l'étude de l'expression de gènes marqueurs de ces trois voies. Puis, afin d'identifier un maximum d'éléments impliqués dans les mécanismes de résistance, des approches transcriptomiques et métabolomiques avec et sans *a priori* ont également été utilisées. Enfin, le mutant *wat1* étant issu d'un crible "paroi", les différentes données

obtenues ont permis d'évaluer si la paroi végétale pouvait être associée, dans ce cas, à la résistance accrue.

Dans une seconde partie de mon travail de thèse, afin de mieux comprendre le rôle de la paroi végétale dans l'interaction *Arabidopsis* – *R. solanacearum*, deux volets ont été abordés. Dans un premier temps, j'ai participé à l'étude des modifications pariétales provoquées lors d'une interaction compatible entre les deux partenaires à l'aide d'un pathosystème *in vitro*. Dans un second temps, j'ai participé au criblage de mutants parois afin d'ouvrir des pistes pour mieux comprendre les mécanismes liés à la paroi végétale et impliqués dans la réponse aux agents pathogènes.

RESULTATS

RESULTATS - CHAPITRE 1 :
ETUDE DE LA RESISTANCE ACCRUE DU MUTANT *WAT1*
D'ARABIDOPSIS A LA BACTERIE *R. SOLANACEARUM*

Les données présentées dans ce chapitre portent sur le sujet principal de mon projet de thèse, la caractérisation du mutant *wat1* dans un contexte de phytopathologie, et un article est en cours de rédaction. Partant du constat que *wat1* présentait une réduction de la sensibilité à *R. solanacearum*, je me suis attaché à en expliquer les raisons. Les stratégies employées afin d'y parvenir sont décrites dans ce chapitre. Après la discussion des résultats obtenus, un modèle est proposé pour expliquer la résistance de *wat1*.

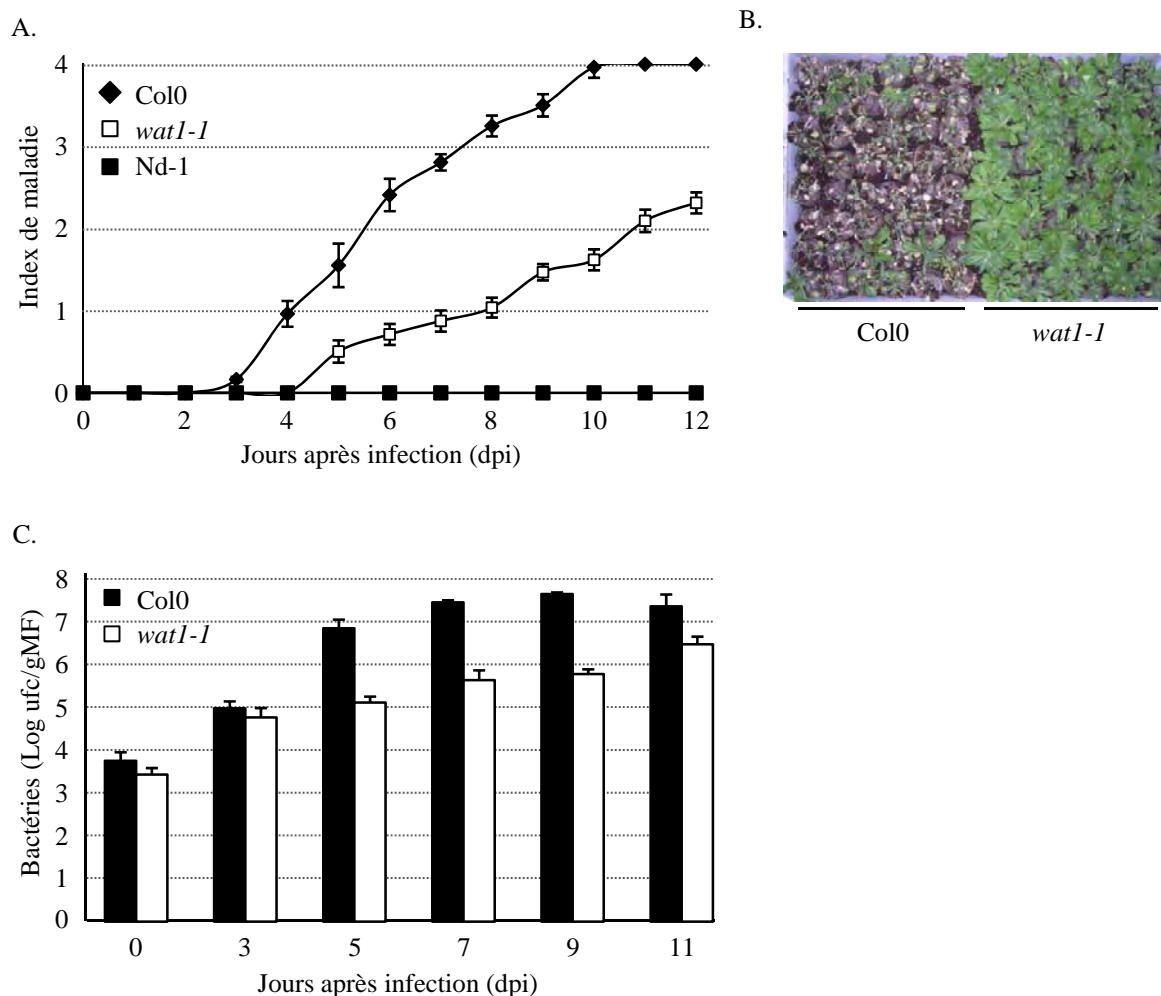


Figure 28. Le mutant *wat1* présente une résistance accrue à *Ralstonia solanacearum* suite à une inoculation avec blessure du système racinaire.

L'inoculation a été réalisée par immersion du système racinaire préalablement blessé de plantes âgées de 4 semaines dans une solution bactérienne de la souche GMI1000. La sensibilité de *wat1-1* a été testée en comparaison avec son témoin sauvage Col0, naturellement sensible à la souche GMI1000. Les données présentées sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

A. Cinétique de développement des symptômes de flétrissement selon l'index de maladie attribué quotidiennement aux différentes lignées étudiées : Col0 (losange noir), *wat1-1* (losange blanc) et Nd-1 (carré noir). L'écotype sauvage Niedersenz (Nd-1), totalement résistant à la souche GMI1000, a été inclus comme témoin. Les données présentées sont les moyennes (\pm SE) des notes attribuées aux plantes (n=50 pour chaque génotype).

B. Photographie illustrant le niveau de maladie des plantes sauvages Col0 et du mutant *wat1-1* à 9 dpi.

C. Multiplication bactérienne mesurée à différents temps après infection dans les deux génotypes : Col0 (noir), *wat1-1* (blanc). Les données sont exprimées en Log d'unités formant une colonie (ufc) par gramme de matière fraîche (gMF). Les données présentées sont les moyennes (\pm SE) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=9 pour chaque génotype).

1. Caractérisation phénotypique de la résistance accrue du mutant *wat1* à *R. solanacearum*

1.1 Analyse du niveau de résistance de *wat1* : méthode d'inoculation "classique" après blessure du système racinaire

Pour étudier le pathosystème *A. thaliana* - *R. solanacearum*, l'inoculation de la plante par la bactérie se fait classiquement en mettant en contact quelques minutes le système racinaire avec une culture contenant l'agent pathogène (Deslandes et al., 1998). Un détail important de ce protocole est la blessure des racines préalablement à l'inoculation, réalisée en coupant la base du pot de tourbe (Jiffy France, Lyon). L'intérêt de ce procédé est de favoriser l'absorption des bactéries dans un système où les plantes répondaient de façon la plus homogène qui soit à l'infection par la bactérie. En effet, à l'origine, l'objectif était de mettre au point un pathosystème permettant de cribler de façon reproductible de multiples accessions d'*Arabidopsis* afin d'identifier des génotypes sensibles et résistants (Deslandes et al., 1998).

Pour les premières expériences d'infection, ce protocole a été utilisé afin d'évaluer l'effet de la mutation *wat1* sur la sensibilité des plantes à *Ralstonia solanacearum* (Fig. 28). L'évolution de la maladie a été mesurée sur un seul allèle, *wat1-1*, en comparaison à des plantes sauvages Col0 naturellement sensibles à la souche GMI1000 de la bactérie. L'accession sauvage Niedersenz (Nd-1), totalement résistante à cette souche, a été incluse comme témoin positif de résistance. L'index de maladie (DI), basé sur le pourcentage de flétrissement des feuilles, s'étend sur une échelle comprise entre 0 et 4 : 0, absence de symptômes ; 1, flétrissement de 25% des feuilles d'une rosette ; 2, 50% de flétrissement ; 3, 75% de flétrissement ; et 4, mort de la plante. Le DI a été mesuré pour chaque génotype et l'évolution des symptômes de flétrissement est présentée (Fig. 28-A). Chez l'écotype sauvage sensible Col0, l'apparition des symptômes de flétrissement débute 4 jours après l'infection (4dpi). La maladie évolue ensuite rapidement puisque DI=2 est franchi à 6dpi, puis le stade DI=3 est dépassé à 8dpi. Enfin, à 10dpi, les plantes Col0 sont mortes (DI=4) (Fig. 28-A). Chez le mutant *wat1-1*, les premiers symptômes apparaissent à 5dpi et par la suite, la maladie évolue progressivement avec le stade DI=1 franchi à 8dpi et le stade DI=2 à 11dpi. A la fin de la cinétique (12dpi), l'index de maladie moyen est légèrement supérieur à 2 (Fig. 28-A). Un suivi à plus long terme a révélé que même à 25dpi, le mutant *wat1* n'atteignait pas l'index 4 de maladie (données non présentées). Ces résultats indiquent un retard dans l'apparition des

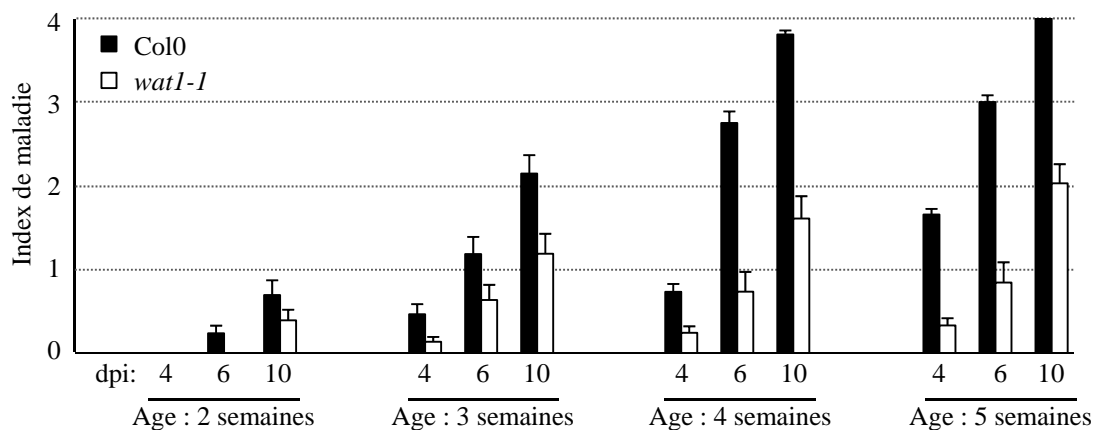


Figure 29. L'âge des plantes lors de l'infection a un effet sur le développement de la maladie, mais pas sur la résistance accrue observée chez le mutant *wat1* par rapport au sauvage Col0.

La sensibilité de *wat1-1* a été testée en comparaison avec son témoin sauvage Col0, naturellement sensible à la souche GMI1000. Les plantes ont été inoculées à l'âge de 2, 3, 4 ou 5 semaines suite à une blessure artificielle préalable des racines. Les données présentées correspondent aux index de maladie moyens (\pm SE) attribués à 4, 6 et 10dpi aux plantes (n=50 pour chaque génotype). Les données présentées sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

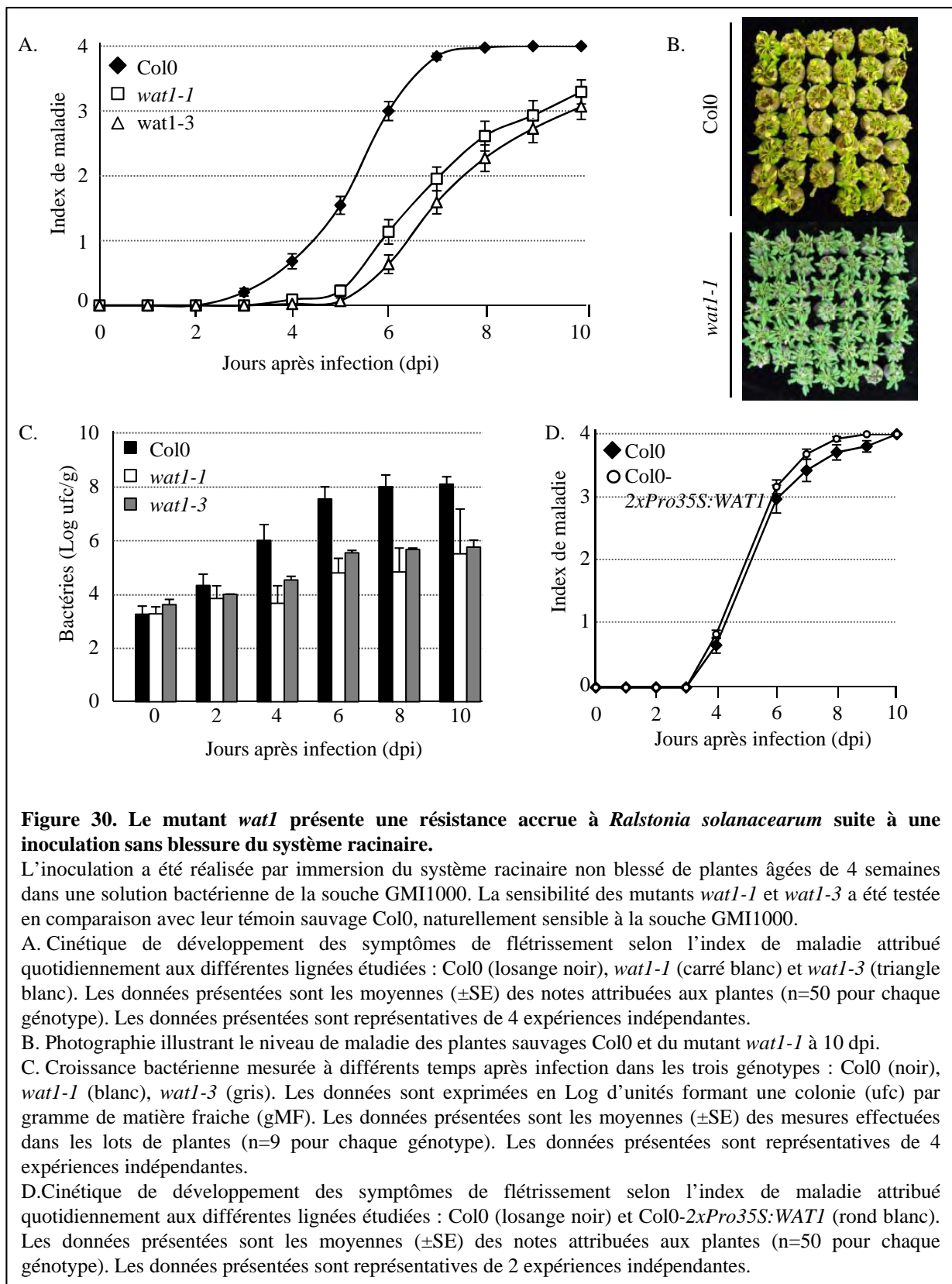
symptômes et dans l'évolution de la maladie chez le mutant *wat1-1*, en comparaison au témoin sauvage Col0, comme l'illustrent les photographies des plantes prises à 9dpi (Fig. 28-B). Ces données de symptomatologie permettent de conclure que le mutant *wat1-1* présente une diminution de la sensibilité à *Ralstonia solanacearum*. Comme attendu, l'écotype sauvage résistant Nd-1 ne présente jamais de symptômes de flétrissement (DI=0) tout au long de la cinétique (Fig. 28-A).

Afin de vérifier si la diminution de la sensibilité de *wat1* pouvait être associée à une réduction de la multiplication bactérienne, une quantification de la population bactérienne présente dans les feuilles des plantes Col0 et *wat1-1* a été réalisée à différents temps après infection (Fig. 28-C). Chez Col0, la mesure effectuée dans des feuilles de plantes inoculées quelques minutes auparavant (0dpi) montre que 3,7 Log d'unités formant une colonie par gramme de feuilles (Log ufc/gMF) sont présentes, ce qui équivaut à environ 5 000 bactéries/gMF (Fig. 28-C). Par la suite, la population microbienne se multiplie pour atteindre un plateau à 7dpi avec une quantité maximale de 7,5 Log ufc/gMF, soit environ 30 millions de bactéries (Fig. 28-C). Chez le mutant *wat1-1*, bien que le nombre de bactéries mesurées à 0dpi et 3dpi soient comparables à ceux de Col0, une forte réduction de la croissance de *R. solanacearum* est observée ensuite, de l'ordre de 2 Log ufc/gMF de différence, soit 100 fois moins de bactéries, et ceci, notamment entre 5 et 11 dpi (Fig. 28-C). Ces données montrent que la diminution de la sensibilité est corrélée à une réduction de la croissance bactérienne chez le mutant. On peut donc parler d'une résistance accrue de *wat1* à *R. solanacearum*.

1.2 Variation de la résistance du mutant *wat1* en fonction du stade de développement

Typiquement, l'inoculation d'*Arabidopsis* avec *R. solanacearum* est réalisée sur des plantes âgées de 4 semaines, après blessure artificielle du système racinaire (Deslandes et al., 1998). Nous avons tenté de déterminer l'importance de l'âge des plantes au moment de l'inoculation avec *R. solanacearum* sur le développement des symptômes de flétrissement. Pour cela, des infections ont été réalisées sur des plantes sauvages Col0 et mutantes *wat1-1* âgées de 2, 3, 4 ou 5 semaines (Fig. 29).

Lorsque les plantes ont été inoculées à 2 semaines, l'intensité des symptômes est très faible puisque le stade DI=1 n'est pas encore atteint à 10dpi et, à ce point de la cinétique, la différence entre les deux génotypes est faible (Fig. 29). Lorsque les plantes ont été infectées à



3 semaines, la maladie évolue plus vite que chez les plantes de 2 semaines, puisque le stade DI=1 est dépassé à 4dpi et DI=2 l'est à 10dpi (Fig. 29). Là encore, les différences sont relativement faibles entre Col0 et *wat1* (Fig. 29). Dans les cas où les plantes ont été inoculées à 4 ou 5 semaines, les résultats montrent qu'une sensibilité totale (DI=4) est atteinte à 4dpi pour Col0, alors que *wat1* n'est qu'à DI=2, indiquant qu'à ces âges, le mutant est plus résistant que le sauvage (Fig. 29). L'objectif étant de travailler avec un système le plus jeune possible avec une résistance accrue du mutant à *R. solanacearum* la plus forte qui soit, le stade de 4 semaines a donc été conservé pour la suite du projet. De plus, les résultats mettent en évidence que l'intensité de la maladie diminue dans les deux génotypes lorsque les plantes sont infectées plus précocement au cours de leur développement.

1.3 Analyse du niveau de résistance de *wat1* à une inoculation sans blessure du système racinaire

La blessure des racines préalablement à l'infection constitue une altération de l'intégrité du système racinaire, favorisant ainsi l'entrée des bactéries dans la plante. Issu d'un crible "paroi" initié chez *Zinnia* (décrit dans la partie 4 de l'introduction), la capacité des bactéries à rejoindre les parties aériennes des plantes infectées pourrait être altérée chez le mutant *wat1*. Pour vérifier ce point, des tests d'infection ont alors été menés sans qu'aucune blessure artificielle ne soit préalablement réalisée, afin de vérifier si avec cette nouvelle méthode, la résistance accrue de *wat1* était conservée. Pour cette étude, deux mutants alléliques, *wat1-1* et *wat1-3*, ont été inoculés avec *R. solanacearum* et leur sensibilité a été comparée à celle de plantes sauvages Col0 (Fig. 30). Chez l'écotype sauvage sensible Col0, les premiers symptômes apparaissent à 3dpi et la maladie se développe très rapidement puisque les plantes sont mortes (DI=4) à 8dpi (Fig. 30-A). Chez les deux mutants *wat1*, les plantes montrent les premiers symptômes à 5dpi et la maladie évolue moins rapidement que chez Col0 puisque le stade DI=1 est atteint à 6dpi, le stade DI=2 à 7dpi et le stade Di=3 à 9dpi (Fig. 30-A). En absence de blessure préalable à l'infection, les deux allèles indépendants *wat1* présentent également une diminution de la sensibilité vis-à-vis de *R. solanacearum*, comme l'illustrent les photographies des symptômes prises à 10dpi (Fig. 30-B).

En parallèle, un dénombrement bactérien *in planta* a été effectué tout au long de la cinétique (Fig. 30-C). Chez Col0, la mesure effectuée dans des feuilles de plantes inoculées

quelques minutes auparavant (0dpi) montre que 3,3 Log ufc/gMF sont présentes, ce qui équivaut à environ 2 000 bactéries/gMF (Fig. 30-C). Par la suite, la population microbienne se multiplie pour atteindre un plateau à 8dpi avec une quantité maximale de 8 Log, soit environ 100 millions de bactéries (Fig. 30-C). Chez les mutants *wat1*, le nombre de bactéries mesurées à 0dpi et 2dpi est comparable dans les deux allèles à celle de Col0, ce qui indique que l'absorption des bactéries n'est pas perturbée chez les mutants. Plus tard dans la cinétique, une forte réduction de la multiplication de *R. solanacearum* est observée, de l'ordre de 2 à 3 Log ufc/gMF de différence, soit 100 à 1000 fois moins de bactéries, entre 4 et 10 dpi. A ces temps de la cinétique, la population bactérienne chez *wat1* est comprise entre 3,7 et 5,7 Log ufc/gMF (Fig. 30-C). Ces données confirment la résistance de *wat1* envers *R. solanacearum* pour deux allèles indépendants et définissent un pathosystème plus physiologique, sans blessure du système racinaire. Par la suite, toutes les inoculations avec *R. solanacearum* ont été réalisées sur des plantes âgées de 4 semaines, sans blessure artificielle du système racinaire.

1.4 Effet de la surexpression de *WAT1* sur la réponse à *R. solanacearum*

Les différentes expériences menées avec les deux allèles du mutant *wat1* montrent que l'absence de l'expression gène *WAT1* provoque chez Arabidopsis une résistance accrue à *R. solanacearum*. Déterminer si la surexpression de *WAT1* provoque, à l'inverse, une hypersensibilité à la bactérie était la suite logique de l'étude fonctionnelle du gène. Pour cela, la séquence codante *WAT1* a été placée sous le contrôle d'un doublon du promoteur 35S, générant ainsi une construction *2xPro35S:WAT1* qui a été introduite dans un fond sauvage Col0. La vérification du niveau d'expression de *WAT1* par RT-PCR chez l'ensemble des transformants a permis d'identifier une lignée qui exprime 1,8 fois plus le gène par rapport au sauvage. Cette lignée ne présente pas de phénotype développemental particulier (Philippe Ranocha, données non publiées). La sensibilité de cette lignée à *R. solanacearum* a été testée et l'évolution des symptômes de flétrissement a été comparée à celle observée chez Col0 (Fig. 30-D). Les résultats montrent que tout au long de la cinétique, la maladie se développe de façon similaire dans les deux génotypes (Fig. 30-D). Ces résultats suggèrent que la surexpression du gène *WAT1* n'accroît pas la sensibilité à *R. solanacearum* par rapport à des plantes sauvages. Dans ce cas, *WAT1* n'apparaît pas comme un facteur de sensibilité majeur

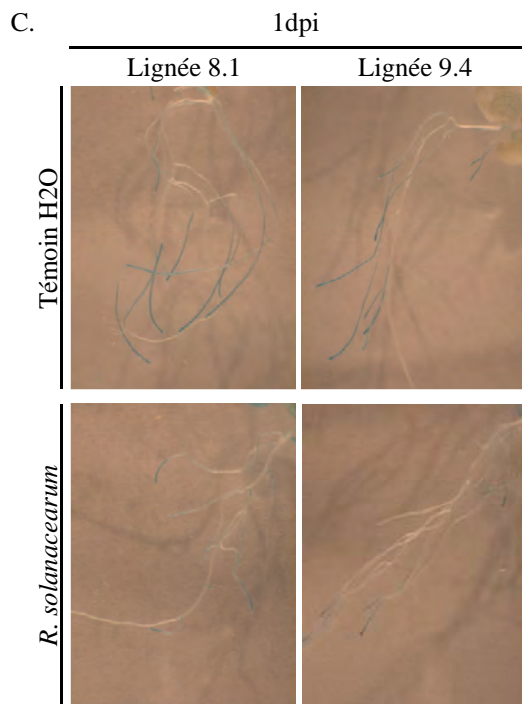
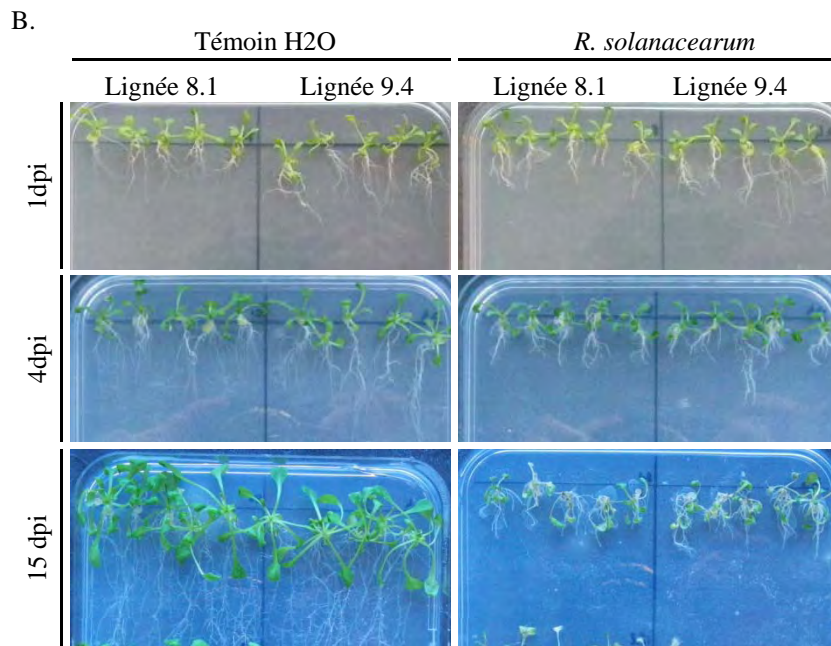
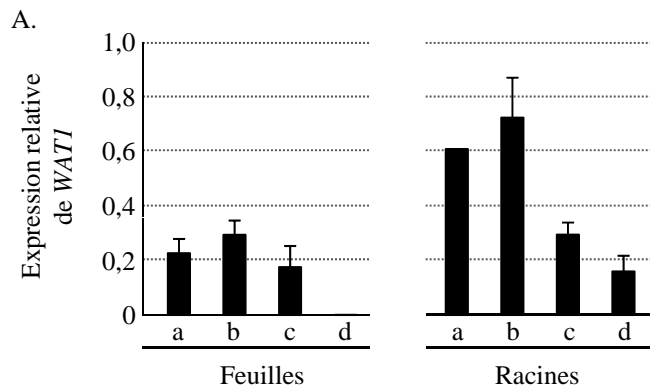


Figure 31. Expression du gène WATI en réponse à une infection par *R. solanacearum*.

A. Mesure par qRT-PCR de l'expression du gène dans les feuilles et dans les racines de plantes sauvages Col0 en absence de bactéries (a) ou après infection avec la souche GMI1000 : 1dpi (b), 4dpi (c) et 6dpi (d). Les données sont normalisées par rapport à l'expression de 3 gènes de ménage (At1g13320, At3g18780 et At5g09810) dont l'expression est stable tout au long de la cinétique. Les valeurs correspondent aux moyennes (SE) des mesures faites sur du matériel végétal issu de deux répliques biologiques indépendantes.

B. Morphologie des plantules Col0-*proWATI:GUS* issues de deux lignées indépendantes, à différents temps (1, 4 et 15 dpi) après traitement avec de l'eau (témoin négatif) ou après infection avec *R. solanacearum* GMI1000.

C. Expression du gène WATI révélée par l'activité GUS dans des plantules Col0-*proWATI:GUS* issues de deux lignées indépendantes, 1 jour après traitement avec de l'eau (témoin négatif) ou après infection avec *R. solanacearum* GMI1000.

vis-à-vis de la bactérie. Cependant, il est également probable que le niveau de surexpression de *WATI* dans la lignée transgénique ne soit pas assez fort pour exclure une augmentation de la sensibilité liée à une plus grande surexpression du gène.

2. Cinétique spatio-temporelle d'expression du gène *WATI* en réponse à *R. solanacearum*

2.1 Analyse du profil d'expression de *WATI* par RT-PCR quantitative

Afin de mieux connaître le rôle du gène *WATI* dans l'interaction entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum*, un suivi de son expression a été réalisé par RT-PCR quantitative (qRT-PCR), en absence d'agent pathogène et à différents temps après inoculation avec la bactérie. L'analyse a été réalisée séparément sur feuilles (rosette entière) et racines récoltées à partir des mêmes plantes sauvages Col0 (Fig. 31-A). Dans les feuilles, l'expression de *WATI* est stable en condition non infectée et jusqu'à 4dpi, jour où les premiers symptômes apparaissent chez Col0 (Fig. 31-A). En revanche, l'expression de *WATI* diminue de façon drastique à 6dpi, temps de la cinétique où Col0 est au stade DI=3 de la maladie, indiquant que dans les feuilles, *WATI* ne semble pas répondre à la bactérie, mais plutôt à l'état physiologique de la plante dans les étapes tardives du flétrissement (Fig. 31-A). En ce qui concerne les racines, la première observation est que *WATI* s'exprime de façon plus importante en condition non infectée que dans les feuilles (environ 3 fois plus) (Fig. 31-A). Au cours de l'infection, l'expression de *WATI* diminue significativement à partir de 4dpi et reste stable ensuite à 6dpi (Fig. 31-A). Ces données montrent que l'expression de *WATI* évolue différemment dans le temps dans les feuilles et les racines en réponse à *R. solanacearum*. Cependant, la tendance générale est la même dans les deux organes, à savoir une diminution importante de l'expression de *WATI* dans les étapes plus tardives de l'interaction entre Col0 et la bactérie. De ce fait, la réduction de l'expression semble davantage s'expliquer par l'état morphologique de la plante (symptômes de maladie) plutôt que par la présence de la bactérie elle-même.

2.2 Analyse du profil d'expression du gène rapporteur *GUS* placé sous le contrôle du promoteur de *WATI*

Une approche complémentaire générant des informations spatio-temporelles a également été exploitée afin d'obtenir des données relatives à l'expression du gène *WATI* lors de l'infection par *R. solanacearum*. Il s'agit de l'étude de lignées transgéniques Col0 dans lesquelles le gène rapporteur *GUS* a été placé sous le contrôle du promoteur du gène *WATI*. Ces lignées ont déjà permis de déterminer que l'expression de *WATI* est préférentiellement associée au système vasculaire de toutes les parties de la plante et qu'une blessure favorise une induction forte et rapide du gène (Ranocha et al., 2010). L'induction par une blessure nous a conduit à choisir un autre système d'étude puisque pour travailler sur des plantes en Jiffy, il aurait fallu manipuler les racines pour les nettoyer, ce qui aurait favorisé les blessures et provoqué une induction de l'expression du gène *WATI*. Par conséquent, les lignées Col0-*proWATI:GUS* ont été exploitées dans un système d'infection *in vitro* développé dans les équipes d'Yves Marco et Stéphane Genin (LIPM, Toulouse). Brièvement, des plantules âgées d'une dizaine de jours sont inoculées en déposant une goutte d'une solution bactérienne (ou de l'eau pour les témoins) sur le système racinaire (Fig. 31-B). Dans le cas des témoins traités avec de l'eau, les feuilles et le système racinaire des plantules des deux lignées transgéniques se développent au cours du temps et, à 15dpi, le système racinaire est dense et composé de nombreuses racines secondaires (Fig. 31-B). Quand Col0 est inoculé avec *R. solanacearum*, un manchon bactérien de couleur blanche se forme autour des racines, ce qui va contribuer, dès 4dpi, à l'arrêt de la croissance du système racinaire des plantules mises en contact avec *R. solanacearum* (Fig. 31-B). A 15dpi, les plantules inoculées avec *R. solanacearum* sont mortes tandis que les plantules témoins sont exemptes de symptômes (Fig. 31-B).

L'activité *GUS* a seulement été étudiée à un temps précoce (1dpi) à cause des différences morphologiques qui apparaissent lors des stades plus tardifs et rendent les conclusions difficiles. A 1dpi, l'activité *GUS* peut être comparée dans les racines, avec pour seule variante la présence ou non de la bactérie (Fig. 31-C). Dans le cas où les plantules ont été traitées avec de l'eau, la coloration bleue caractéristique de l'activité *GUS* induite par le promoteur du gène *WATI* est localisée au niveau du système vasculaire tout le long des racines primaires et secondaires et plus fortement à proximité de l'apex racinaire, en accord avec les données publiées (Fig. 31-C) (Ranocha et al., 2010). Par contre, dans le cas où les

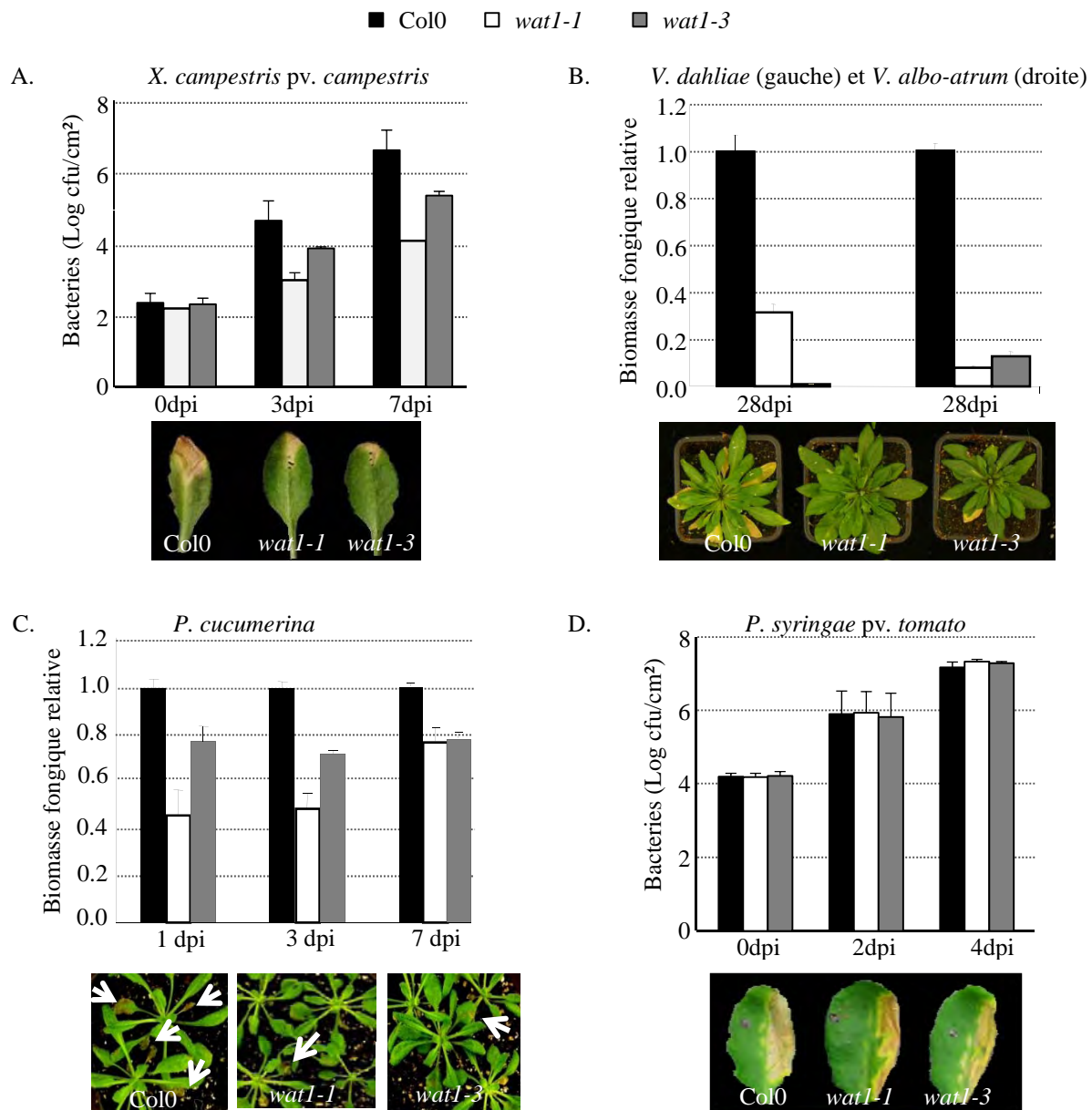


Figure 32. Sensibilité du mutant *wat1* à différents agents pathogènes.

La sensibilité des mutants *wat1-1* (blanc) et *wat1-3* (gris) a été testée en comparaison avec leur témoin sauvage Col0 (noir). Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes pour chaque agent pathogène testé.

A. Multiplication à 0, 3 et 7dpi de *X. campestris* pv. *campestris* (souche 8004DXopAC) après inoculation par piercing. Les données présentées, exprimées en Log ufc/cm², sont les moyennes (\pm SE) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=9 pour chaque génotype). Photographies des symptômes à 7dpi.

B. Mesure de la biomasse fongique mesurée à 28dpi, suite à l'inoculation avec *V. dahliae* et *V. albo-atrum*. Les données d'expression chez *wat1* sont relatives par rapport à Col0 et correspondent aux moyennes (\pm SD) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=10 pour chaque génotype). Photographies des symptômes à 28dpi.

C. Mesure de la biomasse fongique mesurée à 1, 3 et 7dpi, suite à l'inoculation avec *P. cucumerina*. Les données d'expression chez *wat1* sont relatives par rapport à Col0 et correspondent aux moyennes (\pm SD) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=15 pour chaque génotype). Photographies des symptômes à 7dpi.

D. Multiplication à 0, 2 et 4dpi de *P. syringae* pv. *tomato* après inoculation par piercing. Les données présentées, exprimées en Log ufc/cm², sont les moyennes (\pm SE) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=9 pour chaque génotype). Photographies des symptômes à 4dpi.

plantules ont été mises en contact avec les bactéries, la coloration bleue est restreinte en intensité et dans l'espace à l'apex racinaire (Fig. 31-C).

Bien que l'ensemble des résultats de qRT-PCR et d'observation de l'activité GUS, obtenus avec deux systèmes différents (plantes adultes en terre et plantules in vitro) ne permettent pas d'établir une comparaison directe, les informations générées sont cohérentes : l'expression de *WAT1* diminue lors de la maladie dans les plantes inoculées avec *R. solanacearum*. Le gène semble donc répondre à une modification de l'état physiologique de la plante lors de l'infection par la bactérie.

3. Etude de la spécificité de la résistance accrue de *wat1* : vers une immunité vasculaire

3.1 Réponse immunitaire de *wat1* à différents agents pathogènes

Le mutant *wat1* présentant une résistance accrue à la bactérie hémibiotrophe vasculaire *Ralstonia solanacearum*, l'étape suivante du travail a consisté à déterminer si cette résistance était spécifique ou non de cette bactérie. Pour cela, *wat1* a été soumis à des tests de sensibilité vis-à-vis d'agents pathogènes présentant des caractéristiques différentes (nature, style de vie, voie d'entrée et de propagation dans la plante) (Fig. 32).

Dans un premier temps, *wat1* a été inoculé par piercing de la nervure centrale des feuilles avec la souche 8004DXopAC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), bactérie hémibiotrophe vasculaire responsable de la pourriture noire des crucifères (Fig. 32-A). Cet agent pathogène entre dans la plante au niveau des hydathodes situés en marge des feuilles, aux extrémités du système vasculaire (Hugouvieux et al., 1998). Quelques instants après l'infection (0dpi), une densité d'environ 2 Log ufc/cm² est mesurée chez l'écotype sauvage sensible Col0, puis la multiplication bactérienne augmente fortement pour atteindre 7 Log ufc/cm² à 7dpi (Fig. 32-A). Dans le cas du mutant *wat1*, la quantité de bactéries présentes dans les deux allèles est comparable à celle des plantes sauvages à 0dpi (Fig. 32-A). Aux points 3 et 7dpi de la cinétique d'infection, la population bactérienne mesurée chez le mutant est réduite par rapport à Col0, puisqu'à 7dpi, une quantité de bactéries 100 à 1000 fois moindre que chez le témoin sauvage est présente chez *wat1* (Fig. 32-A). La réduction de la densité bactérienne chez *wat1* est associée à une diminution de l'intensité des symptômes,

comme l'illustrent les photographies prises à 7dpi : alors que chez Col0, une nécrose importante se développe autour du site d'infection, le mutant *wat1* ne présente quant à lui qu'une zone de chlorose limitée (Fig. 32-A). L'ensemble des données indique que *wat1* présente une résistance accrue à *Xcc*.

La réponse de *wat1* à d'autres agents pathogènes vasculaires a été testée. C'est le cas des champignons biotrophes *Verticilium dahliae* (*Vd*) et *V. albo-atrum* (*Vaa*), deux modèles d'études du laboratoire de Bart Thomma (Wageningen, Pays-Bas). Ces champignons du sol sont responsables du flétrissement de nombreuses plantes hôtes, suite à l'infection racinaire et la colonisation des vaisseaux (Fradin and Thomma, 2006). La biomasse fongique présente à 28dpi dans les plantes, après inoculation par immersion du système racinaire dans l'inoculum, a été déterminée par la mesure de l'expression du gène *ITS1* (*Internal Transcribed Spacer*) du champignon par qRT-PCR (Fig. 32-B). Que ce soit pour *V. dahliae* ou *V. albo-atrum*, l'écotype sauvage sensible Col0 présente une biomasse fongique à laquelle la valeur 1 a été arbitrairement attribuée (Fig. 32-B). Dans les deux cas, la multiplication des champignons est très réduite chez les deux mutants alléliques *wat1* par rapport à Col0 (Fig. 32-B). L'étendue des symptômes provoqués par *V. dahliae* est illustrée sur les photographies prises à 28dpi : alors que chez Col0, un flétrissement et une chlorose totale de plusieurs feuilles est visible, le mutant *wat1* ne présente quant à lui que des zones partiellement chlorosées (Fig. 32-B). Là encore, les résultats obtenus indiquent que le mutant *wat1* présente une résistance accrue à ces deux champignons vasculaires.

La réponse de *wat1* vis-à-vis du champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina*, un agent pathogène étudié dans le laboratoire d'Antonio Molina (Madrid, Espagne), a également été testée. Après inoculation par pulvérisation du champignon sur les feuilles, la biomasse fongique a été déterminée à différents temps par l'analyse de l'expression d'un gène de β -Tubuline du champignon par qRT-PCR (Fig. 32-C). A chaque point de la cinétique, la multiplication de l'agent pathogène a été fixée à la valeur arbitraire de 1 pour Col0. Que ce soit à 1, 3, ou 7dpi, la biomasse fongique mesurée chez les mutants *wat1* est significativement réduite par rapport à Col0 (Fig. 32-C). Cette réduction de la colonisation du mutant par *P. cucumerina* se traduit par une diminution de l'intensité des symptômes, comme le montrent les photographies prises à 7dpi : alors que chez Col0, les zones nécrosées, représentées par des flèches, sont répandues sur l'ensemble de la rosette, le mutant *wat1* se caractérise quant à lui par des zones nécrosées limitées (Fig. 32-C). Ces différents résultats montrent que *wat1* présente une résistance accrue à ce champignon.

Tableau V. Réponse des mutants *wat1* à différents agents pathogènes.

Agent pathogène (souche)	Nature	Style de vie	Entrée	vasculaire?¹	Sensibilité²		Résistance accrue³	
					<i>wat1-1</i>	<i>wat1-3</i>	<i>wat1-1</i>	<i>wat1-3</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i> (GMI1000)	Bactérie	Hémibiotrophe	Racines	Oui			✓	✓
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> (8004DXopAC)	Bactérie	Hémibiotrophe	Feuilles	Oui			✓	✓
<i>Verticilium dahliae</i> (JR2)	Champignon	Biotrophe	Racines	Oui			✓	✓
<i>Verticilium albo-atrum</i> (5431)	Champignon	Biotrophe	Racines	Oui			✓	✓
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (PcBMM)	Champignon	Nécrotrophe	Feuilles	Non			✓	✓
<i>Botrytis cinerea</i> (B05) ⁴	Champignon	Nécrotrophe	Feuilles	Non	✓	✓		
<i>Colletotrichum higginsianum</i> ⁴	Champignon	Hémibiotrophe	Feuilles	Non	✓	n.d.		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (DC3000)	Bactérie	Hémibiotrophe	Feuilles	Non	✓	✓		

¹ Définit si les agents pathogènes colonisent ou non le système vasculaire pour se propager dans leur plante hôte

² Sensibilité = intensité des symptômes et biomasse fongique/bactérienne comparables entre les plantes sauvages et mutantes

³ Résistance accrue = intensité des symptômes et biomasse fongique/bactérienne moins importantes chez les mutants par rapport aux plantes sauvages

⁴ Biomasse fongique non mesurée (le résultat est basé uniquement sur l'observation des symptômes)

n.d.= non déterminé

La réponse de *wat1* à la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) a également fait l'objet d'une investigation. Cet agent pathogène, qui envahit la plante par les stomates, est responsable des tâches bactériennes sur tomate (Katagiri et al., 2002). Dans ce cas, la densité bactérienne a été mesurée à différents temps après infection par infiltration des bactéries dans le mésophylle des feuilles (Fig. 32-D). Au temps 0dpi, soit quelques instants après l'inoculation, la population bactérienne déterminée chez Col0 et les mutant *wat1* est identique (environ 4 Log ufc/cm²) (Fig. 32-D). C'est également le cas à 2 et 4dpi où la multiplication bactérienne a augmenté de façon similaire dans les deux génotypes pour atteindre environ 7 Log ufc/cm² (Fig. 32-D). Conformément à une colonisation des plantes par *Pst* semblable entre Col0 et *wat1*, aucune différence dans l'intensité des symptômes n'est observée à 7dpi : la zone infiltrée avec les bactéries est nécrosée à ce point de la cinétique (Fig. 32-D). Dans le cas de *Pst*, le mutant *wat1* montre une sensibilité non altérée vis-à-vis de cette bactérie hémibiotrophe.

Pour compléter la liste des agents pathogènes testés, *wat1* a été inoculé avec les champignons nécrotrophe *Botrytis cinerea* et hémibiotrophe *Colletotrichum higginsianum* (Tab. V). Ces agents pathogènes foliaires sont responsables respectivement de la pourriture grise sur de nombreuses plantes hôtes dont la vigne et la tomate et de l'anthracnose des crucifères. L'intensité des symptômes a été comparée à celle observée pour des plantes sauvages. Que ce soit suite à une inoculation avec *B. cinerea* ou *C. higginsianum*, *wat1* présente un développement des symptômes comparable à celui observé chez les plantes sauvages Col0. Les données symptomatologiques révèlent que le mutant *wat1* présente une sensibilité non altérée vis-à-vis de *B. cinerea* et *C. higginsianum*, deux champignons non vasculaires, respectivement nécrotrophe et hémibiotrophe (Tab. V).

L'ensemble des résultats a permis de conclure que **la résistance accrue de *wat1* n'est pas spécifique de *R. solanacearum* et que *wat1* est plus résistant à tous les agents pathogènes vasculaires testés** au cours de ce travail, ainsi qu'à *P. cucumerina* (Tab. V).

3.2 Variation de la réponse de *wat1* à *R. solanacearum* et *X. campestris* pv. *campestris* selon la technique d'inoculation employée

Pour approfondir l'hypothèse que la résistance accrue de *wat1* est liée à un mode de vie vasculaire des agents pathogènes, une comparaison a été effectuée entre deux modes

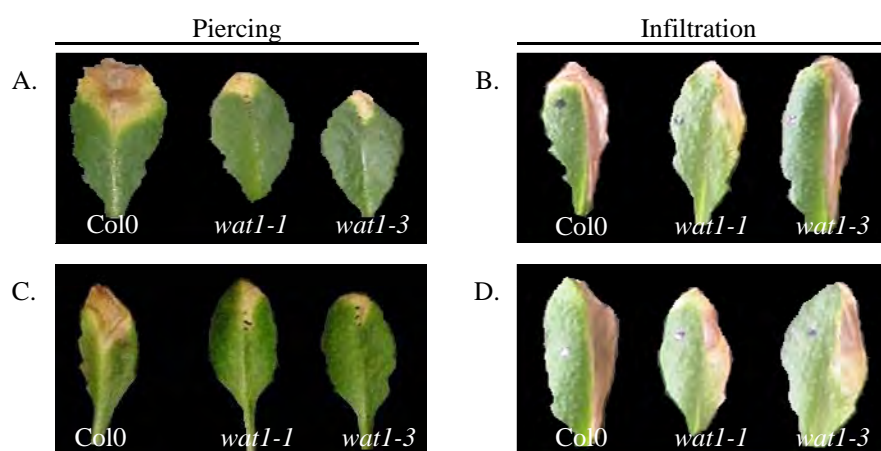


Figure 33. La résistance accrue de *wat1* à *R. solanacearum* et *Xcc* n'est effective que si les bactéries sont inoculées dans le système vasculaire.

La sensibilité des mutants *wat1-1* et *wat1-3* vis-à-vis de *R. solanacearum* GMI1000 (A, B) et *Xcc* 8004DXopAC (C, D) a été testée en comparaison avec leur témoin sauvage Col0. Les plantes (n=10 pour chaque génotype) ont été inoculées (4 feuilles par plante) à l'âge de 4 semaines, soit par piercing (gauche) ou par infiltration (droite). Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

- A. Symptômes provoqués à 7dpi par *R. solanacearum* suite à une inoculation par piercing de la nervure centrale.
- B. Symptômes provoqués à 5dpi par *R. solanacearum* suite à une inoculation par infiltration du mésophylle.
- C. Symptômes provoqués à 7dpi par *Xcc* suite à une inoculation par piercing de la nervure centrale.
- D. Symptômes provoqués à 5dpi par *Xcc* suite à une inoculation par infiltration du mésophylle.

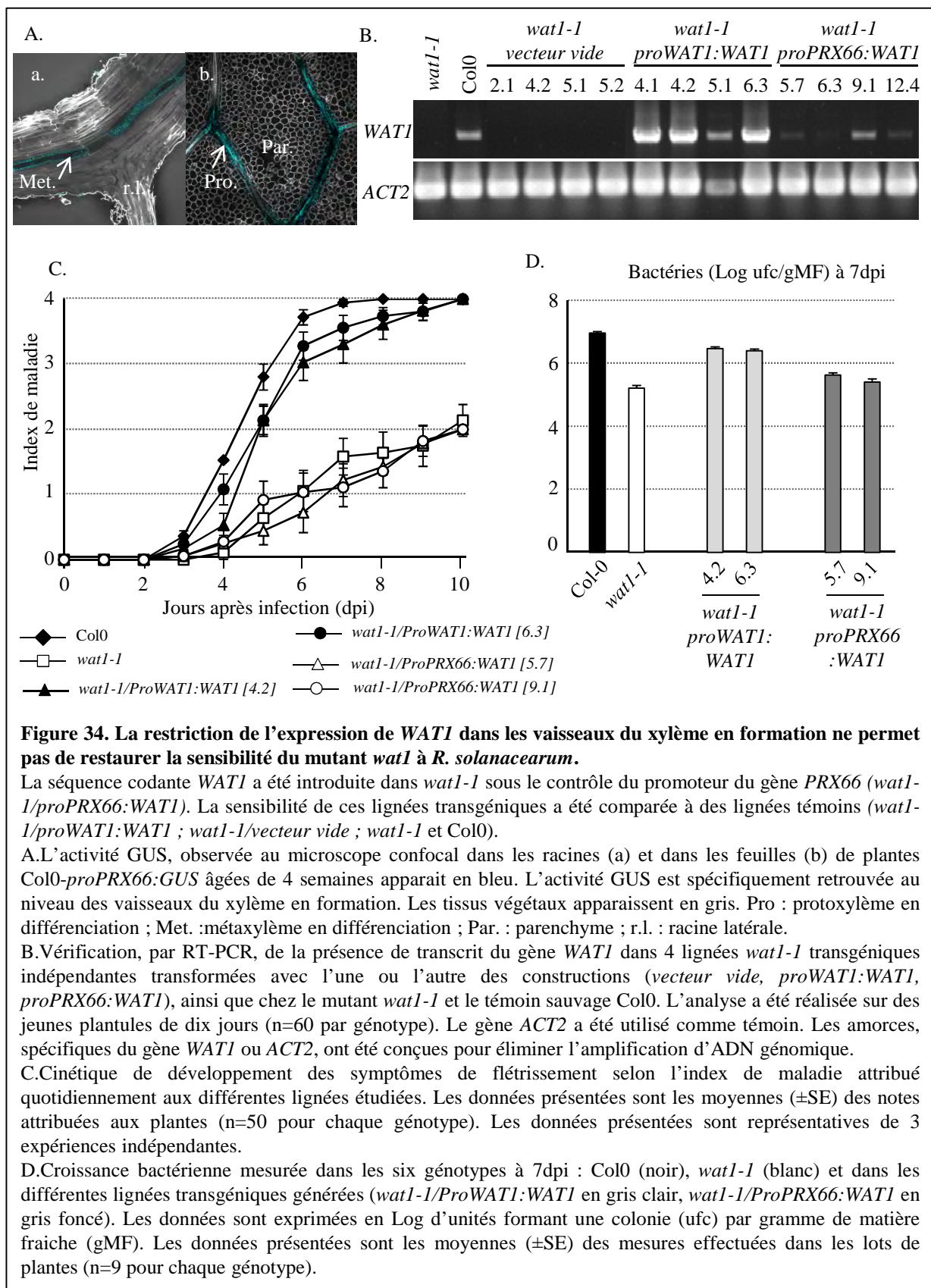
d'inoculation de deux bactéries vasculaires, *R. solanacearum* et *Xcc* : le piercing de la nervure centrale des feuilles et l'infiltration dans le mésophylle (Fig. 33). Suite à la piqûre de la nervure centrale, les bactéries se retrouvent directement en contact avec le système vasculaire, alors que suite à l'infiltration, les bactéries pénètrent par capillarité dans la face inférieure des feuilles.

La figure 33-A montre les symptômes provoqués par *R. solanacearum* suite à une inoculation par piercing. Alors que l'écotype sauvage sensible Col0 développe une large zone de symptômes, de type nécrose à proximité du site d'infection et de type chlorose en périphérie, le mutant *wat1* ne présente qu'une zone chlorosée restreinte au site d'inoculation (Fig. 33-A). En revanche, suite à une infiltration dans le mésophylle de *R. solanacearum*, Col0 et *wat1* développent tous les deux une nécrose sur toute la surface inoculée de la feuille (Fig. 33-B). Quand *Xcc* est inoculée par piercing de la nervure centrale, Col0 développe une forte nécrose entourée d'une chlorose au niveau du site d'infection, alors que le mutant *wat1* ne montre qu'une zone chlorosée plus restreinte au site d'inoculation (Fig. 33-C). En revanche, lorsque *Xcc* est infiltrée dans le mésophylle des feuilles, Col0 et *wat1* sont tous les deux sensibles puisque toute la zone infiltrée est nécrosée (Fig. 33-D).

Les résultats obtenus révèlent que, *wat1* présente une résistance pour les deux bactéries vasculaires, uniquement si elles sont mises en contact direct avec le système vasculaire (piercing). **Ces tests ont permis de mettre en avant une immunité qui semble être spécifiquement vasculaire.**

3.3 Mesure de la sensibilité d'Arabidopsis lorsque l'expression de *WAT1* est restreinte aux vaisseaux du xylème

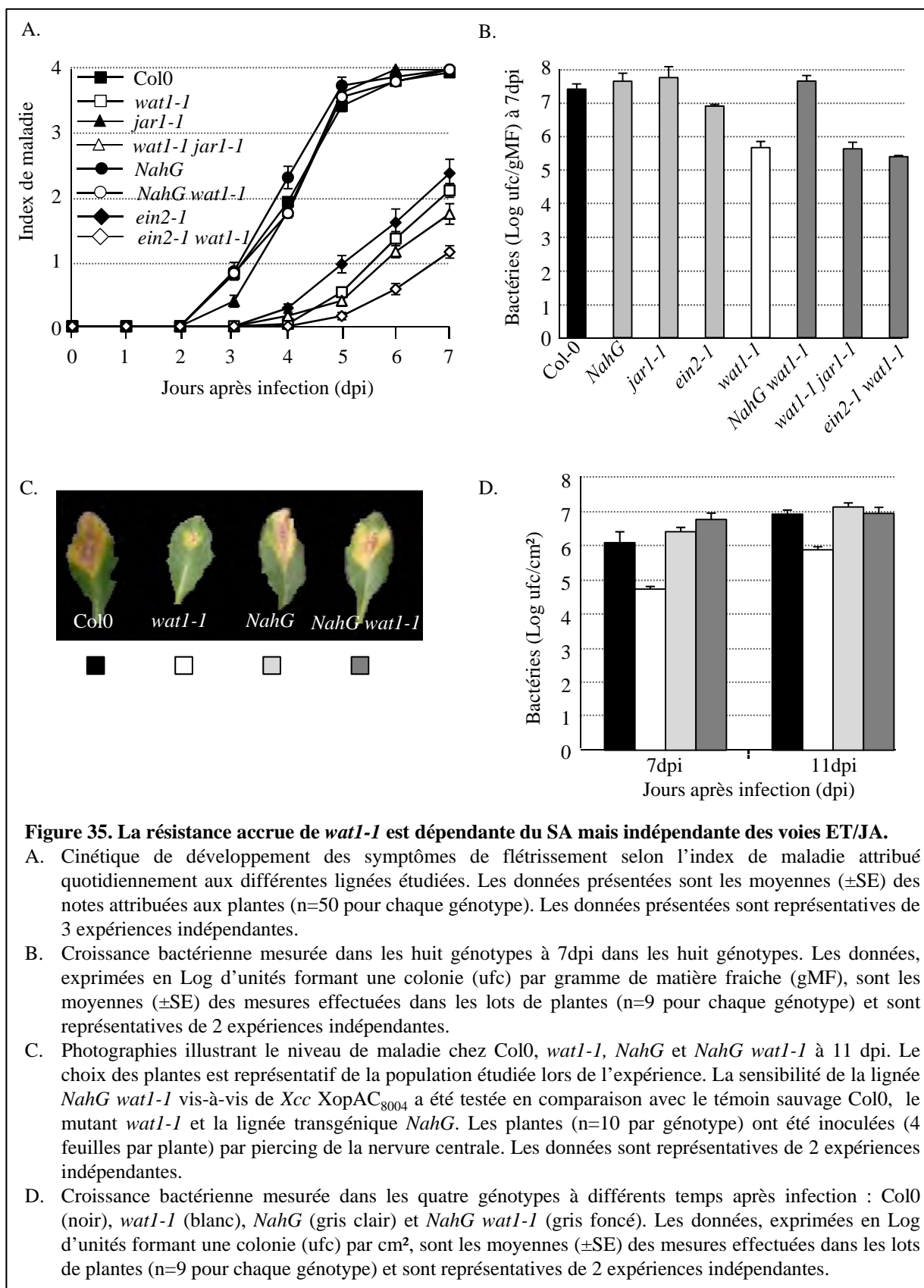
Les résultats décrits précédemment montrent une résistance accrue de *wat1* contre les agents pathogènes vasculaires et ce, lorsqu'ils sont présents dans le système vasculaire. Plus précisément, les agents pathogènes considérés (*R. solanacearum*, *Xcc*, *V. dahliae* et *V. albo-atrum*) colonisent le xylème au cours de leur cycle d'infection. Ces données apparaissent comme des pré-requis pour la résistance et laissent supposer que les mécanismes de résistance chez *wat1* peuvent être localisés au niveau du xylème. Pour tester cette hypothèse d'immunité vasculaire, des tentatives de complémentation du mutant *wat1* ont été effectuées pour essayer de restaurer la sensibilité à *R. solanacearum* lorsque le gène *WAT1* s'exprime dans le xylème.



Pour cela, des lignées *wat1-1/ProPRX66:WAT1* ont été générées, dans lesquelles la séquence codante *WAT1* a été introduite sous le contrôle du promoteur du gène *PRX66* (*Peroxydase 66*), décrit comme étant spécifique du xylème (Sato et al., 2006). Avant tout, l'expression de *PRX66* a été préalablement vérifiée dans des lignées *ProPRX66:GUS* : elle est localisée au niveau des vaisseaux en formation dans les racines et les feuilles de plantes âgées de quatre semaines, stade auquel les inoculations sont réalisées (Fig. 34-A). Des lignées *wat1-1/ProWAT1:WAT1* ont également été générées comme témoins positifs de complémentation.

L'expression du gène *WAT1* a ensuite été évaluée par RT-PCR afin de s'assurer de la présence de transcrit dans les différentes lignées transgéniques (Fig. 34-B). Lorsque la construction *ProPRX66:WAT1* a été introduite dans le mutant *wat1-1*, *WAT1* est exprimé, mais plus faiblement que chez Col0, à l'exception de la lignée [9.1] et la quantité de transcrit est variable entre les 4 lignées transgéniques (Fig. 34-B). La faible expression de *WAT1* dans ces lignées est due au promoteur qui restreint l'expression de *WAT1* au niveau des vaisseaux du xylème, par rapport à sa localisation plus étendue chez une plante sauvage. Lorsque la construction *ProWAT1:WAT1* a été introduite dans le mutant *wat1-1*, les lignées transgéniques obtenues expriment *WAT1* (Fig. 34-B). Cependant, la comparaison de la teneur en transcrits *WAT1* indique, pour les 4 lignées étudiées, un niveau d'expression supérieur à celui observé dans les plantes sauvages (Fig. 34-B). En outre, des lignées *wat1-1* dans lesquelles le vecteur vide utilisé pour les constructions a été introduit, ont également été générées. Comme attendu, aucun transcrit *WAT1* n'est détecté, tout comme chez le témoin *wat1-1* non transformé, ce qui est conforme aux données publiées (Fig. 34-B) (Ranocha et al., 2010).

Par la suite, deux lignées transgéniques pour chaque construction *ProPRX66:WAT1* et *ProWAT1:WAT1* ont été choisies en fonction du niveau d'expression de *WAT1* pour être inoculées avec *R. solanacearum* (Fig. 34-C et D). Le suivi de l'évolution des symptômes de flétrissement indique que les lignées contenant la construction *ProPRX66:WAT1* présentent un niveau de maladie comparable au mutant *wat1* (Fig. 34-C). Comme attendu, les lignées *wat1-1/ProWAT1:WAT1* ont une sensibilité restaurée à un niveau sauvage (Fig. 34-C). Les données de symptomatologies ont été complétées par la quantification des bactéries *in planta* à 7dpi. La densité bactérienne mesurée chez *wat1-1/ProPRX66:WAT1* n'est pas différente de celle mesurée chez le mutant *wat1-1*, à raison d'environ 5,5 Log ufc/gMF (Fig. 34-D). En revanche, la restauration de la sensibilité dans les lignées *wat1-1/ProWAT1:WAT1* coïncide avec une multiplication bactérienne (6,5 Log ufc/gMF) mesurée à un niveau proche de celui



observé chez le sauvage Col0 (7 Log ufc/gMF) (Fig. 34-D). Enfin, les lignées contenant le vecteur vide sont résistantes (réduction des symptômes et de la colonisation bactérienne) comme le mutant *wat1* non transformé (données non présentées).

L'ensemble de ces résultats indique que, comme attendu, **la complémentation *wat1-1/ProWAT1:WAT1* est fonctionnelle** et que la résistance accrue à *R. solanacearum* est bien due à la mutation du gène *WAT1*. Par contre, **la restriction de l'expression de *WAT1* au niveau des vaisseaux du xylème en formation n'est pas suffisante pour restaurer la sensibilité de *wat1*.**

4. Etude des voies hormonales ET-JA-SA dans la résistance accrue de *wat1* à *R. solanacearum*

4.1 Réponse phénotypique des doubles mutants

Les voies de signalisation impliquant l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) sont les plus classiquement associées aux mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. Pour déterminer si la résistance accrue de *wat1* vis-à-vis de *R. solanacearum* est liée à une ou plusieurs de ces hormones, *wat1* a été croisé avec les mutants *ein2-1*, *jar1-1* ou la lignée transgénique *NahG*, afin de générer des doubles mutants ou des lignées transgéniques altérées respectivement dans les voie ET, JA et SA. Si la résistance de *wat1* est perdue après croisement, alors la voie de signalisation hormonale affectée est considérée comme un élément clé des mécanismes de résistance. L'étude de ces différentes lignées a été menée de deux façons : par notation des symptômes (Fig. 35-A) et par quantification de la multiplication bactérienne dans les plantes (Fig. 35-B). L'évolution des symptômes des plantes *NahG* et *jar1-1* est superposable avec le témoin sauvage Col0, alors que le mutant *ein2-1* est quant à lui plus résistant (Fig. 35-A). Ces résultats sont en accord avec des données publiées précédemment pour *NahG*, *jar1-1* et *ein2-1* (Hirsch et al., 2002). Pour ce qui concerne les doubles mutants, *wat1-1 jar1-1* et *ein2-1 wat1-1* présentent une réduction de la sensibilité à *R. solanacearum* comparable voire légèrement plus forte par rapport à *wat1-1*, suggérant une éventuelle addition des mécanismes de résistance (Fig. 35-A). En revanche, la lignée *NahG wat1-1* montre une sensibilité pleinement restaurée à un niveau sauvage puisque l'index de maladie est semblable à celui de Col0 tout au long de la

cinétique (Fig. 35-A). Lors de la numération bactérienne effectuée à 7dpi, l'écotype sauvage Col0 est fortement colonisé par *R. solanacearum* (environ 7,5 Log ufc/gMF), de même que les plantes *NahG* et *jar1-1* (Fig. 35-B). En revanche, *ein2-1* et *wat1-1* qui sont les plus résistants à *R. solanacearum* accumulent moins de bactéries que les plantes sauvages, environ 7 et 5,5 Log ufc/gMF, respectivement, ce qui correspond à une réduction de l'ordre de 5 à 100 fois moins de bactéries chez ces mutants (Fig. 35-B). Dans le cas des doubles mutants, *wat1-1 jar1-1* et *ein2-1 wat1-1* présentent une multiplication bactérienne réduite par rapport à Col0 mais comparable à celle observée chez *wat1-1*, soit environ 5,5 Log ufc/gMF (Fig. 35-B). Quant à la lignée *NahG wat1-1*, *R. solanacearum* s'y multiplie de façon comparable (7,5 Log ufc/gMF) à Col0, indiquant que le degré de maladie observé est bien corrélé avec le niveau de multiplication de *R. solanacearum* dans la plante (Fig. 35-B). L'ensemble des résultats suggèrent que le SA est un élément clé de la résistance de *wat1* à *R. solanacearum* puisque **seule l'abolition de la voie SA chez le mutant *wat1-1* permet de restaurer une sensibilité totale à cette bactérie.**

Pour déterminer si le SA joue, de manière générale, un rôle dans la résistance de *wat1* vis-à-vis d'autres agents pathogènes, j'ai testé la sensibilité de la lignée *NahG wat1-1* à *Xcc* avec la technique de piercing décrite précédemment (Fig. 35-C et D). A 11dpi, comme attendu, *wat1-1* ne montre qu'une chlorose limitée au site d'infection, tandis que Col0 a développé une nécrose au niveau des points d'infection et une zone chlorosée plus étendue autour (Fig. 35-C). Les lignées *NahG* et, plus important, *NahG wat1-1* montrent des symptômes semblables à Col0, indiquant que le SA joue un rôle dans la résistance de *wat1* (Fig. 35-C). En complément à ces données de symptomatologie, une quantification de la densité bactérienne présente dans les feuilles infectées à 7 et 11dpi a été réalisée (Fig. 35-D). Alors qu'aux deux temps, le mutant *wat1-1* est colonisé à raison d'environ 4,5 Log ufc/cm² à 7dpi et à peine 6 Log ufc/cm² à 11dpi, les plantes Col0, *NahG* et *NahG wat1-1* sont quant à elles plus fortement envahies par *Xcc*, avec environ 6,5 à 7 Log ufc/cm² à 7 et 11dpi (Fig. 35-D). Les inoculations par piercing de la nervure centrale avec *Xcc* et la numération bactérienne *in planta* associée montrent que la lignée *NahG wat1-1* est aussi sensible que Col0. **La restauration totale de la sensibilité à *Xcc*, en plus de *R. solanacearum*, renforce l'hypothèse que le SA est un facteur clé d'une résistance accrue de *wat1*, généralisée aux agents pathogènes vasculaires.**

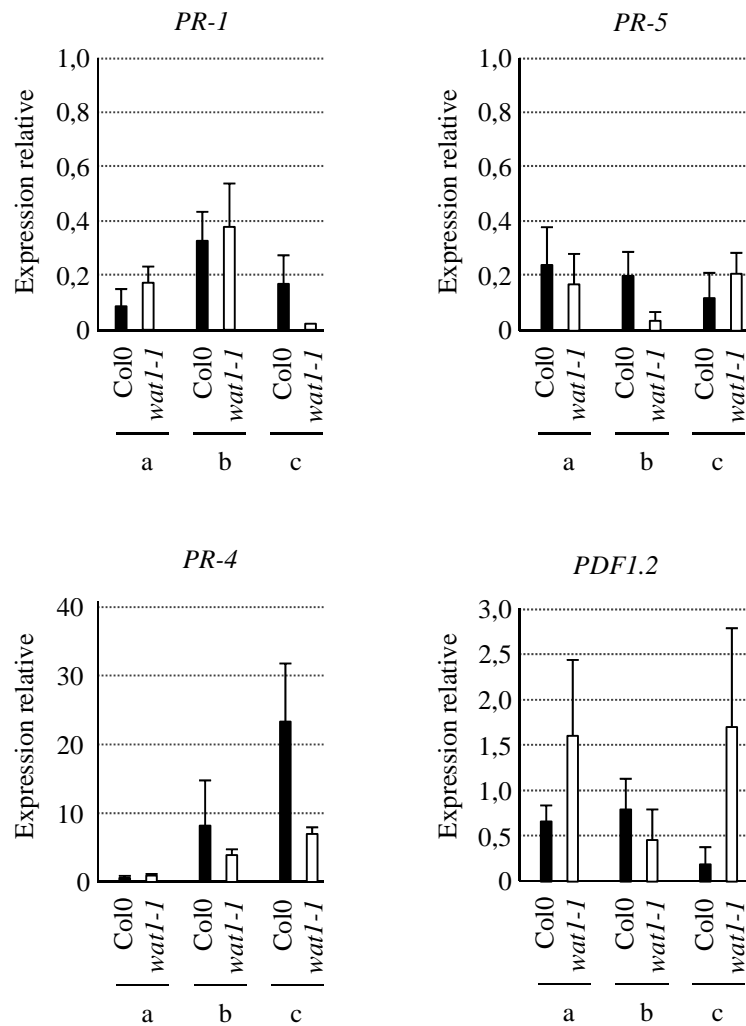


Figure 36. Expression de gènes marqueurs de défense dépendants des voies hormonales ET-JA-SA.

Mesure par qRT-PCR de l'expression des gènes *PR-1* et *PR-5* (SA), *PR-4* et *PDF1.2* (ET/JA) dans les feuilles de plantes Col0 (noir) et *wat1-1* (blanc) en absence de bactéries (a) ou après infection avec la souche GMI1000 : 1dpi (b) et 4dpi (c). Les données sont normalisées par rapport à l'expression de 3 gènes de ménage (*At1g13320*, *At3g18780* et *At5g09810*) dont l'expression est stable tout au long de la cinétique. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm SE) des mesures faites sur du matériel végétal issu de deux répliques biologiques indépendantes.

4.2 Profil d'expression de gènes marqueurs de défense

En parallèle à l'approche génétique pour évaluer le rôle des trois voies hormonales ET-JA-SA dans la résistance de *wat1*, l'expression de gènes marqueurs de chaque voie a été mesurée dans les feuilles (rosette entière) de plantes sauvages et mutantes, avant et après inoculation avec *R. solanacearum* (Fig. 36). Il s'agit des gènes *PR-1* et *PR-5* (SA), *PR-4* et *PDF1.2* (ET/JA) qui sont les plus classiquement étudiés en phytopathologie. Dans l'hypothèse où une de ces voies de signalisation serait impliquée dans la résistance, alors l'expression d'un ou plusieurs gènes marqueurs serait induite chez *wat1*. Or, aucun de ces quatre gènes n'a une expression modifiée chez *wat1* par rapport à Col0 en condition non infectée, indiquant que la mutation ne provoque aucune activation constitutive d'une des voies de défense étudiée (Fig. 36). Ensuite, au cours de la cinétique d'infection, il n'y a toujours pas de différence statistique entre les deux génotypes dans l'expression des quatre gènes marqueurs à un stade précoce (1dpi) (Fig. 36). Enfin, seul *PR-4* est moins exprimé chez *wat1* à 4dpi, point de la cinétique coïncidant avec l'apparition des symptômes chez Col0 (Fig. 36). A ce temps de l'infection, l'expression de *PR-4* est induite chez Col0 mais pas chez *wat1* (Fig. 36). L'analyse des différents gènes généralement étudiés pour leur rôle dans l'établissement de réponses de défense n'a pas permis, aux temps testés, d'identifier un effet de la mutation *wat1* sur leur expression. De ce fait, ces données indiquent que **chez *wat1*, l'établissement de la résistance à *R. solanacearum* ne fait pas intervenir des voies de signalisation classiques.**

5. A la recherche des mécanismes de résistance de *wat1* : approches sans *a priori*

Jusqu'à présent, les démarches explorées pour comprendre les mécanismes de résistance mis en jeu chez *wat1* sont basées sur des voies classiques de défense (ET-JA-SA) contre les agents pathogènes. Afin d'identifier d'autres mécanismes pouvant eux aussi être essentiels pour expliquer la résistance de *wat1*, des approches transcriptomique et métabolomique primaire comparatives ont été réalisées. La figure 37 illustre le protocole expérimental employé.

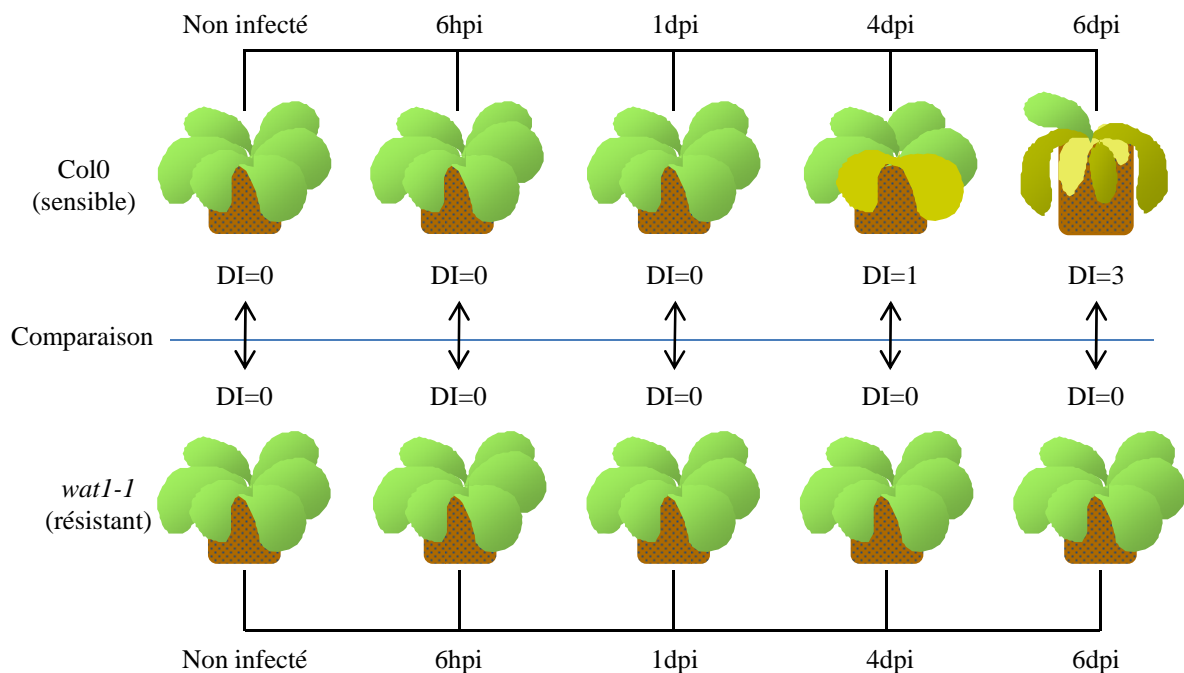


Figure 37. Représentation schématique du protocole expérimental employé pour réaliser les analyses transcriptomique et métabolomique primaire.

Des plantes sauvages Col0 et mutantes *wat1-1* âgées de 4 semaines ont été inoculées par voie racinaire avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum*. A différents temps après l'infection (6hpi, 1dpi, 4dpi et 6dpi), dix plantes des deux génotypes ont été prélevées et leurs systèmes foliaires et racinaires ont été dissociés pour l'analyse. Des plantes non infectées ont été incluses pour analyser l'effet de la mutation en absence de bactéries. Le choix des points de cinétique a été déterminé par l'évolution des symptômes chez Col0 : 4dpi correspond au jour de l'apparition des symptômes (DI=1) et 6dpi correspond au jour où le stade 3 de la maladie est atteint. Dans le cas de *wat1*, les plantes ne présentaient aucun symptôme quelque soit le temps de la cinétique. L'analyse transcriptomique comparative a été menée sur feuilles et racines distinctement, entre des plantes sauvages et mutantes récoltées le même jour et donc, pour les temps 4 et 6dpi, à des niveaux de symptomatologie différents entre les deux génotypes.

(hpi : hour post-inoculation)

5.1 Analyse du transcriptome de *wat1* versus Col0 : remarques générales

L'expression du génome complet d'*Arabidopsis* a été analysée par des microarrays dans les feuilles et les racines de plantes *wat1* et Col0, avant et pendant l'infection avec *R. solanacearum*. En comparant les données chiffrées pour chaque organe à chaque point de la cinétique (Fig. 38), quelques remarques générales peuvent être établies. Premièrement, à l'exception du temps tardif 6dpi, la mutation du gène *WAT1* modifie assez peu le niveau d'expression des quelques 22 000 gènes présents sur la puce CATMA (Fig. 38). En effet, dans les plantes non infectées, seulement 188 gènes sont dérégulés dans les feuilles et les racines (Fig. 38). D'autres données transcriptomiques obtenues dans l'équipe ont révélée qu'une soixantaine de gènes ont une expression dérégulée chez *wat1* au stade plantule de dix jours, alors que dans la base de hampes de 20cm, le nombre de gènes différentiellement exprimés chez le mutant s'élève à environ 1400 (données non publiées et (Ranocha et al., 2010)). Ces différentes analyses montrent que l'impact de la mutation *wat1* sur l'expression des gènes est croissant avec le développement des plantes. Ensuite, aux temps précoces de la cinétique (6hpi et 1dpi), très peu de gènes sont différentiellement exprimés entre *wat1* et Col0, suggérant qu'il est peu probable que les différences transcriptionnelles à ces temps de l'infection expliquent la résistance de *wat1*. En revanche, à 6dpi, l'analyse révèle une modification de l'expression d'un nombre plus conséquent de gènes chez *wat1* : 2080 dans les deux organes (Fig. 38). Cependant, il est important de noter que l'état avancé de la maladie chez Col0 (DI=3) affecte fortement la physiologie de la plante par rapport au mutant *wat1* qui est toujours exempt de tout symptôme (DI=0). Deuxièmement, les gènes sont majoritairement moins exprimés chez *wat1* que chez Col0 aux cinq temps analysés (Fig. 38). En effet, sur l'ensemble de la cinétique pour les deux organes, 1610 gènes sur un total de 2605 (62%) ont une expression réduite chez le mutant par rapport au sauvage (Fig. 38). Troisièmement, à l'exception du temps 6dpi où 1277 gènes dans les feuilles et 803 dans les racines sont différentiellement exprimés chez le mutant, les racines sont plus affectées par la mutation *wat1* que les feuilles (Fig. 38). En effet, pour les points de la cinétique cumulés (sauf 6dpi), l'expression est modifiée pour 238 gènes dans les feuilles et 387 dans les racines (Fig. 38). Il est possible d'imaginer que les mécanismes gouvernant l'interaction entre *wat1* et *R. solanacearum* soient plutôt localisés au niveau du système racinaire.

Par la suite, les points 6hpi et 1dpi (trop peu de différences entre les deux génotypes) et 6dpi (trop grande différence du niveau de maladie entre les deux génotypes) seront écartés.

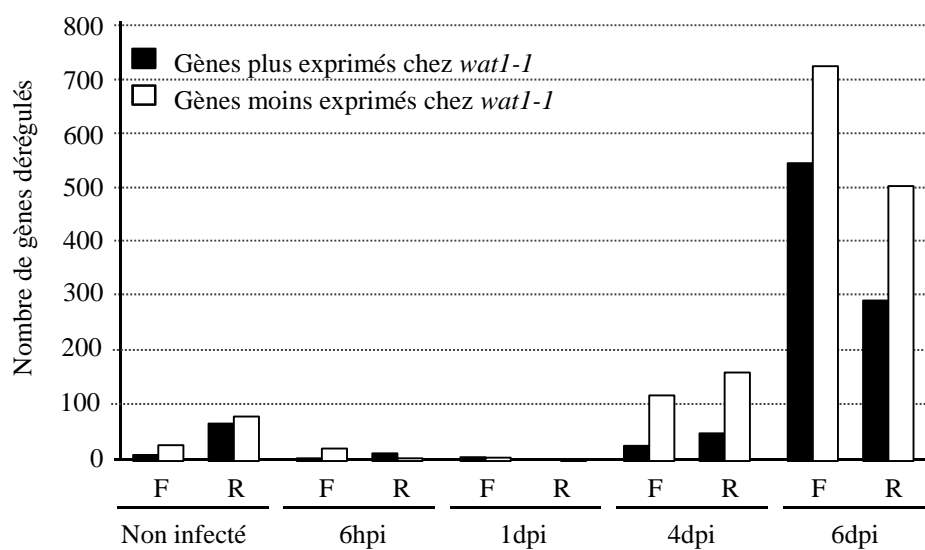


Figure 38. Nombre de gènes plus ou moins exprimés chez le mutant *wat1-1* par rapport au sauvage Col0.

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées sur feuilles (F) et sur racines (R) récoltées à partir de plantes de 4 semaines non infectées ou à différents temps après inoculation racinaire avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum*. Les données proviennent d'une analyse menée sur des plantes récoltées dans deux expériences biologiques indépendantes et correspondent au nombre de gènes dérégulés dans les deux répliques. Les gènes dont l'expression varie dans une seule des deux expériences n'ont pas été comptabilisés.

Une analyse approfondie des données transcriptomiques sera présentée par la suite pour les plantes non infectées, permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes potentiels de résistance mis en jeu chez *wat1*, et à 4dpi, le point de la cinétique où les premiers symptômes apparaissent sur les plantes sauvages.

5.2 Analyse du transcriptome de plantes non inoculées par *R. solanacearum* : recherche des mécanismes constitutifs impliqués dans la résistance de *wat1*

La comparaison du niveau d'expression des gènes dans des plantes *wat1* et Col0 non infectées permet d'étudier si la mutation a pour conséquence la mise en place d'un niveau de défense constitutivement actif. Les gènes différentiellement exprimés chez *wat1* sont listés dans les tableaux R-1 (feuilles ; 40 gènes) et R-2 (racines ; 148 gènes), regroupés à la fin de ce chapitre. Certaines catégories de gènes sont plus particulièrement décrites dans cette partie. Il s'agit des gènes de défense, d'hormones, de paroi et du métabolisme indolique, des catégories mises en avant car elles apportent des éléments susceptibles d'expliquer la résistance de *wat1*.

Analyse du transcriptome dans les feuilles non infectées :

La mutation *wat1* affecte l'expression de 40 gènes dans les feuilles, dont 17 ne sont pas associés à un processus biologique connu (Tab. R-1). Parmi les 23 autres gènes, 12 sont liés aux réponses des plantes aux stress abiotiques, oxydatifs et biotiques et sont presque tous (11 gènes) moins exprimés chez *wat1* (Tab. R-1). Il s'agit de gènes de stress abiotique comme *RAP2.6* (*Related to AP2.6*) et de gènes de stress oxydatif, *GSTU5* et *GSTU6* (*Glutathione-S-transferase class tau 5/6*), et de gènes de défense tels que *PPC1* (*Pathogen and Circadian Controlled 1*) et *DMR6* (*Downy Mildew Resistant 6*) (Tab. R-1). En revanche, les gènes marqueurs de défense associés aux voies hormonales du SA (*PR-1* et *PR-5*) et d'ET/JA (*PR-4* et *PDF1.2*) ne sont pas affectés par la mutation. Ceci étant, d'autres gènes dépendants de l'une ou l'autre de ces voies ont une expression altérée chez *wat1*. En effet, 3 gènes dépendants de la voie JA (métabolisme et signalisation) sont réprimés chez *wat1*, dont *JAR1* et *AOC1* (Tab. R-1). Deux gènes répondant à un stimulus par le SA (*ACD6*, *Accelerated Cell Death 6*) et l'ABA (*CYP707A3*) sont moins exprimés chez le mutant (Tab. R-1). Enfin, au-

Tableau VI. Liste des 17 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0, ainsi que chez les mutants *irx1-6* et *irx5-5* par rapport à leur témoin sauvage.

Les ratios correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes dans lesquelles les gènes étaient dérégulés. Les données pour les mutants *irx* proviennent des travaux d'Hernandez-Blanco et al (2007). Les gènes sont classés en 4 catégories selon leur dérégulation chez les mutants *wat1* et *irx*.

Catégorie	Caractéristique	Gène	Fonction prédite	<i>wat1</i>	<i>irx</i>
1	Réprimés chez <i>wat1</i> et <i>irx</i>	AT1G51805	leucine-rich repeat protein kinase, putative	-0,82	-1,33
		AT1G51940	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	-0,63	-2,41
		AT3G22231	PCC1 (PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1)	-1,04	-3,64
		AT3G22240	unknown protein	-0,96	-2,82
		AT4G14400	ACD6 (ACCELERATED CELL DEATH 6); protein binding	-0,78	-3,10
		AT5G03350	legume lectin family protein	-0,63	-2,74
		AT5G55450	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,96	-1,36
2	Induits chez <i>wat1</i> et <i>irx</i>	AT3G28220	Meprin And TRAF Homology (MATH) domain-containing protein	1,04	2,80
		AT3G47340	ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)	1,11	1,76
3	Réprimés chez <i>wat1</i> mais induits chez <i>irx</i>	AT1G43160	RAP2.6 (related to AP2 6)	-1,10	3,82
		AT2G29440	ATGSTU6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 24)	-1,06	1,32
		AT2G29450	ATGSTU5 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 5)	-1,09	1,52
		AT3G47420	glycerol-3-phosphate transporter, putative	-0,78	1,36
		AT4G15440	HPL1 (HYDROPEROXIDE LYASE 1); monooxygenase	-0,94	1,82
4	Induits chez <i>wat1</i> mais réprimés chez <i>irx</i>	AT1G25400	unknown protein	0,62	-1,72
		AT2G01180	ATPAP1 (PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASE 1)	0,64	-1,61
		AT5G45340	CYP707A3 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 3)	0,69	-4,18

delà de *WAT1*, dont il a été récemment montré dans l'équipe qu'il coderait une protéine capable de transporter l'auxine, aucun gène associé au métabolisme de l'auxine n'est différentiellement exprimé (Tab. R-1).

D'un autre côté, *wat1* étant issu d'un crible "paroi", il n'était pas à exclure que de nombreux gènes pariétaux pouvaient être affectés par la mutation. Or, dans les feuilles non infectées, seuls deux gènes pariétaux ont une expression dérégulée par la mutation : un gène codant une protéine kinase à domaine Lys-M est moins exprimé chez *wat1* alors qu'un gène codant une β -xylosidase (BXL1) est plus exprimé chez *wat1* (Tab. R-1). Pour tenter de mieux comprendre si différentes altérations pariétales peuvent avoir les mêmes répercussions sur la reprogrammation génique et la réponse aux agents pathogènes, la liste des gènes dérégulés dans les feuilles avant infection chez *wat1* a été comparée celles obtenues pour d'autres mutants. Il s'agit des mutants *irx1-6* et *irx5-5*, tous les deux présentant une résistance à *R. solanacearum* et *P. cucumerina*, suite à la perte de fonction de deux cellulose synthases spécifiques de la paroi secondaire (Hernandez-Blanco et al., 2007). Le tableau VI indique les gènes dérégulés dans les feuilles des trois mutants par rapport à leurs témoins respectifs, en condition non infectée. On note quatre catégories de gènes pouvant être distinguées selon si leur expression varie de la même manière ou non entre mutants et sauvages (Tab. VI). Parmi les 40 gènes dérégulés chez *wat1*, 17 le sont aussi chez les mutants *irx* (Tab. VI). Plus précisément, sur ces 17 gènes communs, 9 se comportent de la même façon chez *wat1* et *irx* et sont classés dans les catégories 1 (gènes moins exprimés chez les mutants) et 2 (gènes plus exprimés chez les mutants) (Tab. VI). Dans ces deux catégories, seuls 2 sont clairement associés à des mécanismes de défense (*PCCI* et *ACD6*) (Tab. VI). Ces comparaisons indiquent qu'en dépit d'une résistance aux mêmes agents pathogènes, *R. solanacearum* et *P. cucumerina*, il est peu probable que les mutants *wat1* et *irx* fassent intervenir les mêmes mécanismes de défense constitutive.

Analyse du transcriptome dans les racines non infectées (*wat1* versus Col0):

Dans les racines, 148 gènes ont une expression altérée chez *wat1* par rapport à Col0, dont 39 n'ont pas de processus biologique associé (Tab. R-2). Comme c'est le cas dans les feuilles, les catégories défense et stress abiotique et oxydatif sont fortement représentées avec 25 gènes, dont 14 sont moins exprimés chez *wat1* (Tab. R-2). Pour deux gènes, *GSTU5* et

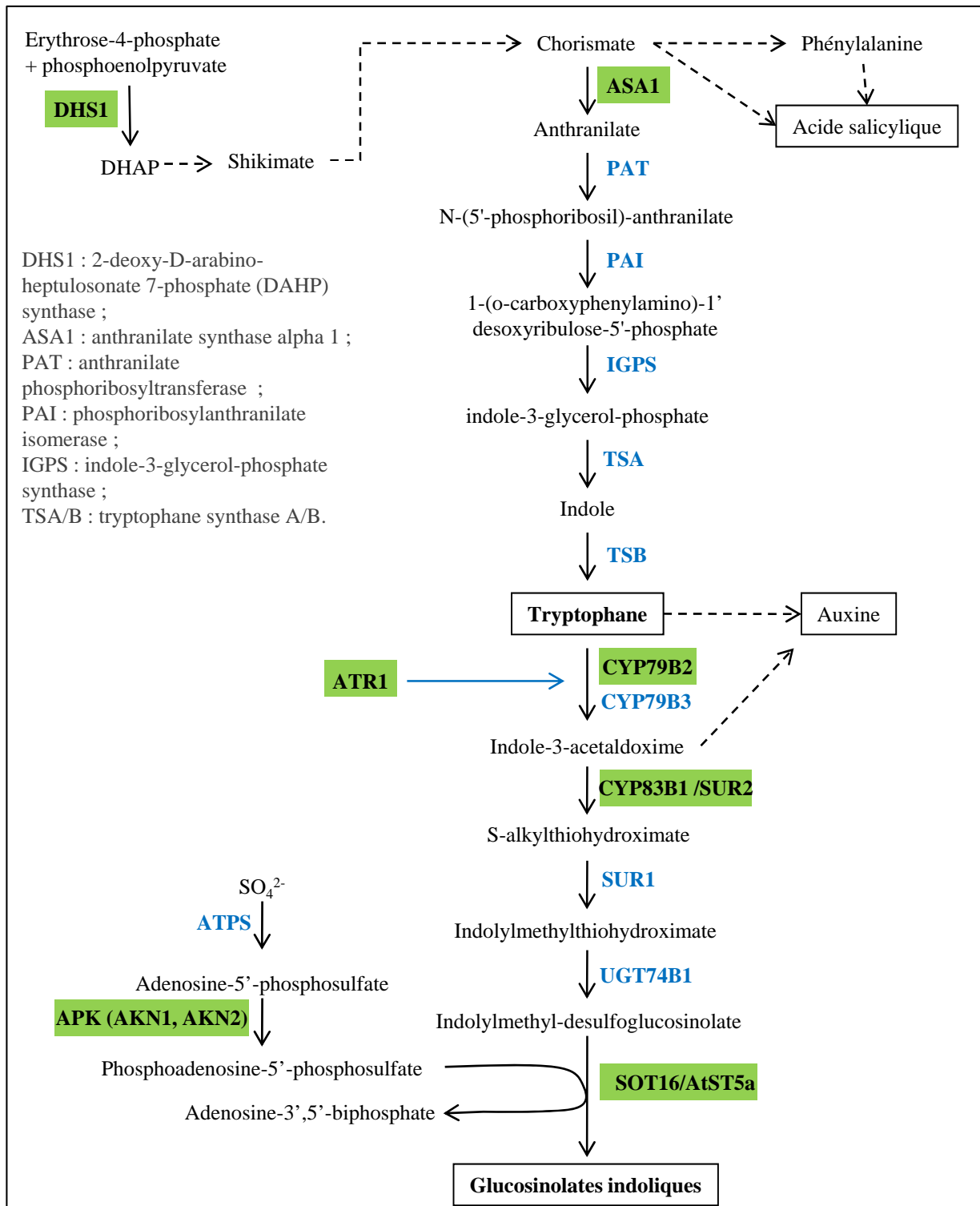


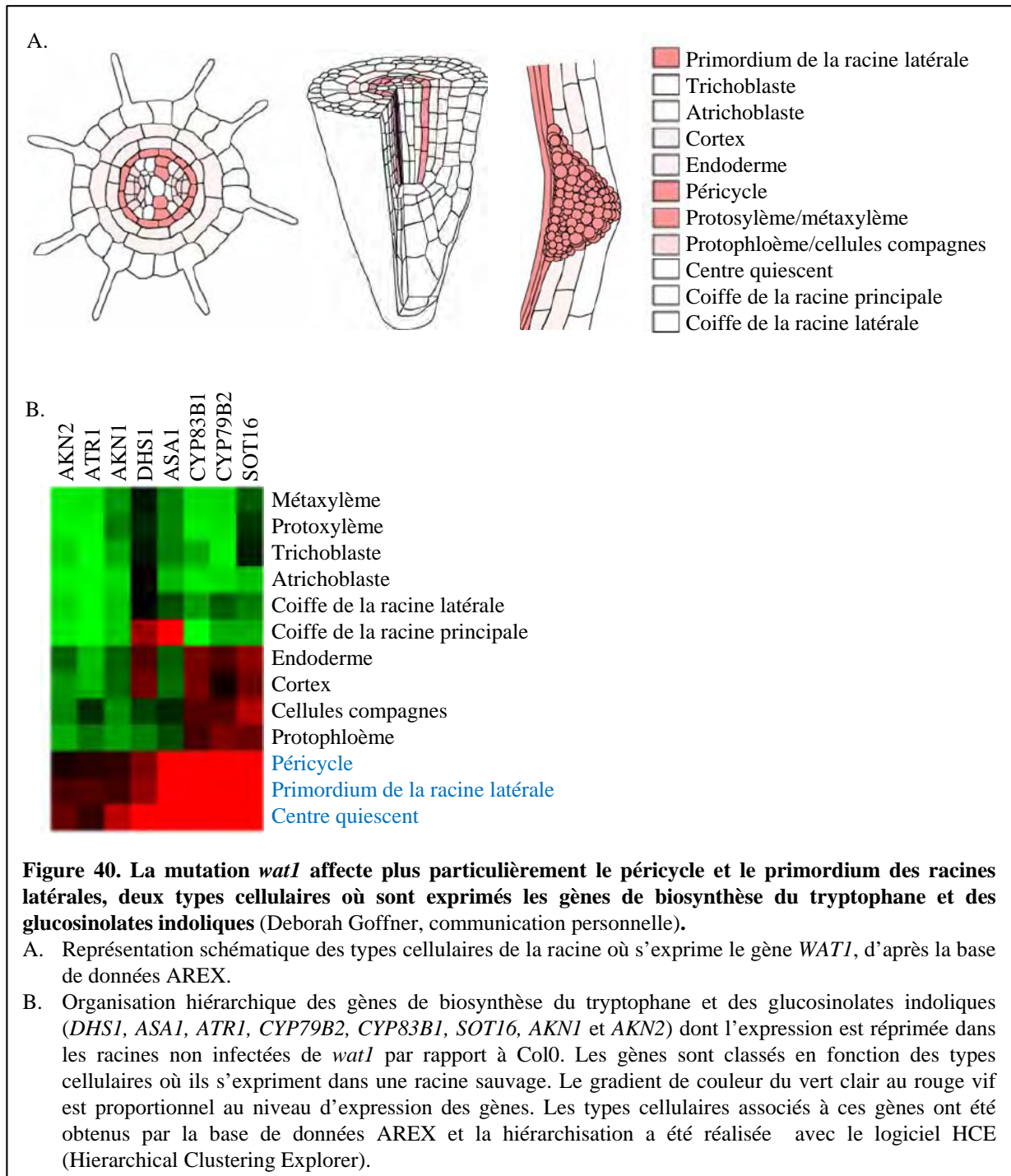
Figure 39. La mutation du gène *WAT1* affecte l'expression des gènes de synthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques dans les racines.

Représentation simplifiée de la voie de synthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques (IGS). Les gènes dont l'expression est réprimée dans les racines non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0 sont indiqués en fond vert. Les flèches en pointillées indiquent des voies conduisant en plusieurs étapes à la biosynthèse d'autres composés. La flèche bleue indique le rôle de régulateur positif joué par *ATR1* sur la voie de biosynthèse des IGS.

GSTU6, la mutation *wat1* affecte leur expression dans les deux tissus (feuilles et racines) (Tab. R-1 ; Tab. R-2). Du côté des gènes de défense, là encore, aucun gène marqueur classique n'est dérégulé par la mutation, bien que plusieurs gènes intervenant dans le métabolisme ou la signalisation hormonale, voient leur expression modifiée chez *wat1*. L'exemple le plus frappant est le JA. En effet, 7 gènes sont moins exprimés dans les racines du mutant (Tab. R-2). Il s'agit de gènes impliqués dans la biosynthèse du JA (*AOC1*, *AOC2* et *OPR3*), ou des gènes codant des protéines JAZ (*JAZ9* et *JAZ10*) impliquées dans la cascade de signalisation JA, ainsi que le gène *JAR1*, qui code l'enzyme responsable de la conjugaison du JA à l'isoleucine pour former du jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), le composé actif dans la réponse de défense dépendante du JA (Tab. R-2). Même si une dérégulation transcriptionnelle est observée au niveau du métabolisme du JA dans les racines, mais aussi dans les feuilles, l'approche génétique n'a pas permis d'attribuer un rôle direct du JA dans la résistance de *wat1*, puisque le double mutant *wat1-1 jar1-1* ne restaure pas la sensibilité à *R. solanacearum* (Tab. R-1 ; Tab. R-2 ; Fig. 35). Toujours en ce qui concerne les hormones, l'analyse transcriptomique révèle que la mutation *wat1* modifie également l'expression de quelques gènes liés à l'ABA (4 gènes), le SA (1 gène), l'éthylène (1gène) et l'auxine (4 gènes dont *WAT1*, comme attendu) (Tab. R-2).

Enfin, du côté de la paroi végétale, là encore, très peu de gènes sont affectés par la mutation, puisque seulement seuls quatre gènes pariétaux ont une expression réduite dans les racines non infectées chez *wat1* : deux gènes codant des expansines (*AtEXPB1* et *AtEXPB3*) et deux gènes codant des protéines de la famille des pectates lyases (Tab. R-2).

Le résultat peut-être le plus marquant de l'analyse transcriptomique menée dans les racines est la répression de 8 gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques (Tab. R-2). La figure 39 représente ces voies de biosynthèse et les gènes moins exprimés chez *wat1* sont indiqués en vert. Le chorismate, le précurseur du Trp, est synthétisé via la voie du shikimate. Une des étapes, catalysée par DHS1 (3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate-7-phosphate Synthase 1), est réprimée chez *wat1* (Fig. 39 ; Tab. R-2). Ensuite, la synthèse de Trp est perturbée dès sa première étape puisque le gène codant la sous-unité alpha d'une anthranilate synthase (*ASA1*), enzyme permettant la formation d'anthranilate à partir de chorismate, est réprimé chez *wat1* (Fig. 39 ; Tab. R-2). Les glucosinolates indoliques (IGS) sont synthétisés à partir du Trp. Il en est de même pour cinq autres gènes intervenant dans la formation des IGS (*CYP79B2*, *CYP83B1*, *SOT16*, *AKN1* et



AKN2) (Fig. 39 ; Tab. R-2). Le gène codant *ATR1* (Altered Tryptophan Regulation 1), un facteur de transcription qui contrôle cette synthèse d'IGS, est lui aussi réprimé chez le mutant (Fig. 39 ; Tab. R-2). Cette répression transcriptomique du Trp et des IGS est spécifique des racines puisqu'aucun de ces gènes n'est différentiellement exprimé dans les feuilles de *wat1*.

Les données transcriptomiques obtenues dans les racines non infectées attribuent, de part le nombre de gènes dérégulés, une importance au métabolisme du tryptophane et des glucosinolates indoliques dans les racines. Afin d'identifier les types cellulaires plus particulièrement affectés par la mutation *wat1* dans la racine, la base de données AREX (The Arabidopsis gene EXpression database ; <http://www.arexdb.org/>) a été explorée. En effet, AREX permet de connaître, type cellulaire par type cellulaire, le profil d'expression de tous les gènes qui s'expriment dans les racines d'une plante sauvage (Birnbaum et al., 2003; Brady et al., 2007). La figure 47-A est une représentation schématique d'une racine virtuelle qui montre l'expression de *WAT1*. L'expression est préférentiellement localisée dans le péricycle, le protoxylème, le métaxylème et le primordium des racines latérales (Fig. 40-A), en accord avec les données publiées (Ranocha et al., 2010). Par la suite, la base AREX a été exploitée pour déterminer les types cellulaires dans lesquels s'expriment les gènes de biosynthèse du Trp et des IGS. Pour cela, les 8 gènes dont l'expression est réduite chez *wat1* ont été hiérarchisés à l'aide du logiciel HCE (Hierarchical Clustering Explorer) en fonction de leur profil d'expression. La figure 40-B est une représentation schématique des données obtenues, classées par intensité de couleur (vert à rouge), proportionnelle à leur niveau d'expression dans les types cellulaires considérés. Les résultats indiquent que les gènes de biosynthèse du Trp et des IGS sont préférentiellement exprimés dans le péricycle, le primordium des racines latérales et le centre quiescent (Fig. 40-B). Cette approche a permis ⁽¹⁾ d'identifier le péricycle et le primordium des racines latérales comme lieu de biosynthèse du Trp et des IGS dans la racine ; ⁽²⁾ d'identifier les types cellulaires particulièrement affectés par la mutation *wat1*. De manière plus générale, l'analyse a été étendue à l'ensemble des 148 gènes dérégulés dans les racines non infectées et ces deux types cellulaires (péricycle et primordium des racines latérales) sont majoritairement affectés par la mutation (Deborah Goffner, communication personnelle). De façon intéressante, si *WAT1* est aussi exprimé dans le péricycle et le primordium des racines latérales, il l'est aussi dans le protoxylème et le métaxylème. Cependant, ces types cellulaires ne semblent pas être affectés par la mutation.

5.3 Analyse du transcriptome à 4dpi de plantes inoculées par *R. solanacearum* : impact de la bactérie et de la maladie sur l'expression génique

La comparaison du niveau d'expression des gènes chez *wat1* et Col0 à 4dpi permet d'étudier l'effet de la présence de la bactérie et le développement de la maladie sur l'expression génique. Pour rappel, à ce point de la cinétique, les premiers symptômes (DI=1) sont apparus chez Col0, alors que *wat1* est exempt de symptômes (DI=0) (Fig. 37). Les gènes différentiellement exprimés chez *wat1* sont listés dans les tableaux R-3 (feuilles ; 148 gènes) et R-4 (racines ; 210 gènes), regroupés à la fin de ce chapitre. Certaines catégories de gènes, importantes pour mieux comprendre les mécanismes de résistance de *wat1*, sont plus particulièrement décrites dans cette partie. Il s'agit des gènes de défense, d'hormones, de paroi et du métabolisme indolique.

Analyse du transcriptome dans les feuilles à 4dpi (*wat1* versus Col0) :

Sur les 148 gènes dérégulés dans les feuilles à ce temps de la cinétique d'infection, 35 sont classés dans les catégories défense, stress abiotique et stress oxydatif (Tab. R-3). La grande majorité (30 gènes) est moins exprimée chez le mutant (Tab. R-3). A titre d'exemples de gènes de défense, on peut citer *ACD1* (*Accelerated Cell Death 1*), *ATOSMT34* (*Osmotin 34*) ou encore *YLS9* (*Yellow-leaf-specific gene 9*) (Tab. R-3). Un seul marqueur de défense, *PR-4* (ET), est moins exprimé chez *wat1* (Tab. R-3). Concernant les voies de signalisation hormonales, un fait marquant est la réduction, chez le mutant, de l'expression de 15 gènes liés au métabolisme de l'ABA (Tab. R-3). Il s'agit de plusieurs membres de la famille "Response to Dessication" (*RD20*, *RD22*, *RD26*) ou des gènes codant des protéines de transfert de lipides (*LTP3*, *LTP4*) (Tab. R-3). Enfin, d'autres hormones ont des gènes dont l'expression est altérée chez *wat1* : auxine (3 gènes dont *WAT1*), acide salicylique (2 gènes), acide jasmonique (1 gène), éthylène (1 gène), gibbérellines (3 gènes) (Tab. R-3).

A 4dpi dans les feuilles, seuls 7 gènes en lien avec la paroi sont dérégulés chez *wat1*, dont 6 sont moins exprimés (Tab. R-3). Il s'agit par exemple d'un gène codant une expansine (*AtEXPA6*), une arabinogalactan protein (*AGP2*) ou encore une cinnamyl-alcohol dehydrogenase (*CAD5*) (Tab. R-3). Au regard de ces données, il semble qu'il n'y ait pas de composé qui soit particulièrement affectée lors de l'infection chez le mutant, vue la nature diverse des gènes dont l'expression est modifiée.

Un constat des données obtenues dans les feuilles à 4dpi indique que la plupart des gènes dérégulés (120/148) sont moins exprimés chez *wat1* par rapport à Col0 (Tab. R-3). Or, à ce stade, les plantes sauvages développent des symptômes de maladie contrairement au mutant qui est toujours asymptomatique. Ces observations nous ont conduits à poser l'hypothèse que les gènes moins exprimés chez *wat1* correspondraient en fait à des gènes induits chez Col0 lors de la maladie. Pour évaluer cette hypothèse, nos données ont été comparées avec celles obtenues chez Col0 (sensible) versus Nd-1 (résistant) suite à une inoculation avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum* (Hu et al., 2008). Cette étude a permis d'identifier les gènes induits ou réprimés lors de la maladie chez Col0 (Hu et al., 2008). Le résultat de l'étude comparative est indiqué dans le tableau R-3 où les gènes dérégulés à la fois chez *wat1* pendant la résistance et chez Col0 pendant la maladie sont marqués d'un astérisque. Sur les 148 gènes différentiellement exprimés chez *wat1* à 4dpi, 42 (soit 28%) correspondent à des gènes dérégulés chez Col0 lors de l'établissement de la maladie (Tab. R-3). Il s'agit essentiellement de gènes induits lors de la maladie (39) et moins exprimés chez *wat1* (astérisque sur fond rouge dans le tableau R-3), alors que 3 gènes sont réprimés lors de la maladie et plus exprimés chez *wat1* (astérisque sur fond vert) (Tab. R-3). Il y a donc systématiquement une corrélation inverse entre les gènes identifiés chez *wat1* et ceux identifiés par Jian Hu et ses collaborateurs, confirmant que notre hypothèse de départ était vraie : une partie des gènes moins exprimés chez *wat1* correspondent en fait à des gènes dont l'expression est induite lors de l'apparition des symptômes chez Col0. De façon intéressante, le métabolisme de l'ABA illustre particulièrement bien cette corrélation : sur les 15 gènes ABA moins exprimés chez *wat1*, 11 correspondent à des gènes induits chez Col0 lors de l'apparition des symptômes (Tab. R-3).

Analyse du transcriptome dans les racines à 4dpi :

Dans les racines, 210 gènes sont différentiellement exprimés chez *wat1* à ce stade de la cinétique (Tab. R-4). Parmi eux, 49 gènes figurent parmi les catégories défense et stress, dont 43 sont moins exprimés chez le mutant (Tab. R-4). De façon intéressante, on retrouve des gènes (*YLS9*, *ATOSMT34*, *ELI3-2*, *PR-4*) dérégulés à la fois dans les racines et dans les feuilles, indiquant qu'à 4dpi, la reprogrammation génique de défense en réponse à *R. solanacearum* est généralisée à la plante entière. Parmi les voies hormonales, l'éthylène semble être la plus affectée à 4dpi dans les racines chez *wat1*, puisque 9 gènes sont dérégulés,

Tableau VII. Métabolites primaires dont la teneur est significativement différente dans les feuilles du mutant *wat1-1* par rapport au témoin sauvage Col0, avant et/ou après infection (4dpi) avec *R. solanacearum* .

Les données sont semi-quantitatives et les valeurs correspondent à des aires sous des pics. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Student : *p-value<0,05.

Catégorie	Métabolite	Feuilles non infectées		Feuilles infectées - 4dpi	
		Col-0	<i>wat1-1</i>	Col-0	<i>wat1-1</i>
Acide aminé	Alanine	89,86 ± 17,85	88,12 ± 19,06	75,60 ± 10,04	39,05 ± 9,47 *
Acide organique	Dehydroascorbate	46,75 ± 8,36	53,29 ± 7,56	21,09 ± 3,75	29,44 ± 1,16 *
Sucre	Mannose	0,32 ± 0,03	0,40 ± 0,01 *	0,85 ± 0,15	0,76 ± 0,09
Autre	Inositol	21,46 ± 1,08	27,23 ± 1,69 *	5,65 ± 0,77	7,70 ± 1,13

Tableau VIII. Métabolites primaires dont la teneur est comparable dans les feuilles du mutant *wat1-1* par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec *R. solanacearum* .

Les données sont semi-quantitatives et les valeurs correspondent à des aires sous des pics.

Catégorie	Métabolite	Feuilles non infectées		Feuilles infectées - 4dpi	
		Col-0	<i>wat1-1</i>	Col-0	<i>wat1-1</i>
Acides aminés	Asparagine	19,33 ± 8,09	22,07 ± 9,75	180,83 ± 72,20	207,70 ± 75,91
	Aspartate	146,91 ± 21,96	155,68 ± 35,06	65,26 ± 4,98	61,91 ± 2,45
	beta-Alanine	1,01 ± 0,12	1,03 ± 0,30	1,25 ± 0,22	0,91 ± 0,06
	Citrulline	4,22 ± 2,68	8,27 ± 6,60	48,67 ± 32,02	54,90 ± 25,45
	GABA	3,00 ± 0,98	2,35 ± 0,71	6,35 ± 1,48	4,56 ± 1,75
	Glycine	0,40 ± 0,25	0,40 ± 0,14	0,22 ± 0,04	0,19 ± 0,04
	Histidine	0,41 ± 0,19	0,61 ± 0,31	4,66 ± 2,67	5,05 ± 2,51
	Isoleucine	4,18 ± 0,45	5,33 ± 1,60	69,17 ± 8,22	64,53 ± 11,84
	Leucine	5,82 ± 0,45	7,97 ± 2,80	46,69 ± 3,08	47,82 ± 13,12
	Lysine	3,41 ± 0,48	4,52 ± 1,40	37,14 ± 14,04	50,41 ± 17,91
	Methionine	1,67 ± 0,24	1,73 ± 0,32	7,67 ± 1,75	6,82 ± 1,66
	Phenylalanine	2,42 ± 0,09	2,72 ± 0,61	58,68 ± 13,30	51,09 ± 9,65
	Proline	19,75 ± 15,13	29,84 ± 14,50	13,28 ± 6,22	6,58 ± 1,37
	Serine	34,88 ± 13,58	41,59 ± 16,49	75,55 ± 10,27	72,10 ± 15,93
	Threonine	14,76 ± 2,29	16,94 ± 2,37	36,07 ± 7,17	30,53 ± 5,32
Tyrosine	2,32 ± 0,13	3,65 ± 1,92	52,85 ± 14,60	64,58 ± 17,23	
Valine	2,41 ± 0,46	2,88 ± 0,74	14,60 ± 1,73	12,47 ± 2,27	
Acides organiques	2-Aminoacétate	0,27 ± 0,13	0,19 ± 0,01	2,62 ± 0,40	2,10 ± 0,20
	2-Oxoglutarate	0,33 ± 0,05	0,32 ± 0,08	0,65 ± 0,16	0,47 ± 0,12
	Citrate	34,59 ± 4,83	26,26 ± 5,85	13,75 ± 1,87	13,63 ± 4,48
	Gluconate	0,00 ± 0,05	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,08	0,02 ± 0,08
	Glycerate	0,52 ± 0,06	0,53 ± 0,07	0,38 ± 0,05	0,45 ± 0,12
	Malate	9,14 ± 0,83	8,63 ± 0,89	11,76 ± 2,24	8,94 ± 2,68
	Pipecolate	0,75 ± 0,18	0,71 ± 0,35	0,99 ± 0,25	1,05 ± 0,28
	Pyruvate	0,37 ± 0,09	0,31 ± 0,09	0,52 ± 0,16	0,30 ± 0,22
	Succinate	4,39 ± 0,29	4,32 ± 0,86	1,57 ± 0,16	1,56 ± 0,06
Threonate	3,72 ± 0,79	4,56 ± 1,83	1,51 ± 0,31	2,29 ± 0,71	
Sucres	Arabinose	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,34 ± 0,05
	Digalactosylglycerol galactinol	10,41 ± 1,84	8,61 ± 1,49	8,46 ± 0,87	7,55 ± 1,59
	Galactose	0,61 ± 0,04	0,63 ± 0,16	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,01
	Galactose	0,53 ± 0,02	0,59 ± 0,12	0,60 ± 0,07	0,46 ± 0,10
	Ribose	0,26 ± 0,09	0,27 ± 0,07	0,2 ± 0,03	0,21 ± 0,02
	Trehalose	2,48 ± 0,59	3,20 ± 0,57	1,73 ± 0,83	1,95 ± 0,71
	U[galactinol]	0,50 ± 0,23	0,44 ± 0,06	0,16 ± 0,06	0,26 ± 0,05
	Xylose	0,85 ± 0,20	0,93 ± 0,11	0,54 ± 0,17	0,58 ± 0,03
Acides gras	monopalmitine	1,25 ± 1,42	0,54 ± 0,28	-0,98 ± 0,52	-1,01 ± 0,31
	monostearin [786]	1,10 ± 0,99	0,52 ± 0,26	-1,32 ± 0,40	-1,37 ± 0,30
	phytol	2,78 ± 0,31	2,86 ± 0,37	3,24 ± 0,07	3,93 ± 0,58
Autres	Allantoin	1,50 ± 0,66	1,56 ± 0,62	11,24 ± 3,84	9,78 ± 2,71
	Ethanolamine	56,95 ± 4,22	56,67 ± 10,44	24,24 ± 2,65	27,99 ± 10,08
	Glycerol	22,07 ± 3,96	23,69 ± 5,89	12,53 ± 1,23	14,50 ± 2,76
	uracil	0,21 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,19 ± 0,10	0,07 ± 0,18
	Urea	0,28 ± 0,90	1,13 ± 0,88	3,85 ± 2,71	4,45 ± 1,92

Tableau IX. Métabolites primaires dont la teneur est significativement différente dans les racines du mutant *wat1-1* par rapport au témoin sauvage Col0, avant et/ou après infection (4dpi) avec *R. solanacearum*.

Les données sont semi-quantitatives et les valeurs correspondent à des aires sous des pics. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Student : *p-value<0,05 ; **p-value<0,005

Catégorie	Métabolite	Racines non infectées		Racines infectées - 4dpi	
		Col0	<i>wat1-1</i>	Col0	<i>wat1-1</i>
Acides aminés	beta-Alanine	0,78 ± 0,22	0,62 ± 0,33	0,31 ± 0,05	0,13 ± 0,08 *
	Glutamate	23,50 ± 7,34	15,97 ± 7,88	18,63 ± 0,86	8,30 ± 4,82 *
	Histidine	0,78 ± 0,21	0,56 ± 0,30	1,33 ± 0,27	0,60 ± 0,20 *
	Isoleucine	5,26 ± 1,95	4,71 ± 2,78	7,85 ± 1,00	3,75 ± 1,77 *
	Phénylalanine	2,30 ± 0,67	1,63 ± 0,54	10,49 ± 0,73	2,55 ± 1,80 **
	Tyrosine	3,78 ± 1,21	3,17 ± 1,70	11,10 ± 1,45	4,98 ± 1,63 *
	Valine	2,50 ± 0,91	1,94 ± 1,12	3,09 ± 0,18	1,62 ± 0,66 *
Acides organiques	2-Aminoacétate	0,64 ± 0,22	0,50 ± 0,27	2,12 ± 0,14	0,79 ± 0,38 **
	2-Oxoglutarate	0,46 ± 0,16	0,36 ± 0,14	2,40 ± 0,78	0,68 ± 0,72 *
	Malonate	0,38 ± 0,38	0,19 ± 0,21	0,58 ± 0,15	0,24 ± 0,11 *
	Ribonate	0,57 ± 0,11	0,28 ± 0,12 *	0,53 ± 0,06	0,19 ± 0,13 *
Sucres	Trehalose	1,77 ± 0,29	1,51 ± 0,64	10,74 ± 3,50	2,27 ± 1,38 *
Autres	unk[5-nonanol]	0,26 ± 0,12	0,28 ± 0,03	0,45 ± 0,11	-0,01 ± 0,17 *

Tableau X. Métabolites primaires dont la teneur est comparable dans les racines du mutant *wat1-1* par rapport au témoin sauvage Col0, avant et après infection (4dpi) avec *R. solanacearum*.

Les données sont semi-quantitatives et les valeurs correspondent à des aires sous des pics.

Catégorie	Métabolite	Racines non infectées		Racines infectées - 4dpi	
		Col0	<i>wat1-1</i>	Col0	<i>wat1-1</i>
Acides aminés	Aspartate	39,29 ± 8,12	26,66 ± 13,02	11,94 ± 1,03	6,40 ± 3,99
	Citrulline	0,48 ± 0,14	0,40 ± 0,27	2,29 ± 1,02	1,48 ± 0,94
	Leucine	10,00 ± 3,94	9,41 ± 6,03	7,48 ± 0,94	4,30 ± 1,82
	Lysine	2,04 ± 0,88	1,99 ± 1,22	2,79 ± 0,71	2,14 ± 0,61
	Méthionine	1,29 ± 0,31	1,04 ± 0,45	3,66 ± 1,00	1,65 ± 1,18
	Ornithine	1,87 ± 0,23	1,33 ± 0,74	6,81 ± 2,54	5,22 ± 2,82
	Threonine	10,34 ± 4,40	6,96 ± 3,69	10,52 ± 0,68	6,89 ± 2,16
Acides organiques	3-OH-3-Metglutarate	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,10	0,96 ± 0,40	0,42 ± 0,20
	Dehydroascorbate	5,47 ± 0,96	2,43 ± 1,82	2,25 ± 0,20	1,08 ± 0,71
	Fumarate	2,08 ± 0,88	1,34 ± 0,60	1,67 ± 0,25	1,13 ± 0,75
	Maleate	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,02 ± 0,02
	Phosphate	325,17 ± 116,15	235,00 ± 154,46	348,54 ± 43,10	199,06 ± 117,30
	Sinapinate	0,04 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,12 ± 0,08	0,05 ± 0,07
Sucres	Arabinose	0,20 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,04
	Galactinol	0,35 ± 0,06	0,34 ± 0,12	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,06
	U[galactinol]	0,35 ± 0,04	0,26 ± 0,14	0,15 ± 0,03	0,09 ± 0,05
	Xylose	0,56 ± 0,16	0,41 ± 0,22	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,04
Acides gras	Monopalmitine	1,05 ± 0,07	0,96 ± 0,01	0,42 ± 0,10	0,33 ± 0,15
	Monostearin	1,44 ± 0,23	1,46 ± 0,33	0,39 ± 0,06	0,24 ± 0,20
	Stigmasterol	0,85 ± 0,14	0,86 ± 0,30	1,83 ± 0,24	1,37 ± 0,44
Autres	Allantoin	3,34 ± 0,82	4,04 ± 1,47	12,27 ± 1,72	7,12 ± 3,42
	Putrescine	1,57 ± 0,78	1,48 ± 0,99	3,90 ± 1,30	1,47 ± 1,42

dont 8 sont moins exprimés chez le mutant (Tab. R-4). Il s'agit notamment de gènes de biosynthèse (*ACO1*) ou de réponse à l'éthylène (*ERF*) (Tab. R-4). Nos approches génétiques ont révélé que le double mutant *ein2-1 wat1-1* présentait une résistance accrue à *R. solanacearum*, encore plus forte que le simple mutant *wat1-1* (Fig. 35), renforçant l'idée que l'éthylène est un facteur de sensibilité envers la bactérie. Des gènes liés à d'autres voies hormonales sont également différenciellement exprimés chez *wat1* : cela concerne l'ABA (6 gènes), le SA (3 gènes), l'auxine (3 gènes dont *WATI*) et les brassinostéroïdes (1 gène) (Tab. R-4). Enfin, alors que la voie de biosynthèse du Trp est encore altérée dans les racines lors de l'infection (*ASAI* et *TSAI* sont moins exprimés chez *wat1*), ce n'est plus le cas de la synthèse des IGS (Tab. R-4). Dans le cas des glucosinolates, seuls deux gènes sont moins exprimés chez le mutant : *PAD3*, codant l'enzyme intervenant lors de la dernière étape de la synthèse de camalexine, et *PAD2/RML1*, codant l'enzyme responsable de la première étape de synthèse de glutathione et nécessaire à la formation des glucosinolates (Tab. R-4).

Concernant la paroi végétale, peu de gènes voient leur expression modifiée : 15 gènes, dont 14 sont moins exprimés chez le mutant (Tab. R-4). Parmi eux, quatre gènes codant des protéines arabinogalactanes (*AGP2*, *AGP10*, *AGP12* et *AGP21*) et deux gènes codant des protéines de modification des pectines (pectin méthylesterase et pectinesterase) sont moins exprimés chez le mutant *wat1* (Tab. R-4). C'est également le cas de deux O-méthyltransférases (*OMT1* et une protéine de la famille 2 des OMT), d'une cinnamoyl-coA reductase, d'une galactosyltransférase et d'une méthionine adenosyltransférase (*MTO3*) (Tab. R-4).

5.4 Etude globale du métabolome du mutant *wat1*

En parallèle à l'analyse transcriptomique, une analyse comparative des métabolites primaires (acides aminés, acides organiques, sucres) de *wat1* par rapport à Col0 a été entreprise sur les feuilles et les racines de plantes non infectées et à 4dpi (Fig. 37). Au total, une cinquantaine de métabolites ont été dosés dans les feuilles (Tab. VII et VIII) et dans les racines (Tab. IX et X). Les données sont semi-quantitatives et correspondent à des aires de pics des chromatogrammes obtenus lors des analyses par GC-MS. Dans ce paragraphe, les valeurs seront exprimées sous le terme d'unité d'aire.

Tableau XI. Approches employées pour la caractérisation de la résistance accrue de *wat1* à *R. solanacearum*, basées sur les modifications connues par la mutation.

Composé	Données	Approche		
		Métabolomique	Microbiologique	Génétique
Trp	¹ Réduction de la teneur dans les hampes	Dosage du Trp dans les feuilles et les racines au stade 4 semaines, avant infection et à 4dpi	Croissance de <i>R. solanacearum</i> en présence de Trp	Croisement <i>wat1 x trp5</i> *
	¹ Hypersensibilité au 5-methyl-Trp			
	⁴ Diminution de l'expression de gène de biosynthèse dans les racines			
Auxine	¹ Réduction de la teneur dans les hampes	Dosage d'auxine dans les feuilles et les racines au stade 4 semaines, avant infection et à 4dpi	Croissance de <i>R. solanacearum</i> en présence d'auxine	Croisement <i>wat1 x Pro35S:AFB1</i> **
	^{1:2} Réduction du transport d'auxine dans les hampes			
	³ Fonction de transporteur d'auxine pour WAT1			
IGS	⁴ Diminution de l'expression de gènes de biosynthèse dans les racines	Dosage des IGS dans les feuilles et les racines au stade 4 semaines, avant infection et à 4 et 6dpi	Croissance de <i>R. solanacearum</i> en présence de composés dérivés des IGS	Croisement <i>cyp79b2/b3 x wat1</i> ***
SA	⁴ <i>NahG wat1</i> restaure la sensibilité à <i>R. solanacearum</i> et <i>Xcc</i>	Dosage du SA dans les feuilles et les racines au stade 4 semaines, avant infection	Croissance de <i>R. solanacearum</i> en présence de SA	Infection de plusieurs mutants affectés dans la voie SA (<i>cpr5</i> , <i>sid1</i> , <i>sid2</i>)****

Références :

¹ Ranocha et al, 2010

² Denancé, Ranocha et al, 2010

³ Ranocha et al, données non publiées

⁴ Denancé, 2011 (thèse)

Caractéristiques des lignées :

**trp5* accumule davantage de Trp

***Pro35S:AFB1* active la voie de signalisation de l'auxine

****cyp79b2/b3* ne produit plus d'IGS

*****cpr5* accumule davantage de SA, alors que *sid1* et *sid2* en produisent moins

Pour ce qui concerne les feuilles non infectées, la mutation ne semble pas beaucoup modifier le métabolisme primaire. En effet, parmi la cinquantaine de composés dosés, seuls deux sont présents en quantité légèrement plus abondante chez *wat1* par rapport à Col0 : le mannose (0,40 unités d'aires contre 0,32) et l'inositol (27,23 unités d'aires contre 21,46) (Tab. VII). A 4dpi, la teneur pour l'ensemble des métabolites varie également très peu entre les deux génotypes : seuls deux métabolites sont présents en quantités différentes entre *wat1* et Col0 (Tab. VII). Il s'agit de l'alanine, plus abondante chez le sauvage (75,60 unités d'aires contre 39,05) et le déhydroascorbate, plus abondant chez le mutant (29,44 unités d'aires contre 21,09) (Tab. VII).

Dans les racines, parmi tous les composés quantifiés, seul le ribonate est présent statistiquement en plus faible teneur chez *wat1* (0,57 unités d'aires) par rapport au sauvage (0,28 unités d'aires), en condition non infectée (Tab. IX). Ces données indiquent que la mutation *wat1* ne semble pas perturber le métabolisme primaire des racines. En revanche, le profil métabolomique est différent entre Col0 et *wat1* en réponse à *R. solanacearum*. A 4dpi, 13 composés sont en quantité moins importante dans les racines du mutant, alors que les premiers symptômes de flétrissement sont apparus uniquement chez Col0. Les différences les plus significatives concernent un acide aminé, la phénylalanine (10,49 unités d'aires chez Col0 contre 2,55 chez *wat1*) et un acide organique, le 2-aminodipate (2,12 unités d'aires contre 0,79) (Tab. IX).

L'ensemble des résultats obtenus pour les feuilles et les racines suggère qu'**une modification constitutive du métabolisme primaire ne semble pas à l'origine de la résistance de *wat1***, puisque très peu de métabolites voient leur teneur affectée par la mutation *wat1* en condition non infectée.

6. A la recherche des mécanismes de résistance de *wat1* : approches ciblées

Au début de ma thèse, plusieurs données concernant les modifications géniques, métaboliques et physiologiques induites par la mutation *wat1* étaient déjà disponibles (Ranocha et al., 2010) et d'autres ont été générés au cours de ma thèse. Ces différentes données, répertoriées dans le tableau XI, ont servi comme base d'investigation par la suite afin de déterminer un lien de cause à effet éventuel entre ces modifications et la résistance de *wat1* à *R. solanacearum*. Trois des quatre composés ciblés (Trp, auxine, IGS) font partie du

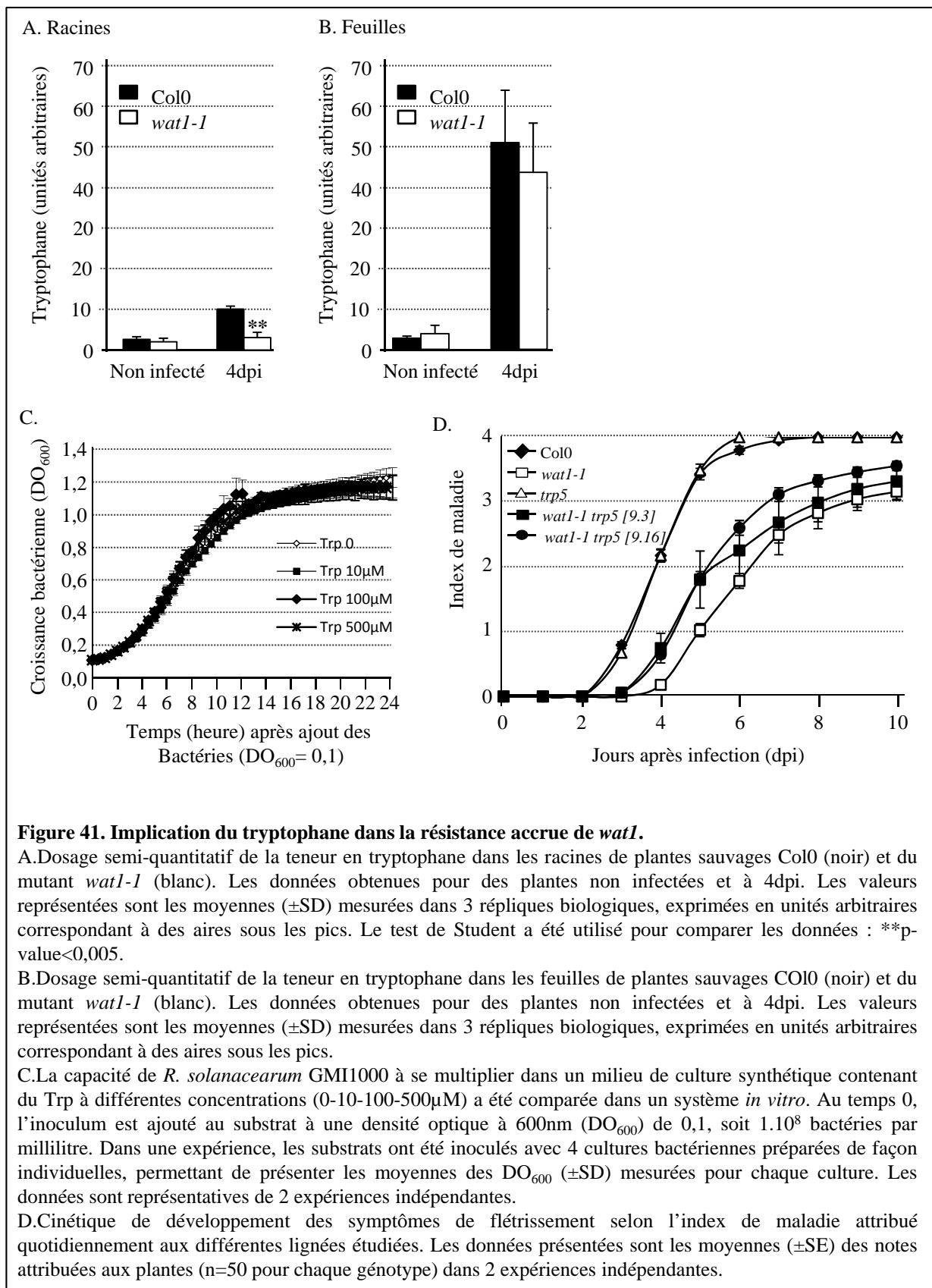


Figure 41. Implication du tryptophane dans la résistance accrue de *wat1*.

A. Dosage semi-quantitatif de la teneur en tryptophane dans les racines de plantes sauvages Col0 (noir) et du mutant *wat1-1* (blanc). Les données obtenues pour des plantes non infectées et à 4dpi. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) mesurées dans 3 répliques biologiques, exprimées en unités arbitraires correspondant à des aires sous les pics. Le test de Student a été utilisé pour comparer les données : **p-value < 0,005.

B. Dosage semi-quantitatif de la teneur en tryptophane dans les feuilles de plantes sauvages Col0 (noir) et du mutant *wat1-1* (blanc). Les données obtenues pour des plantes non infectées et à 4dpi. Les valeurs représentées sont les moyennes (\pm SD) mesurées dans 3 répliques biologiques, exprimées en unités arbitraires correspondant à des aires sous les pics.

C. La capacité de *R. solanacearum* GMI1000 à se multiplier dans un milieu de culture synthétique contenant du Trp à différentes concentrations (0-10-100-500 μ M) a été comparée dans un système *in vitro*. Au temps 0, l'inoculum est ajouté au substrat à une densité optique à 600nm (DO₆₀₀) de 0,1, soit 1.10⁸ bactéries par millilitre. Dans une expérience, les substrats ont été inoculés avec 4 cultures bactériennes préparées de façon individuelles, permettant de présenter les moyennes des DO₆₀₀ (\pm SD) mesurées pour chaque culture. Les données sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

D. Cinétique de développement des symptômes de flétrissement selon l'index de maladie attribué quotidiennement aux différentes lignées étudiées. Les données présentées sont les moyennes (\pm SE) des notes attribuées aux plantes (n=50 pour chaque génotype) dans 2 expériences indépendantes.

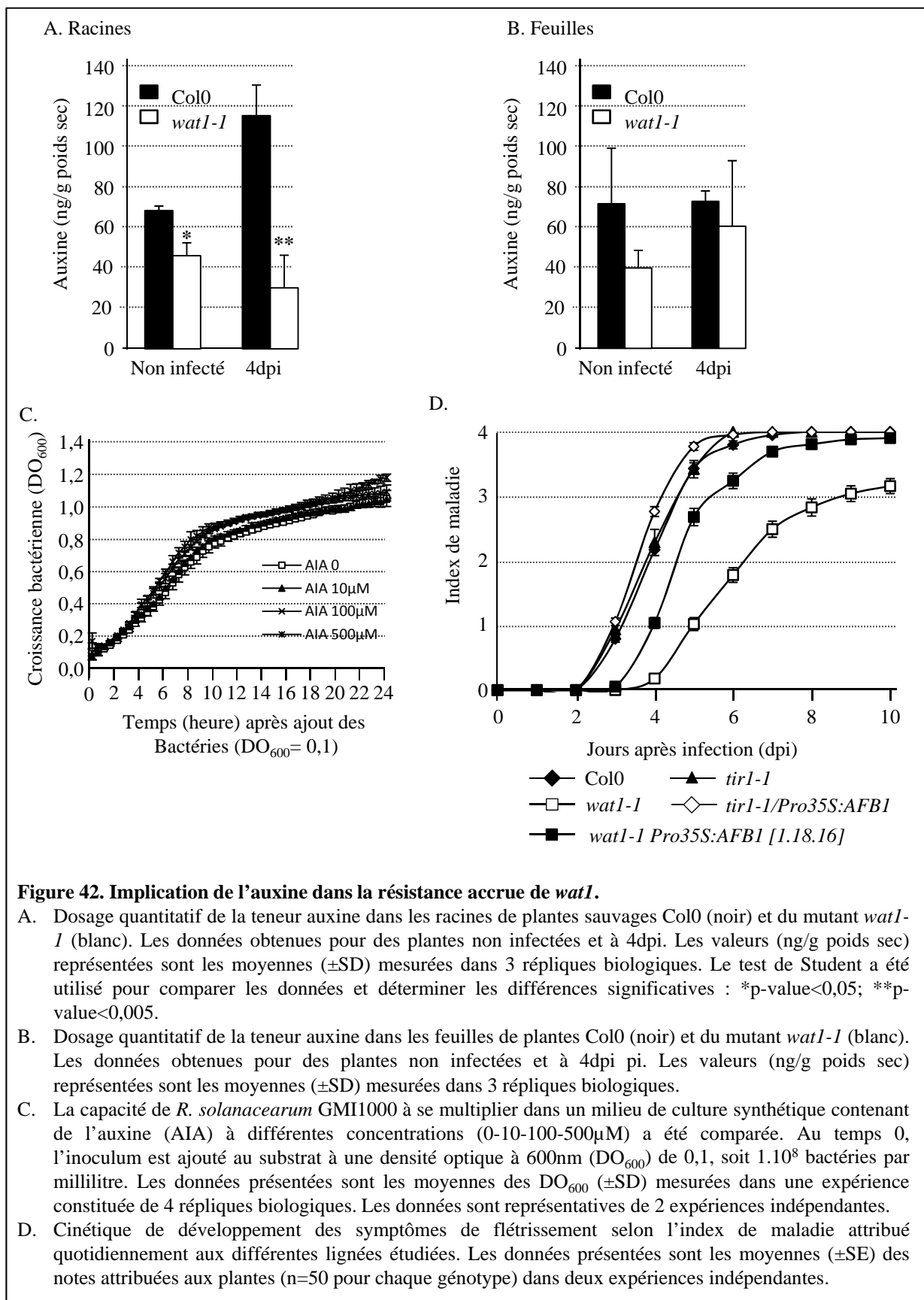
même branchement métabolique, alors que le quatrième (SA) est synthétisé à partir du chorismate, précurseur commun au Trp (Fig. 39). Pour chaque composé, des approches génétiques, métabolomiques et microbiologiques ont été entreprises, résumées dans le tableau XI, et les données obtenues sont présentées par la suite.

6.1 Le tryptophane

La quantité de tryptophane a été déterminée dans les racines (Fig. 41-A) et les feuilles (Fig. 41-B) de *wat1* et Col0, avant infection et 4dpi. Dans les racines, *wat1* contient la même quantité faible de Trp que les plantes sauvages avant inoculation (Fig. 41-A). Il avait déjà été montré dans l'équipe de la teneur en Trp est réduite dans les hampes du mutant (Ranocha et al., 2010). A 4dpi, la teneur en Trp chez *wat1* est moins abondante par rapport à celle mesurée dans les plantes sauvages infectées (Fig. 41-A). En ce qui concerne les feuilles, aucune différence de la teneur en Trp n'est mesurée en Col0 et *wat1* avant infection et à 4dpi (Fig. 41-B). Ce résultat indique qu'en dépit des symptômes développés par les plantes sauvages, cela ne modifie pas la quantité de Trp présente dans les feuilles par rapport au mutant exempt de symptômes.

En parallèle à l'approche métabolomique, la croissance de *R. solanacearum* a été mesurée *in vitro* en présence de Trp à différentes concentrations s'échelonnant entre 10 et 500µM (Fig. 41-C). En sachant que le Trp est moins abondant dans les racines *wat1* à 4dpi, l'hypothèse que le Trp favoriserait la croissance de la bactérie a été posée. Toutefois, l'apport exogène de Trp dans le milieu de culture ne modifie pas la croissance de *R. solanacearum* pour toute la gamme de concentrations testées (Fig. 41-C).

Enfin, pour déterminer si une plus faible accumulation de Trp chez *wat1* à 4dpi pouvait jouer un rôle dans la résistance accrue du mutant à *R. solanacearum*, *wat1* a été croisé avec *trp5*. Cette lignée contient une mutation de la sous-unité alpha d'une anthranilate synthase (ASA1), ce qui a pour conséquence une insensibilité au contrôle négatif qu'exerce le Trp sur sa propre synthèse (Li and Last, 1996). De ce fait, *trp5* accumule environ 3 fois plus de Trp (Li and Last, 1996). Deux doubles mutants indépendants (*trp5 wat1-1* 9.3 et 9.16) ont été générés et leur sensibilité à la bactérie a été comparée à Col0 et aux simples mutants *trp5* et *wat1-1* (Fig. 41-D). Les plantes *trp5* se comportent de la même manière que le témoin sauvage tout au long de la cinétique, et à 7dpi, les deux génotypes sont au stade DI=4 de la



maladie, indiquant que la mutation *trp5* seule ne modifie pas la sensibilité des plantes par rapport à Col0 (Fig. 41-D). Dans le cas des doubles mutants, alors que la lignée [9.3] n'est pas significativement différente de *wat1-1* à partir de 7dpi, la lignée [9.16] présente un niveau de sensibilité intermédiaire entre Col0 et *wat1-1* tout au long de la cinétique (Fig. 41-D). Ces données indiquent que l'introduction de la mutation *trp5* chez *wat1* permet de restaurer une sensibilité partielle à *R. solanacearum*. De ce fait, le tryptophane apparaît comme un élément important de la résistance de *wat1*.

6.2 L'auxine

La teneur en auxine (AIA) a été mesurée dans les racines (Fig. 42-A) et les feuilles (Fig. 42-B) de *wat1* et Col0, avant infection et à 4dpi. Dans les racines, *wat1* contient moins d'auxine que les plantes sauvages avant inoculation (respectivement 67,9 ng/g poids sec et 45,7 ng/g poids sec) (Fig. 42-A). A 4dpi, Col0 possède une teneur en auxine très significativement plus abondante que *wat1* (respectivement 114,4 ng/g poids sec et 29,9 ng/g poids sec) (Fig. 42-A). Concernant les feuilles, aucune différence significative de la quantité d'auxine entre les deux génotypes n'a été mesurée en condition non infectée et à 4dpi (Fig. 42-B).

De la même manière que pour le Trp, la croissance de *R. solanacearum* a été mesurée *in vitro* en présence d'AIA à différentes concentrations comprises entre 10 et 500 μ M (Fig. 42-C). Puisque l'auxine est moins abondante, au moins dans les racines, chez *wat1* non infecté et à 4dpi, l'hypothèse que l'auxine favoriserait la croissance de la bactérie a été posée. Cependant, l'apport exogène d'AIA dans le milieu de culture ne modifie pas la croissance de *R. solanacearum* pour toute la gamme de concentrations testée (Fig. 42-C).

Comme cela a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit, lorsque sa teneur augmente dans la cellule, l'auxine se fixe sur le récepteur TIR1, déclenchant une cascade de signalisation et l'activation de gènes de réponse à l'auxine (Lokerse and Weijers, 2009). Nous avons voulu tester si la résistance accrue de *wat1* à *Ralstonia* était le résultat d'un défaut d'activation de la voie de signalisation de l'auxine provoquée par la faible teneur mesurée dans les racines non infectées et à 4dpi chez *wat1*. Pour cela, *wat1* a été croisé avec une lignée *tir1-1* possédant la construction *Pro35S:AFB1*. Cette lignée transgénique présente une activation constitutive de la voie de signalisation de l'auxine et une sensibilité accrue à *Pst*

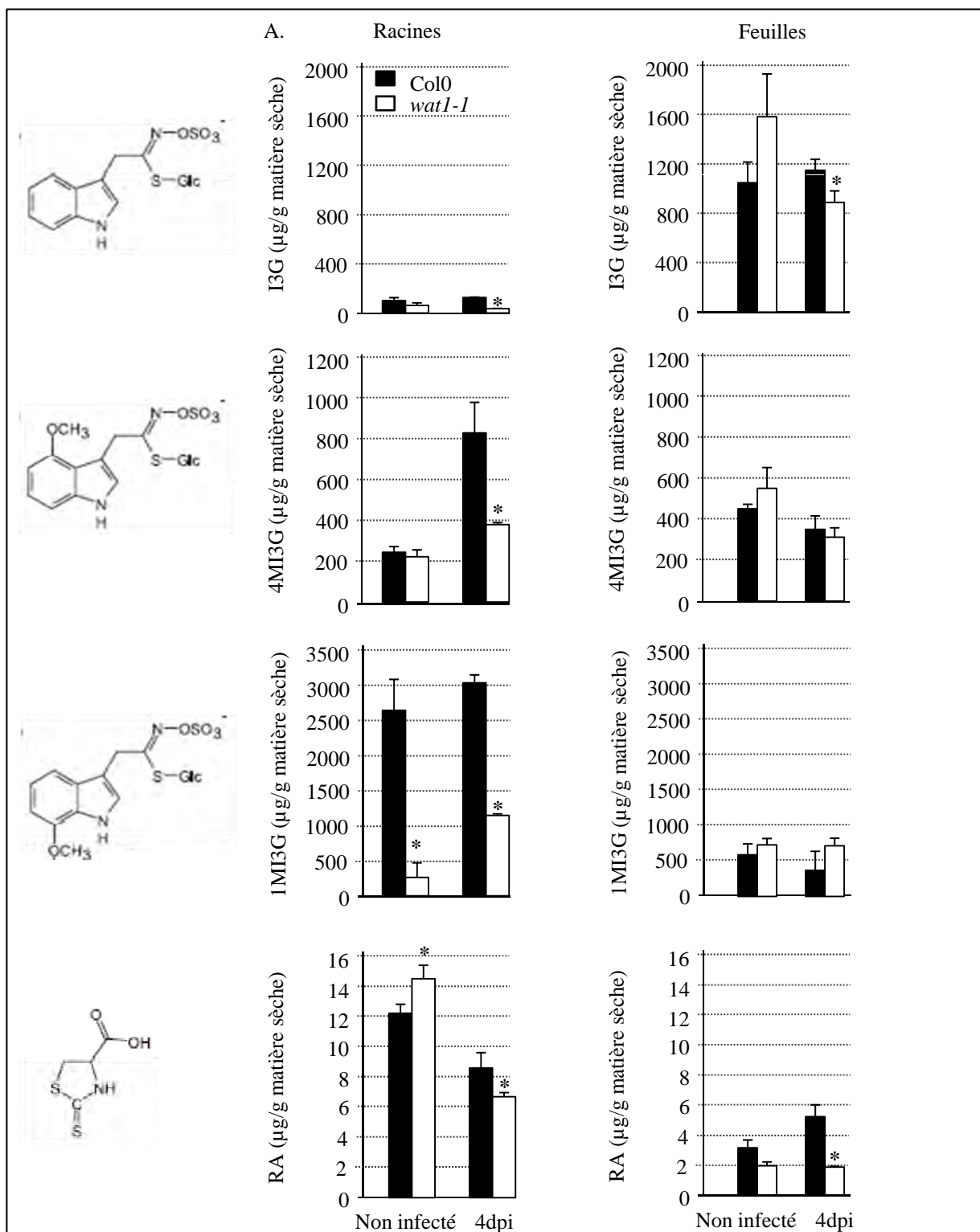


Figure 43. Implication des glucosinolates indoliques dans la résistance accrue de *wat1*.

La teneur en glucobrassicine (I3G), 4-MeO-glucobrassicine (4MI3G), en néoglucobrassicine (1MI3G) et en acide raphanusamique (RA) a été déterminée dans les racines (A) et les feuilles (B) de plantes sauvages Col0 et mutantes *wat1-1*, avant infection et 4 jours après inoculation avec *R. solanacearum*. Les données présentées, exprimées en microgramme/gramme de matière sèche (µg/g), sont les moyennes (±SD) de trois répliques biologiques (n=10). Le test de Student a été utilisé pour comparer les données et déterminer les différences significatives par rapport à Col0: *p-value<0,05.

(Navarro et al., 2006). Une lignée (*wat1-1 tir1-1/Pro35S:AFB1* 1.18.16) a été générée et sa sensibilité à la bactérie a été comparée à Col0, à la lignée *tir1-1/Pro35S:AFB1* et aux simples mutants *tir1-1* et *wat1-1* (Fig. 42-D). Les plantes *tir1-1* se comportent de la même manière que le témoin sauvage tout au long de la cinétique, et à 7dpi, les deux génotypes sont au stade DI=4 de la maladie, indiquant que la mutation *tir1-1* seule ne modifie pas la sensibilité des plantes par rapport à Col0 (Fig. 42-D). Dans le cas de la lignée *tir1-1/Pro35S:AFB1*, l'évolution des symptômes de flétrissement est comparable à Col0, avec cependant, un index de maladie moyen à 4 et 5dpi légèrement supérieurs à Col0, indiquant que cette lignée présente une légère augmentation de la sensibilité à *R. solanacearum* (Fig. 42-D). Hormis les derniers temps de la cinétique (9 et 10dpi), la lignée *wat1-1 tir1-1/Pro35S:AFB1* présente un niveau de maladie intermédiaire entre Col0 et *wat1-1*, bien que l'intensité des symptômes soit plus proche de celle observée chez les plantes sauvages (Fig. 42-D). L'ensemble des données indique que l'activation de la voie de signalisation de l'auxine chez *wat1* restaure une sensibilité partielle de la sensibilité à *R. solanacearum*. Tout comme le Trp, l'auxine joue donc un rôle dans la résistance de *wat1*.

6.3 Les glucosinolates indoliques

La teneur en différents glucosinolates indoliques (IGS) a été déterminée dans les racines et les feuilles de *wat1* et Col0, avant infection et à 4dpi (Fig. 43). Il s'agit de la glucobrassicine (I3G), de la néoglucobrassicine (1MI3G) et du 4-MeO-glucobrassicine (4MI3G). L'acide raphanusamique (RA), un composé antimicrobien issu de la dégradation des IGS par la myrosinase PEN2 (Bednarek et al., 2009), a également été intégré à l'analyse. Le choix de ces composés est basé sur le résultat des données transcriptomiques puisque la voie de biosynthèse des IGS est particulièrement réprimée dans les racines chez *wat1*. Les structures d'IGS étudiés sont indiquées sur la figure 43. Avant infection, la quantité d'I3G est comparable entre Col0 et *wat1-1* que ce soit dans les racines ou dans les feuilles (Fig. 43). En revanche, à 4dpi, *wat1* en contient moins que Col0, et ce, dans les deux organes (Fig. 43). Les données montrent également que l'I3G est plus abondant dans les feuilles par rapport aux racines, indépendamment du génotype (Fig. 43). Concernant le 4MI3G, la teneur est la même entre *wat1* et Col0 dans les racines et les feuilles non infectées, alors qu'à 4dpi, les racines du mutant en contiennent moins et la quantité mesurée dans les feuilles est comparable au

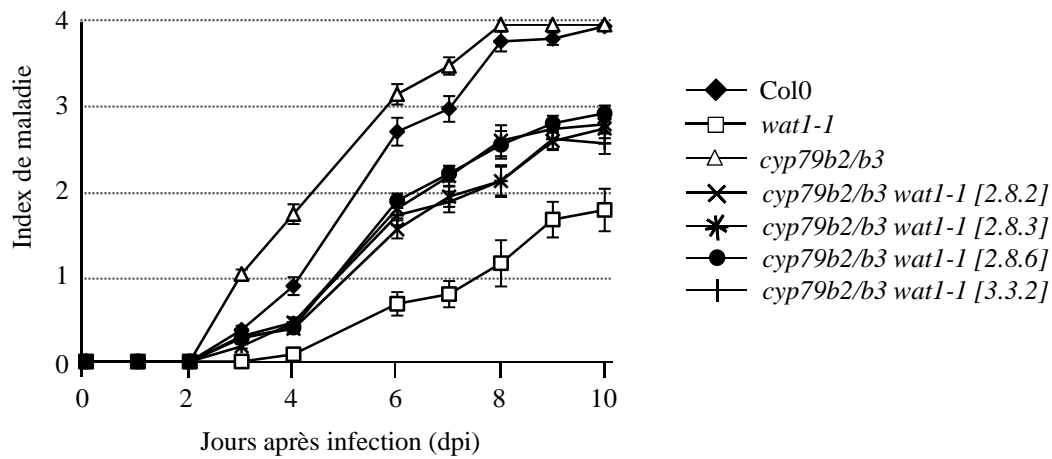


Figure 44. Implication des glucosinolates indoliques dans la résistance accrue de *wat1* (suite).

Cinétique de développement des symptômes de flétrissement selon l'index de maladie attribué quotidiennement aux différentes lignées étudiées : Col0 (losange noir), *wat1-1* (carré blanc), *cyp79b2/b3* (triangle blanc) et les 4 triples mutants *cyp79b2/b3 wat1-1* générés. Les données présentées sont les moyennes (\pm SE) des notes attribuées aux plantes ($n=50$ pour chaque génotype). Les données sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

sauvage (Fig. 43). Là encore, le 4MI3G est, de manière générale, légèrement plus abondant dans les feuilles que dans les racines et ceci, dans les deux génotypes (Fig. 43). Dans le cas du 1MI3G, il n'y pas de différences de teneur dans les feuilles Col0 par rapport à *wat1-1* avant et après infection (Fig. 43). En revanche, dans les racines, *wat1-1* contient beaucoup moins d'1MI3G que le sauvage, que ce soit en absence de bactéries (environ 10 fois moins) ou à 4dpi (environ 3 fois moins) (Fig. 43). Un résultat marquant est l'identification du 1MI3G comme l'IGS majoritairement présent dans les racines d'Arabidopsis (Fig. 43), confirmant des données obtenues chez une autre Brassicacée (Elliott and Stowe, 1971). Enfin, le RA est, quant à lui, présent en quantité plus importante dans les racines non infectées de *wat1* (14,4 µg/g de poids sec contre 12,1 µg/g de poids sec), alors que la teneur dans les feuilles est comparable entre les deux génotypes (Fig. 43). A 4dpi, la quantité de RA mesurée est moins importante chez *wat1* par rapport à Col0 dans les deux organes (Fig. 43). Ces résultats permettent de conclure que, si la mutation *wat1* n'affecte pas le métabolisme des IGS dans les feuilles, les racines de *wat1* contiennent cependant moins d'1MI3G et davantage de RA. Lors de l'infection, à 4dpi, les trois IGS et le RA sont présents en quantité moindre dans les racines chez *wat1-1* par rapport à Col0 (Fig. 43). Concernant les feuilles, alors que la teneur en 4MI3G et en 1MI3G est comparable entre les deux génotypes, *wat1* possède moins d'I3G et de RA que les plantes sauvages (Fig. 43). Dans l'ensemble, à 4dpi, la teneur en IGS est plus faible chez *wat1*, indiquant qu'à ce point de la cinétique, la résistance du mutant vis-à-vis de *R. solanacearum* n'est pas corrélée à une production massive de métabolites secondaire par rapport au témoin sauvage sensible.

De la même manière que pour le Trp ou l'auxine, la croissance de *R. solanacearum* a été mesurée *in vitro* en présence de RA afin de déterminer le pouvoir antibactérien de ce composé contre la bactérie. Cette approche a été menée au Laboratoire d'Antonio Molina (Madrid, Espagne) où il a pu être démontré que le RA était toxique pour la bactérie (Antonio Molina, communication personnelle).

Afin de déterminer le rôle joué par les IGS dans la résistance à *R. solanacearum*, *wat1* a été croisé avec le double mutant *cyp79b2/b3*, déficient en IGS, en RA et I3A (Zhao et al., 2002; Bednarek et al., 2009). Quatre triples mutants *cyp79b2/b3 wat1-1* ont été générés et leur sensibilité à la bactérie a été comparée à Col0 et aux mutants *cyp79b2/b3* et *wat1-1* (Fig. 44-B). Le double mutant *cyp79b2/b3* montre une sensibilité légèrement accrue à la bactérie comme le montre une intensité de symptômes plus élevée que chez Col0 aux premiers temps de la cinétique (3 et 4 dpi) (Fig. 44-B). Concernant les triples mutants, les quatre lignées se

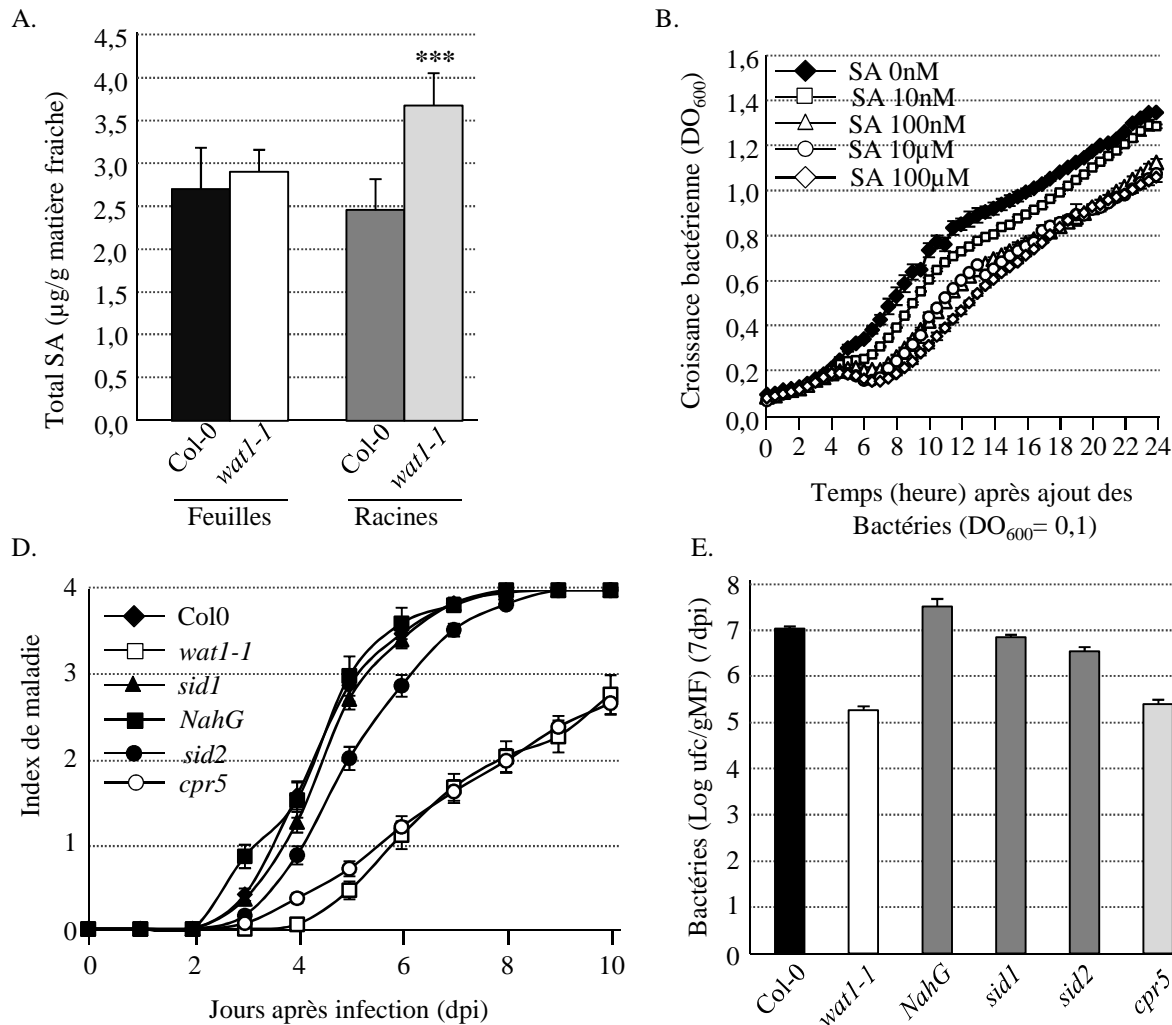


Figure 45. La capacité d'Arabidopsis à accumuler ou non du SA semble coïncider avec le niveau de sensibilité des plantes à *R. solanacearum*.

A. Dosage quantitatif de la teneur SA dans les feuilles de plantes sauvages Col0 (noir) et du mutant *wat1-1* (blanc), et dans les racines de ces deux génotypes (gris foncé et gris clair, respectivement). Les feuilles ou racines prélevées sur 5 plantes ont été groupées pour constituer un échantillon et 3 répliques biologiques ont été constituées. Les valeurs (µg/g matière fraîche) représentées sont les moyennes (±SD) mesurées dans 2 répliques techniques pour l'ensemble des répliques biologiques. Le test de Student a été utilisé pour comparer les données et déterminer les différences significatives entre Col0 et *wat1-1* : ***p-value<0,001.

B. Croissance de *R. solanacearum* GMI1000 dans un milieu de culture synthétique contenant du SA à différentes concentrations (0-10-100nM-10-00µM). Au temps 0, l'inoculum (DO₆₀₀=0,1, soit 1.10⁸ ufc/ml) est ajouté au substrat. Les données présentées sont les moyennes des DO₆₀₀ (±SD) mesurées dans une expérience, comprenant 4 répliques individuelles. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

C. Cinétique de développement des symptômes de flétrissement selon l'index de maladie attribué quotidiennement aux différentes lignées étudiées : Col0 (losange noir), *wat1-1* (carré blanc), *NahG* (carré noir), *sid1* (triangle noir), *sid2* (rond noir) et *cpr5* (rond blanc). Les données présentées sont les moyennes (±SE) des notes attribuées aux plantes (n=50 pour chaque génotype). Les données sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

D. Croissance bactérienne mesurée dans les six génotypes à 7dpi : Col0 (noir), *wat1-1* (blanc), *NahG*, *sid1*, *sid2* (gris foncé) et *cpr5* (gris clair). Les données préliminaires (1 expérience), exprimées en Log d'unités formant une colonie (ufc) par gramme de matière fraîche (gMF), sont les moyennes (±SE) des mesures effectuées dans les lots de plantes (n=9 pour chaque génotype).

comportent de façon homogène et toutes présentent un niveau de maladie intermédiaire entre le sauvage et *wat1* tout au long de la cinétique, hormis à 3dpi, indiquant que la sensibilité à *R. solanacearum* est partiellement restaurée (Fig. 44-B). Ces résultats montrent que les IGS interviennent dans les mécanismes de résistance de *wat1*.

6.4 L'acide salicylique

La teneur en SA a été mesurée dans les feuilles et les racines non infectées de *wat1-1* et Col0 (Fig. 45-A). Dans les feuilles, aucune différence significative de la teneur en SA n'a été déterminée entre les deux génotypes (Fig. 45-A). En revanche, la mutation *wat1* induit une accumulation de SA dans les racines par rapport au témoin sauvage Col0 (respectivement 3,7 µg/g matière fraîche et 2,4 µg/g matière fraîche) (Fig. 45-A).

Sachant que *wat1* est plus résistant à *R. solanacearum* et que le mutant accumule davantage de SA dans les racines, l'hypothèse que le SA pourrait agir comme un composé antimicrobien a été posée. Pour vérifier cela, la croissance de *R. solanacearum* a été mesurée *in vitro* en présence de SA à différentes concentrations comprises entre 10nM et 100µM (Fig. 45-B). Les données obtenues montrent que le SA nuit à la multiplication de la bactérie dès 10nM, puis plus fortement lorsque les teneurs augmentent, sans que cela soit proportionnelle à la quantité exogène de SA apportée dans le milieu de culture (Fig. 45-B). L'utilisation de concentrations plus importantes en SA, jusqu'à 500µM, n'affecte pas davantage la croissance de la bactérie (données non présentées). Afin d'identifier une éventuelle corrélation entre la teneur en SA dans la plante et le niveau de sensibilité à *R. solanacearum*, différents mutants affectés dans le métabolisme du SA ont été inoculés avec la bactérie (Fig. 45-C et D). Il s'agit de *sid1* et *sid2*, deux mutants de biosynthèse qui ne possèdent qu'un niveau très faible de SA (Wildermuth et al., 2001; Nawrath et al., 2002), la lignée *NahG* dans laquelle le SA est dégradé en catéchol (Lawton et al., 1995) et *cpr5* (*constitutive expression of PR genes 5*) qui accumule plus fortement du SA (Bowling et al., 1997). Dans le cas des lignées déficientes en SA, *NahG* et *sid1* développent des symptômes de façon semblable à Col0 (Fig. 45-C). Le mutant *sid2* présente quant à lui un léger retard dans la propagation de la maladie par rapport à Col0 (Fig. 45-C). En revanche, *cpr5* présente un niveau de résistance accrue à la bactérie comparable à celui observé chez *wat1* (Fig. 45-C). Les données de symptomatologies ont été complétées par la quantification des bactéries *in planta* à 7dpi dans une expérience

préliminaire qui nécessite d'être confirmée. Chez Col0, la quantité de bactéries mesurée est égale à 7 Log ufc/g MF, tandis que chez *wat1-1*, la population bactérienne présente dans les feuilles est très significativement moindre (5,2 Log ufc/g MF, soit environ 60 fois moins) (Fig. 45-D). Dans le cas où les plantes sont déficientes en SA, la multiplication est similaire à Col0, à l'exception de *sid2*, qui possède légèrement moins de bactéries que le sauvage (Fig. 45-D). Enfin, dans le cas de *cpr5*, la densité bactérienne est comparable à *wat1-1* (Fig. 45-D). L'ensemble de ces résultats montrent une corrélation entre la teneur en SA et la résistance à *R. solanacearum*.

7. Discussion des résultats et perspectives de travail

7.1 Le mutant *wat1* présente une résistance accrue à *R. solanacearum*, dépendante du stade de développement des plantes

Le point de départ de mon projet de thèse a été basé sur un résultat préliminaire montrant que *wat1* présentait une diminution de sensibilité à *R. solanacearum*. Au cours de ma thèse, j'ai pu confirmer cette résistance sur deux mutants alléliques indépendants, *wat1-1* et *wat1-3* (Fig. 30). Les expériences de dénombrement des bactéries *in planta* indiquent que *R. solanacearum* n'est pas capable de coloniser les mutants *wat1* aussi fortement que les plantes sauvages (Fig. 30). **Puisque la réduction de la sensibilité est associée à une diminution de la multiplication bactérienne chez le mutant, on peut décrire le phénotype de *wat1* comme une résistance accrue à *R. solanacearum*, et non comme une tolérance.** En parallèle, j'ai pu montrer, chez le mutant *wat1-1* complémenté avec la construction *ProWAT1:WAT1*, une sensibilité totalement restaurée, caractérisée par une intensité de maladie et une croissance bactérienne comparable au témoin sauvage (Fig. 34). Ces résultats confirment que **la perte de fonction du gène *WAT1* est responsable de la résistance accrue vis-à-vis de *R. solanacearum*.**

Il est connu que l'âge des plantes au moment de l'infection influe sur l'issue d'une interaction avec des agents pathogènes : il s'agit de l'ARR (Age-Related Resistance). L'ARR augmente avec l'âge des plantes chez *Arabidopsis* suite à l'inoculation avec *P. syringae* pv. *tomato* et *maculicola* (Kus et al., 2002; Carviel et al., 2009), chez *N. benthamiana* infecté par

Phytophthora infestans (Shibata et al., 2010) ou chez le riz en interaction avec *M. grisea* (Xie et al., 2011). De façon intéressante, la mise en place de l'ARR a été décrite comme dépendante de la voie SA, puisque qu'elle s'accompagne d'une induction du gène marqueur *PR-1* et que les plantes *NahG* ne développent pas d'ARR (Kus et al., 2002; Carviel et al., 2009; Shibata et al., 2010; Xie et al., 2011). Dans le cas du pathosystème *wat1* – *R. solanacearum*, j'ai étudié l'effet de l'âge des plantes sur la résistance du mutant à la bactérie. L'objectif visait à déterminer l'importance de l'âge pour la réponse d'*Arabidopsis* à *R. solanacearum* et identifier le stade de développement le plus jeune pour lequel une forte résistance accrue est observée chez *wat1* par rapport à Col0. Pour cela, les deux génotypes ont été inoculés à différents stades de développement, compris entre 2 et 5 semaines, et la sensibilité à la bactérie a été évaluée (Fig. 29). Les résultats obtenus correspondent à une ARR puisque chez *wat1*, la résistance à *R. solanacearum* est moins importante chez les plantes jeunes par rapport au sauvage, comme en atteste le resserrement entre les index de maladie attribués aux deux génotypes aux stades jeunes (Fig. 29). De plus, des tests d'infection dans un pathosystème in vitro dans lequel des plantules d'une dizaine de jours sont inoculées ont montré qu'à ce stade de développement, *wat1* est aussi sensible à *R. solanacearum* que Col0 (Catherine Digonnet, communication personnelle). Ces résultats indiquent que les mécanismes de résistance de *wat1* se mettent en place à partir d'environ quatre semaines, au stade rosette. De façon intéressante, dans nos conditions de cultures (non limitantes), les premières altérations phénotypiques sont également visibles à ce stade, à savoir la réduction de la taille de la rosette (Ranocha et al., 2010). L'absence d'un quelconque phénotype à un stade jeune dans des conditions normales de culture pourrait s'expliquer par une éventuelle compensation de la mutation *wat1* par un autre membre de la famille WAT1 aux stades jeunes de développement.

7.2 La régulation transcriptionnelle de *WAT1* n'est pas un élément clé de l'établissement de l'interaction compatible entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum*

Afin de déterminer l'expression spatio-temporelle du gène *WAT1* au cours de l'interaction avec *R. solanacearum*, deux approches complémentaires ont été employées : l'analyse quantitative par qRT-PCR et l'analyse de l'activité GUS dans des lignées transgéniques Col0-*ProWAT1:GUS* (Fig. 31). Ces deux types d'expériences apportent

finalement la même information : l'expression de *WATI* diminue en présence de la bactérie. Les données de qRT-PCR obtenues dans des plantes âgées de 4 semaines indiquent que la réduction de l'expression de *WATI* intervient à 4dpi dans les racines, et à 6dpi dans les feuilles, correspondant à des stades tardifs de l'infection, ce qui est en accord avec des données publiées (Fig. 31) (Hu et al., 2008). Ces données indiquent qu'une dérégulation de *WATI* au niveau transcriptomique ne jouerait pas un rôle déterminant dans les premiers temps de l'interaction entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum*. La lignée Col0-2x*Pro35S:WATI*, dans laquelle *WATI* est faiblement surexprimé, n'induit pas une hypersensibilité des plantes à la bactérie, ce qui semble confirmer cette hypothèse (Fig. 30). Cependant, on ne peut pas exclure l'existence d'une régulation fine de la protéine WAT1 lors de l'interaction avec *R. solanacearum*. En effet, la relocalisation de protéines a déjà été décrite dans le pathosystème *Arabidopsis* – *R. solanacearum* : RRS1-R migre du cytoplasme au noyau lorsque l'effecteur PopP2 de la bactérie est présent, de même que RD19, initialement localisée dans la vacuole (Deslandes et al., 2003; Bernoux et al., 2008). Nous avons pu montrer que la protéine est localisée sur le tonoplaste (Ranocha et al., 2010). Il sera intéressant d'étudier si la localisation de WAT1 est modifiée en réponse à une infection par *R. solanacearum*, en exploitant des lignées *Pro35S:WATI-GFP* disponibles dans l'équipe. Ces lignées ont été exploitées pour montrer, de façon préliminaire, que la localisation tonoplastique de WAT1 ne semble pas modifiée par un apport exogène en auxine (Deborah Goffner, communication personnelle).

7.3 Le mutant *wat1* présenterait une immunité vasculaire

L'inoculation avec divers agents pathogènes a révélé que *wat1* présente systématiquement une résistance accrue à tous les agents pathogènes vasculaires (bactéries et champignons) testés au cours de ce travail (*R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *V. dahliae* et *V. albo-atrum*) (Fig. 32 ; Tab. V). De plus, lors d'expériences d'infection par infiltration ou piercing des feuilles avec *R. solanacearum* et *Xcc*, *wat1* est résistant seulement lorsque les bactéries ont été inoculés au contact direct du système vasculaire, suite au piercing de la nervure centrale (Fig. 33). Ces données tendent vers l'hypothèse d'une **immunité vasculaire** de *wat1*. Ce terme désigne un phénotype spécifiquement dépendant du système vasculaire, comme par exemple la fonction d'avirulence de l'effecteur XopAC de *Xcc* qui

confère une résistance uniquement lorsque la bactérie est inoculée par piercing de la nervure centrale chez l'écotype Col0 d'*Arabidopsis* (Xu et al., 2008). Deux hypothèses pourraient expliquer l'immunité vasculaire : soit l'agent pathogène vasculaire ne trouverait pas suffisamment de source de nutrition dans la sève pour assurer sa multiplication chez la plante hôte, soit la sève contiendrait un (des) composé(s) qui nuirai(en)t à la croissance de l'agent pathogène.

Il a été récemment démontré que la protéine XSP10 (Xylem Sap Protein 10kDa), présente dans le xylème de tomate, est nécessaire pour une sensibilité totale des plantes au champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersycum* (*Fol*) (Krasikov et al., 2011). En effet, les plantes transgéniques dans lesquelles XSP10 est inactivée présentent une plus grande résistance à *Fol*, suggérant deux rôles possibles pour la protéine : soit XSP10 serait une cible nécessaire au champignon pour induire le développement de la maladie, soit elle serait un régulateur négatif de défense (Krasikov et al., 2011). Chez *R. solanacearum*, une corrélation existerait entre l'apport en calcium dans le sol, la composition du xylème (acides aminés, acides organiques, sucres) et l'intensité de symptômes provoqués par la bactérie sur tomate (Chellemi et al., 1998). L'augmentation de la teneur en calcium provoquerait une diminution des symptômes, soit par une inhibition directe des enzymes pectinolytiques de la bactérie par le calcium, soit de façon indirecte par le renforcement de la paroi par le calcium, la rendant moins facilement dégradable par les enzymes bactériennes (Chellemi et al., 1998). Il est intéressant de noter que chez *wat1*, 4 gènes codant des protéines capables de lier le calcium (calmoduline-like, CML) sont induits dans les racines (CML10, CML45, CML46 et une calmodulin-binding protein) (Tab. R-2). Cela suggère une éventuelle modification de la teneur en calcium dans les racines chez *wat1*.

Dans des expériences préliminaires, j'ai pu tester la capacité de *R. solanacearum* à se multiplier en présence de sève *wat1* ou Col0. D'après les premiers résultats, alors que la bactérie se multiplie dans la sève sauvage aussi bien que dans du milieu de culture adapté à sa croissance, la multiplication de la bactérie dans la sève *wat1* est très réduite. Ces données, restant à confirmer, sembleraient indiquer que *R. solanacearum* ne serait pas capable de se multiplier aussi fortement chez *wat1* par rapport à Col0. Dans le cas où ces résultats seraient validés, une perspective séduisante consisterait à identifier biochimiquement le(s) composé(s) qui distinguent la sève *wat1* de celle de Col0.

Enfin, l'hypothèse de l'immunité vasculaire a été évaluée par une approche génétique en restreignant l'expression de *WAT1* au niveau des vaisseaux du xylème en formation en

plaçant la séquence codante sous le contrôle du promoteur de *PRX66*. Les résultats préliminaires suggèrent que cette stratégie ne permet pas de restaurer la sensibilité à *R. solanacearum* (Fig. 34). Les résultats pourraient être expliqués par une expression spatio-temporelle trop restrictive de *PRX66*. En complément, une étude pour restaurer la sensibilité de *wat1* pourrait être entreprise avec une construction *ProSUC2:WAT1*, qui ciblerait l'expression spécifiquement dans le phloème. Cependant, le choix d'opter uniquement pour un promoteur spécifique du xylème a été basé sur le cycle infectieux des agents pathogènes vasculaires testés qui colonisent les vaisseaux du xylème et non pas le phloème.

7.4 La résistance accrue de *wat1* est dépendante du métabolisme indolique et de l'acide salicylique

Basée sur nos connaissances antérieures sur *wat1*, l'hypothèse qu'un déséquilibre de l'homéostasie de l'auxine soit au cœur de la résistance a été explorée. Dans les feuilles, aucune différence dans la teneur en auxine n'a été mesurée chez le mutant par rapport au sauvage (Fig. 42). Alors qu'il était déjà établi que les hampes de *wat1* contiennent moins d'auxine que celles des plantes sauvages (Ranocha et al., 2010), les analyses métabolomiques menées au cours de ce projet montrent que les racines de *wat1* possèdent elles aussi moins d'auxine (Fig. 42). Contrairement à ce qu'il se passe dans les hampes, aucune dérégulation des gènes liés au métabolisme de l'auxine n'intervient dans les racines. Les données métabolomiques suggèrent qu'une faible teneur en auxine serait un avantage pour la plante lors de l'interaction avec *R. solanacearum*, bien que les tests de croissance *in vitro* de la bactérie n'aient pas permis de démontrer que l'auxine favorise sa multiplication (Fig. 42). D'après les résultats de métabolomique, la quantité d'auxine dans les racines augmente chez Col0 mais pas chez *wat1* suite à l'infection (Fig. 42). Des données datant d'il y a une cinquantaine d'années montrent que de l'auxine est produite dans les feuilles de tabacs infectés par la bactérie (Sequeira and Kelman, 1962; Sequeira and Williams, 1964). L'origine de cette production reste malgré tout à déterminer : on ne peut pas exclure que l'AIA synthétisé dans les plantes infectées ne soit pas exclusivement d'origine végétale puisque *R. solanacearum* est capable elle aussi de produire de l'auxine (Valls et al., 2006). Un lien entre la signalisation, le métabolisme ou le transport de l'auxine et la réponse aux agents pathogènes a souvent été décrit (Kazan and Manners, 2009). Plusieurs travaux décrivent

l'auxine comme un facteur de sensibilité. Par exemple, chez le riz, un traitement exogène avec de l'auxine augmente la sensibilité à *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Ding et al., 2008). Les auteurs ont émis le modèle suivant : l'infection par la bactérie induit une accumulation d'auxine qui serait responsable d'un relâchement de la paroi végétale due à l'activation d'un groupe particulier d'enzymes pariétales, les expansines. Par conséquent, cela réduirait la capacité de la paroi à se défendre efficacement lors d'une attaque par *Xoo* (Ding et al., 2008). De façon intéressante, sur les quatre gènes pariétaux dont l'expression est réduite dans les racines de *wat1*, deux gènes codent des expansines (*AtEXPB1* et *AtEXPB3*) (Tab. R-2). Un autre exemple, chez *Arabidopsis*, est l'augmentation de la sensibilité à *Pst*, suite à l'introduction de *Pro35S:AFB1*, une construction qui active de façon constitutive la signalisation en réponse à l'auxine (Navarro et al., 2006). De façon intéressante, l'introduction de *Pro35S:AFB1* chez *wat1* permet de restaurer partiellement la sensibilité à *R. solanacearum*, mais avec une forte tendance à se rapprocher du phénotype sauvage, indiquant que la signalisation dépendante de l'auxine joue un rôle important dans la résistance du mutant (Fig. 42). Outre son rôle dans la sensibilité, l'auxine a également été caractérisée dans d'autres travaux comme un élément de résistance aux agents pathogènes. En effet, il a été récemment montré que *tir1-1* (*transport inhibitor response 1-1*), muté pour un récepteur d'auxine, et *axr1* (*auxin resistant 1*), *axr2* et *axr6*, trois mutants de signalisation, deviennent tous plus sensibles aux champignons nécrotrophes *P. cucumerina* et *B. cinerea* (Llorente et al., 2008). Le mutant *axr2* est également plus sensible à la bactérie *P. syringae* pv. *maculicola* (Wang et al., 2007). Dans le cas de *R. solanacearum*, *tir1-1* se comporte comme une plante sauvage (Fig. 42) et il sera intéressant de tester la sensibilité de différents mutants affectés dans le métabolisme de l'auxine, tels que les mutants *axr1*, *axr2* et *axr6* (*auxin resistant 1, 2, 6*). Enfin, puisque *wat1* contient moins d'auxine dans les racines même en absence d'agent pathogène, il sera important de tester la sensibilité d'un mutant qui, à l'inverse, produit de l'auxine en excès, tel que *sur1* (*superroot 1*) ou *cyp83b1/sur2* (Boerjan et al., 1995; Delarue et al., 1998). De plus, un croisement entre l'un ou l'autre des mutants *sur* et *wat1* sera l'occasion de quantifier la teneur en auxine dans les individus ainsi générés et de déterminer si cela a un effet sur la réponse à *R. solanacearum*. Il a récemment été découvert dans l'équipe que *WAT1* est capable de transporter l'auxine (Ranocha et al, en préparation). Des données de la littérature indiquent que l'inhibition du transport d'auxine, soit par l'application d'un inhibiteur, soit par l'utilisation de mutants affectés pour cette fonction, a des effets contrastés selon les agents pathogènes. Par exemple, alors qu'un traitement au TIBA (triiodobenzoic

acid), un inhibiteur du transport d'auxine, augmente la résistance de la tomate au champignon hémibiotrophe *F. oxysporum*, ce même traitement induit une augmentation de la sensibilité au champignon nécrotrophe *P. cucumerina* (Davis and Dimond, 1953; Llorente et al., 2008). Le mutant *aux1*, incapable d'assurer l'influx d'auxine, ne développe plus une résistance systémique contre *B. cinerea*, normalement induite suite à une première infection par *Trichoderma* (Korolev et al., 2008). De son côté, le mutant *tir3* est plus résistant à *F. oxysporum* (Gil et al., 2001).

La voie de biosynthèse des IGS est en partie commune à celle de l'auxine (Fig. 39). Les données de transcriptomique des racines indiquant que six gènes sont moins exprimés chez *wat1* nous ont conduit à mesurer la teneur en IGS chez le mutant, ainsi qu'à croiser *wat1* avec des mutants affectés dans cette voie. Premièrement, les analyses de la teneur en différents IGS a permis de déterminer que la néoglucobrassicine (1MI3G) est l'IGS le plus abondant dans les racines chez *Arabidopsis*. Ceci est en accord avec des mesures réalisées chez le pastel du teinturier (*Isatis tinctoria*), une autre Brassicacée (Elliott and Stowe, 1971). Chez *wat1*, l'homéostasie des IGS est clairement modifiée dans les racines puisque la teneur en 1MI3G est beaucoup moins abondante avant et pendant l'infection par *R. solanacearum*, tandis qu'il y a une quantité plus importante de RA dans les racines non infectées de *wat1* (Fig. 43). Le double mutant *cyp79b2/b3* est déficient en IGS (I3G et 4MI3G) et sa teneur en RA est fortement réduite (Bednarek et al., 2009). En réponse à *R. solanacearum*, *cyp79b2/b3* présente une sensibilité plus importante que Col0, avec un développement des symptômes plus rapide dans les temps précoces de l'interaction (Fig. 44). Le triple mutant *cyp79b2/b3 wat1* montre une sensibilité partiellement restaurée par rapport à *wat1*, indiquant que les IGS sont un des acteurs clés de la résistance (Fig. 44). Une hypothèse serait d'associer la perte partielle de la résistance à la teneur en RA. En effet, alors que *wat1* en possède davantage que les plantes sauvages, *cyp79b2/b3* en contient moins. Or, des tests de croissance *in vitro* ont permis d'établir que le RA est un composé toxique pour *R. solanacearum*. Il sera donc crucial de réaliser un bilan métabolique sur la teneur en IGS et en RA chez *cyp79b2/b3 wat1*.

Pour tester si les voies classiques de signalisation dépendantes des voies ET-JA-SA sont impliquées dans les mécanismes de résistance de *wat1*, le mutant a été croisé avec *ein2-1* (ET), *jar1-1* (JA) et *NahG* (SA). Seule l'introduction du transgène *NahG*, qui dégrade le SA, chez *wat1* a permis de restaurer totalement la sensibilité vis-à-vis de *R. solanacearum* (Fig. 35), démontrant un rôle clé du SA dans la résistance de *wat1*. Cependant, aucun gène

marqueur de défense dépendant de la voie de signalisation du SA n'a une expression induite chez *wat1* (Fig. 36), indiquant qu'une activation constitutive de cette voie de signalisation n'est pas à l'origine de la résistance. La teneur en SA est connue pour influencer l'issue de l'interaction avec certains agents pathogènes. Par exemple, *cpr5* accumule davantage de SA qu'une plante sauvage, ce qui se traduit par une résistance à la bactérie *P. syringae* pv. *maculicola* et au champignon *P. parasitica* (Bowling et al., 1994; Bowling et al., 1997; Clarke et al., 2000). En réponse à *R. solanacearum*, *cpr5* présente aussi une résistance accrue, comparable à celle observée chez *wat1* (Fig. 45). La corrélation entre la teneur en SA et la résistance à la bactérie a été renforcée par les mesures effectuées chez *wat1*, mutant dans lequel le SA est présent en quantité plus abondante dans les racines par rapport au témoin sauvage (Fig. 45). Il est intéressant de noter que cette augmentation n'est cependant pas associée chez *wat1* à une expression plus forte des gènes de biosynthèse du SA (Tab. R-2). L'accumulation de SA corrélée à l'augmentation de la résistance suggèrent un rôle de composé antimicrobien à cette hormone. Les expériences de croissance de *R. solanacearum* en présence de SA exogène montrent un effet négatif sur la multiplication de la bactérie à partir de 100nM (Fig. 45). Outre le rôle majeur du SA dans la résistance à *R. solanacearum*, la restauration totale de la sensibilité à *Xcc* chez *NahG wat1* est une preuve que le SA est un facteur clé impliqué de façon plus générale à la résistance de *wat1* aux agents pathogènes (Fig. 35). Enfin, un moyen de confirmer davantage l'implication de cette hormone serait de tester la sensibilité du double mutant *wat1 sid2*, dans lequel la biosynthèse de SA est inhibée par la perte de fonction d'une isochorismate synthase. Cette stratégie a été envisagée, mais il n'a pas été possible de générer des individus homozygotes à la fois pour la mutation du gène *WAT1* (At1g75500) et celle du gène *SID2* (At1g74710), les deux gènes étant trop proches l'un de l'autre sur le chromosome I. Par contre, une lignée *wat1* dans laquelle *SID2* a été inactivé par ARNi sera prochainement disponible et sera testée pour sa sensibilité à *R. solanacearum*.

7.5 Connexions entre le métabolisme indolique et l'acide salicylique : vers un modèle pour expliquer la résistance accrue de *wat1*

Il est bien connu qu'il existe des connexions entre les voies de signalisation de l'auxine et du SA (Wang et al., 2007; Kazan and Manners, 2009). Pour ce qui concerne l'effet de l'auxine sur le SA, il a été démontré que la relation était antagoniste entre les deux voies. En

effet, un traitement simultané de plantes adultes (4 semaines) avec du SA et de l'auxine ne permet pas d'induire l'expression de *PR-1* aussi fortement que lors d'un traitement avec seulement du SA, indiquant que l'auxine est responsable de la diminution de l'expression de la signalisation SA (Wang et al., 2007). Pour ce qui concerne l'effet du SA sur l'auxine, là encore la relation est antagoniste puisque le BTH (benzothiadiazole), un analogue du SA, est capable de réprimer l'expression de nombreux gènes impliqués dans la perception, le transport et la signalisation de l'auxine dans les feuilles de plantes traitées (Wang et al., 2007). De plus, à l'aide de lignées *ProDR5:GUS* permettant d'estimer la teneur en auxine dans la plante, Wang et ses collaborateurs ont pu montrer qu'un traitement avec du SA est capable d'inhiber la synthèse d'auxine (Wang et al., 2007). Des lignées *Col0/ProDR5:GUS* et *wat1-1/ProDR5:GUS* sont disponibles dans l'équipe. Il serait intéressant d'exploiter ces lignées afin de déterminer l'activité DR5:GUS avant et après infection par *R. solanacearum*. Ce serait un moyen intéressant de suivre l'évolution de l'auxine au cours des réponses de défense chez *wat1* par rapport à *Col0* et ceci, en absence/présence de SA. Une autre connexion entre SA et auxine a été récemment rapportée. La lignée *NahG* accumule davantage d'auxine que les plantes sauvages à certains stades de développement (lorsque les plantes sont âgées de 12-13 semaines, mais pas dans les graines) (Abreu and Munné-Bosch, 2009). Ces résultats montrent que la dégradation du SA perturbe également le métabolisme de l'auxine, de façon indirecte. En effet, ces deux voies sont proches métaboliquement et partagent un même précurseur, le chorismate, laissant penser qu'une réorientation du flux métabolique est possible (Fig. 39). Dès lors, on peut imaginer que la restauration totale de la sensibilité dans la lignée *NahG wat1-1* n'est pas uniquement due à la dégradation du SA, mais que cela pourrait être la conséquence d'une modification du métabolisme de l'auxine. Pour vérifier cela, il sera important de doser l'auxine présente chez *NahG* et *NahG wat1-1* au stade où sont effectuées les infections.

L'existence d'une connexion entre IGS et SA a également été mise à jour par l'étude du mutant *pen2* chez *Arabidopsis* (Clay et al., 2009). *PEN2* code une myrosinase impliquée dans la formation de composés toxiques (RA, I3A) à partir des IGS (Bednarek et al., 2009). Alors que *pen2* n'est plus capable de produire de la callose en réponse à Flg22, ce phénotype est restauré si les plantules ont été préalablement traitées avec du SA, indiquant que le SA est requis pour la mise en place de réponse de défense de *pen2* (Clay et al., 2009). Ce résultat est très intéressant dans la mesure où il va dans le sens des données obtenues avec *wat1* : le SA est nécessaire à l'établissement de la résistance. En effet, la dégradation du SA par

A.



Composé	Feuilles non infectées		Feuilles infectées – 4dpi	
	Transcriptomique	Métabolomique	Transcriptomique	Métabolomique
Trp	=	=	=	=
Auxine	=	=	=	=
IGS	=	I3G : = 4MI3G : = 1MI3G : = RA : =	=	I3G : √ 4MI3G : = 1MI3G : = RA : √
SA	=	=	=	n.d.



Composé	Racines non infectées		Racines infectées – 4dpi	
	Transcriptomique	Métabolomique	Transcriptomique	Métabolomique
Trp	√	=	√	√
Auxine	=	√	=	√
IGS	√	I3G : = 4MI3G : = 1MI3G : √ RA : ↗	-	I3G : √ 4MI3G : √ 1MI3G : √ RA : √
SA	=	↗	=	n.d.

B.

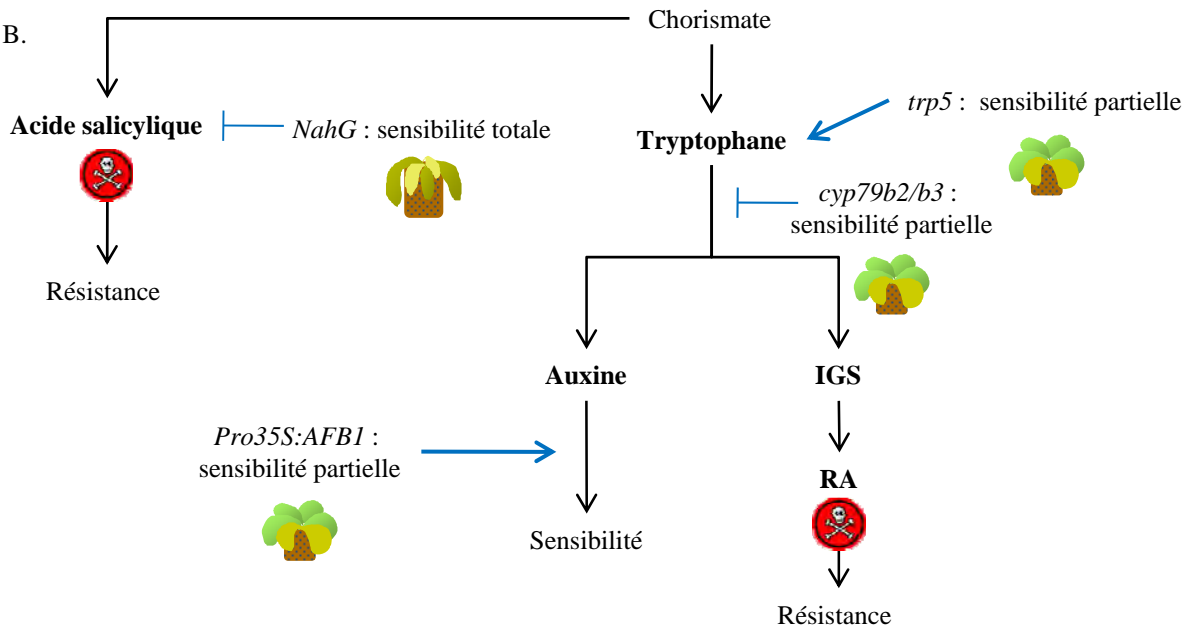


Figure 46. Bilan des résultats obtenus lors de la caractérisation de la résistance accrue de *wat1* à *R. solanacearum*.

A. Les altérations des voies métaboliques du tryptophane (Trp), de l'auxine, des glucosinolates indoliques (IGS) et de l'acide salicylique (SA) sont recensées dans le tableau, suite aux approches transcriptomique, métabolomique, microbiologique et génétique employées au cours de cette étude. Les symboles décrivent la tendance observée chez *wat1* par rapport au sauvage Col0. Légende : √, répression des gènes de biosynthèse (transcriptomique) ou réduction de la teneur en un composé (métabolomique) ; ↗, induction des gènes de biosynthèse ou augmentation de la teneur en un composé ; =, pas de différence ; n.d., non déterminé.

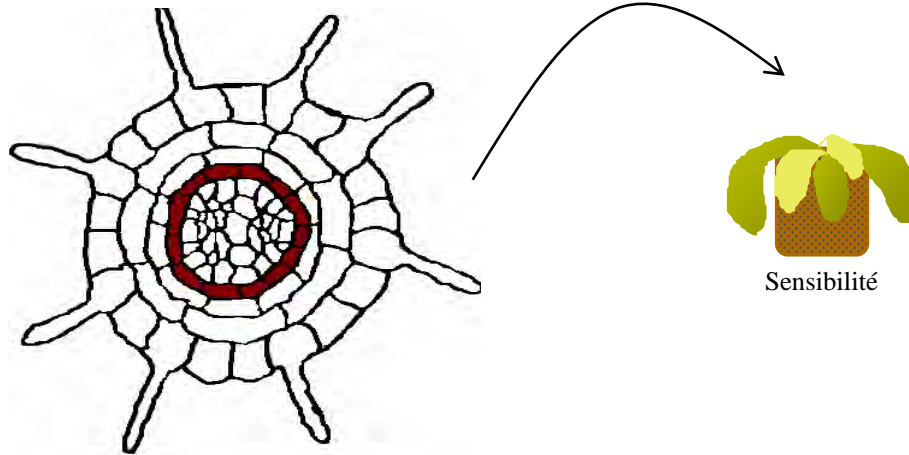
B. Représentation schématique des métabolismes impliqués dans la résistance accrue de *wat1*. Dans un schéma classique, alors que l'auxine est impliquée dans l'établissement de la sensibilité, le SA et les IGS jouent un rôle dans la résistance. Chez *wat1*, la sensibilité à *R. solanacearum* est partiellement restaurée par l'introduction de *NahG* (qui dégrade le SA), de la mutation *trp5* (qui induit l'accumulation de Trp), de la double mutation *cyp79b2/b3* (qui réduit la synthèse des IGS et du RA) et par l'introduction de *Pro35S:AFB1* (qui active la signalisation en réponse à l'auxine). La toxicité du SA et du RA sur *R. solanacearum* est symbolisée en rouge.

l'introduction de *NahG* chez *wat1t* lui fait perdre sa résistance à *R. solanacearum* et *Xcc*. En outre, il sera important de mesurer par qRT-PCR l'expression des gènes de biosynthèse des IGS moins exprimés chez *wat1-1* dans les racines chez *NahG wat1-1* afin de déterminer si la restauration totale de la sensibilité peut être associée ou non à un niveau d'expression restaurée de ces gènes.

La fonction possible de WAT1 a été très récemment découverte dans l'équipe via l'utilisation de deux systèmes hétérologues : le transport d'auxine (Ranocha et al, en préparation). De ce fait, ***wat1* est un mutant d'auxine qui présente, en plus une résistance accrue à *R. solanacearum*.** En essayant de tenir compte, au mieux, de l'ensemble des résultats obtenus avec les approches transcriptomique, métabolomique, microbiologique et génétique, récapitulés dans la figure 46, un modèle peut être proposé pour expliquer l'établissement d'une résistance basale accrue (Fig. 47). En condition non infectée, puisqu'aucune différence n'a été observée dans les feuilles chez le mutant par rapport au sauvage alors que plusieurs modifications ont lieu dans **les racines**, la physiologie de celles-ci **se retrouve placée au cœur de la résistance basale de *wat1*.** Dans les racines, WAT1 est notamment plus fortement exprimé au niveau du péricycle et la protéine WAT1 assure le transport de l'auxine au niveau du tonoplaste. De façon intéressante, il a été récemment montré l'existence d'une production d'auxine dans les cellules du péricycle, un processus permettant l'acquisition d'une nouvelle identité pour ces cellules, permettant l'initiation de la formation du primordium des racines latérales (Dubrovsky et al., 2008).

Le transport d'auxine à travers WAT1 se fait soit du cytoplasme vers la vacuole pour y être stockée, soit de la vacuole vers le cytoplasme pour y être mobilisé. Dans les deux cas, **chez *wat1*, l'auxine n'est plus dirigée dans le comportement cellulaire (vacuole ou cytoplasme) où elle est sensée l'être** pour assurer l'homéostasie. Par conséquent, au lieu de s'accumuler dans la vacuole ou le cytoplasme, un "signal d'alarme" serait alors déclenché, conduisant à une diminution de la production d'auxine dans les racines bien que les gènes de biosynthèse d'AIA n'ont pas une expression modifiée chez le mutant. La voie de biosynthèse du Trp et, ensuite, des IGS sont quant à elles particulièrement réprimées au niveau transcriptomique chez *wat1* et cela aboutit à un teneur beaucoup plus faible en néoglucobrassicine, l'IGS normalement majoritaire dans les racines chez *Arabidopsis*. L'acide raphanusamique, un composé antimicrobien dérivé des IGS, est contenu en quantité plus importante dans les racines de *wat1*. En quelque sorte, la "machinerie indolique" serait

A. Sauvage Col0



B. Mutant *wat1*

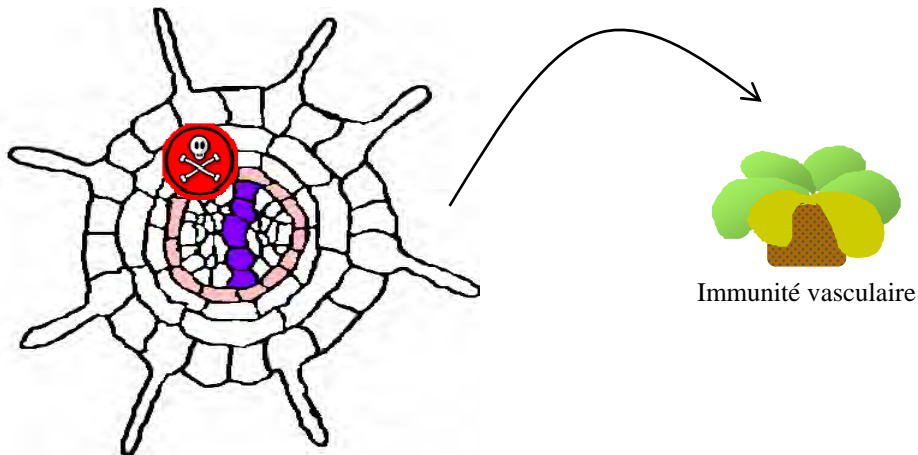


Figure 47. Immunité vasculaire chez *wat1* : modèle de travail.

- A. Chez une plante sauvage, *WAT1* est essentiellement exprimé au niveau du péricycle (bordeaux).
- B. Chez *wat1*, le gène n'est plus exprimé. Par conséquent, la production d'auxine est réduite et l'expression des gènes de biosynthèse des IGS sont réprimés dans le péricycle, ce qui est symbolisé par une teinte plus claire sur le schéma par rapport au sauvage. Un bouleversement métabolique s'opère alors et la racine produit davantage de SA et de RA, mais moins de néoglucobrassicine, l'IGS normalement majoritaire dans les racines. Cette nouvelle distribution métabolique va alors constituer un environnement hostile dans les vaisseaux du xylème (violet). Il y a alors développement d'une immunité contre les agents pathogènes vasculaires, qu'ils soient racinaires ou foliaires.

ralentie pour répondre à la perte du transport d'auxine sensé régulé la balance hormonale. A contrario, le pool destiné au métabolisme indolique serait redirigé vers la production de SA, puisque les racines *wat1* en accumule davantage que Col0. De façon intéressante, les gènes de biosynthèse d'IGS sont le plus fortement exprimés dans le péricycle. On peut imaginer que le pool métabolique modifié chez *wat1* (moins d'auxine, moins d'IGS, plus de RA et plus de SA) serait ensuite véhiculé du péricycle vers le xylème. Là, **ce mélange de composés constituerait un environnement hostile au développement des agents pathogènes vasculaires, permettant la mise en place d'une immunité vasculaire chez *wat1*.**

Pour être validé, ce modèle nécessite de réaliser un certain nombre d'expériences complémentaires. Par exemple, il serait intéressant de générer des lignées chimériques en greffant un système racinaire *wat1* à un système foliaire Col0, afin de déterminer si cela est suffisant pour mettre en place une résistance accrue. De plus, identifier les composés chimiques différenciant la sève sauvage de la sève mutante constitue une étape clé pour aller encore plus loin dans la compréhension des mécanismes de résistance. En outre, puisque nous avons vu que le péricycle est particulièrement affecté par la mutation au niveau transcriptomique, il serait opportun de générer des lignées dans lesquelles l'expression de *WATI* serait restreinte à ce type cellulaire. Enfin, réaliser un bilan métabolique complet sur la teneur en auxine, SA et IGS dans les différents doubles/triples mutants étudiés est un passage obligé afin de mieux comprendre le rôle de chaque métabolisme dans la résistance. Dans l'attente de découvrir de nouveaux résultats, les données actuelles permettent de conclure que ***wat1* est un mutant de transport d'auxine dont la teneur en auxine est réduite dans les racines. Les mécanismes de résistance impliqueraient une perturbation au niveau des connexions entre les métabolismes de l'auxine, des glucosinolates indoliques et de l'acide salicylique, favorisant ainsi l'établissement d'une immunité vasculaire.**

DONNEES TRANSCRIPTOMIQUES

Tableau R-1. Liste des 40 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0.

Les ratios, exprimés en Log2, correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes dans lesquelles les gènes étaient dérégulés. La classification a été réalisée selon les processus biologiques associés à chaque gène, à partir de la base de données AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>).

Catégorie	Gène	Fonction prédite	Ratio	p-value
Defense	AT3G22231	PCC1 (Pathogen and Circadian Controlled 1)	-1,04	0,00E+0
	AT5G55450	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,96	4,61E-11
	AT4G15440	HPL1 (Hydroperoxide lyase 1)	-0,94	2,00E-10
	AT5G24530	DMR6 (Downy Mildew Resistant 6)	-0,92	7,60E-10
	AT3G23120	RPL38 (Receptor-like protein 38)	-0,82	3,87E-7
Stress abiotique	AT1G43160	RAP2.6 (related to AP2 6)	-1,10	0,00E+0
	AT1G51760	IAR3 (IAA-Alanine Resistant 3)	-1,00	0,00E+0
	AT1G19670	COR11 (Coronatine-induced protein 1)	-0,84	8,85E-8
	AT1G07590	MT1A (Metallothionein 1A)	-0,71	1,01E-4
	AT2G01180	ATPAP1 (Phosphatidic Acid Phosphatase 1)	0,64	3,58E-3
Stress oxydatif	AT2G29450	ATGSTU5 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 5)	-1,09	0,00E+0
	AT2G29440	ATGSTU6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 24)	-1,06	0,00E+0
Acide jasmonique	AT2G46370	JAR1 (Jasmonate Resistant 1)	-1,52	0,00E+0
	AT3G25760	AOC1 (Allene Oxide Cyclase 1)	-1,31	0,00E+0
	AT2G24850	TAT3 (Tyrosine aminotransferase 3)	-1,13	0,00E+0
Auxine	AT1G75500	WAT1 (Walls Are Thin 1); nodulin MtN21 family protein	-2,14	0,00E+0
Acide salicylique	AT4G14400	ACD6 (Accelerated Cell Death 6)	-0,78	3,69E-6
Acide abscissique	AT5G45340	CYP707A3 (cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 3)	0,69	3,34E-4
Paroi	AT1G51940	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	-0,63	5,89E-3
	AT5G49360	BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1)	1,17	0,00E+0
Sucres	AT3G47420	glycerol-3-phosphate transporter, putative	-0,78	3,95E-6
	AT3G47340	ASN1 (Asparagine synthase 1); DIN6 (Dark inducible 6)	1,11	0,00E+0
Modification des protéines	AT1G51805	leucine-rich repeat protein kinase, putative	-0,82	3,38E-7
Processus inconnu	AT1G53480	AtMRD1 (MTO1 responding down1)	-1,62	0,00E+0
	AT4E10680	EUGENE prediction	-1,39	0,00E+0
	AT3G44870	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1,37	0,00E+0
	AT3G44860	FAMT (Farnesoic Acid carboxyl-O-Methyltransferase)	-1,24	0,00E+0
	AT5G54300	unknown protein	-0,99	7,68E-12
	AT3G22240	unknown protein	-0,96	6,14E-11
	AT1G77680	ribonuclease II family protein	-0,87	1,64E-8
	AT2G44670	senescence-associated protein-related	-0,69	3,23E-4
	AT5G03350	legume lectin family protein	-0,63	6,14E-3
	AT4G28290	unknown protein	-0,63	6,53E-3
	AT1G25400	unknown protein	0,62	9,95E-3
	AT1G50740	unknown protein	0,67	1,01E-3
	AT3G54000	unknown protein	0,76	8,51E-6
	AT5E30870	EUGENE prediction	0,77	4,38E-6
	AT2G33830	dormancy/auxin associated family protein	1,01	0,00E+0
	AT3G28220	meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein	1,04	0,00E+0
	AT3G26740	CCL (CCR-LIKE)	1,22	0,00E+0

Tableau R-2. Liste des 148 gènes dont l'expression est modifiée dans les racines non infectées du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0.

Les ratios, exprimés en Log2, correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes dans lesquelles les gènes étaient dérégulés. La classification a été réalisée selon les processus biologiques associés à chaque gène, à partir de la base de données AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>).

Catégorie	Gène	Fonction prédite	Ratio	p-value
Défense	AT3G13650	disease resistance response	-1,28	0,00E+0
	AT5G54170	unknown protein	-1,14	0,00E+0
	ATCG00480	ATPB (ATP synthase subunit beta)	-1,11	0,00E+0
	AT5G10300	AtMES5 (Methylesterase 5)	-1,06	5,39E-11
	AT5G61890	AP2 domain-containing transcription factor family protein	-1,02	5,16E-10
	AT5G53750	unknown protein	-0,93	6,91E-8
	AT2G19780	leucine-rich repeat family protein / extensin family protein	-0,87	1,47E-6
	AT2G26380	disease resistance protein-related / LRR protein-related	-0,78	1,46E-4
	AT3G49530	ANAC062 (Arabidopsis NAC domain containing protein 62)	0,67	1,70E-2
	AT5G22690	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	0,72	1,80E-3
AT2G02120	LCR70 (Low-molecular-weight cysteine-rich 70); PDF2.1 (Plant Defensin 2.1)	0,82	1,74E-5	
Stress abiotique	AT3G11170	FAD7 (Fatty Acid Desaturase 7)	-1,28	0,00E+0
	AT1G51760	IAR3 (IAA-Alanine Resistant 3)	-0,78	1,16E-4
	AT3G49620	DIN11 (Dark Inducible 11)	0,84	9,27E-6
	AT1G78290	SNRK2.8 (SNF1-Related protein Kinase 2.8)	0,87	1,73E-6
	AT5G05410	DREB2A (DRE-Binding Protein 2A)	1,05	1,00E-10
	AT3G10020	unknown protein	1,20	0,00E+0
Stress oxydatif	AT2G29450	ATGSTU5 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 5)	-1,10	0,00E+0
	AT2G34490	CYP710A2 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 2)	-0,94	3,66E-8
	AT5G52320	CYP96A4 (cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 4)	-0,87	2,28E-6
	AT2G29440	ATGSTU6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 24)	-0,80	5,05E-5
	AT4G37520	peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2)	0,78	1,64E-4
	AT1G14870	PCR2 (Plant Cadmium Resistance 2)	0,96	2,01E-8
	AT5G19890	peroxidase, putative	1,08	1,54E-11
	AT4G35770	DIN1 (Dark Inducible 1)	1,41	0,00E+0
Paroi	AT4G28250	ATEXPB3 (Arabidopsis thaliana Expansin B3)	-1,02	6,08E-10
	AT5G48900	pectate lyase family protein	-0,94	5,39E-8
	AT2G20750	ATEXPB1 (Arabidopsis thaliana Expansin B1)	-0,91	2,74E-7
	AT4G24780	pectate lyase family protein	-0,85	6,23E-6
Tryptophane	AT5G05730	ASA1 (Anthranilate Synthase alpha subunit 1)	-1,27	0,00E+0
	AT4G39980	DHS1 (3-Deoxy-D-arabino-Heptulosonate 7-phosphate Synthase 1)	-0,98	6,56E-9
Auxine	AT1G75500	WAT1 (Walls Are Thin 1); nodulin MtN21 family protein	-3,56	0,00E+0
	AT1G44350	ILL6 (IAA-leucine resistant (ILR)-like gene 6)	-1,33	0,00E+0
	AT2G46690	auxin-responsive family protein	-0,83	1,31E-5
	AT3G48360	BT2 (BTB and TAZ domain protein 2)	1,01	9,77E-10
Glucosinolates	AT1G74100	SOT16 (sulfotransferase 16)	-1,19	0,00E+0
	AT4G39940	AKN2 (APS-Kinase 2)	-1,26	0,00E+0
	AT5G60890	ATR1 (Altered Tryptophane Regulation)	-1,06	5,39E-11
	AT4G39950	CYP79B2 (cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2)	-1,02	5,39E-10
	AT2G14750	AKN1; APK1 (APS Kinase 1)	-0,84	9,48E-6
	AT4G31500	CYP83B1 (Cytochrome P450 Monooxygenase 83B1)	-0,77	2,48E-4
	AT5G23010	MAM1 (Methylthioalkumalate synthase 1)	0,87	1,64E-6
Acide jasmonique	AT2G06050	OPR3 (OPDA-Reductase 3)	-1,07	3,08E-11
	AT5G63980	ALX8 (Altered expression of APX2 8); SAL1 (FIERY1); HOS2 (High expression of Osmotically responsive genes 2)	-1,07	2,31E-11
	AT5G13220	JAZ10 (Jasmonate-ZIM-Domain protein 10)	-1,04	1,31E-10
	AT2G46370	JAR1 (Jasmonate Resistant 1)	-1,04	1,39E-10
	AT3G25770	AOC2 (Allene Oxide Cyclase 2)	-0,90	3,29E-7
	AT1G70700	JAZ10 (Jasmonate-ZIM-Domain protein 9)	-0,84	7,63E-6
	AT3G25760	AOC1 (Allene Oxide Cyclase 1)	-0,83	1,43E-5
Acide abscissique	AT5G40390	SIP1 (Seed Imbibition Protein 1-Like)	-1,11	0,00E+0
	AT5G64750	ABR1 (ABA Repressor 1)	-0,82	2,22E-5
	AT2G46680	ATHB-7 (Arabidopsis thaliana Homeobox 7)	-0,68	9,81E-3
	AT2G32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	1,03	2,23E-10
Acide salicylique	AT3G50410	OBP1 (OBF Bindong Protein 1)	-0,75	4,37E-4
Ethylène	AT5G44350	ethylene-responsive nuclear protein -related	-0,94	5,44E-6
Calcium/calmodulin	AT5G62070	IQD23 (IQ-domain 23); calmodulin binding	-0,71	2,96E-3
	AT3G29000	calcium-binding EF hand family protein; CML45	0,74	8,10E-4
	AT2G41090	calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22); CML10	0,75	5,32E-4
	AT5G39670	calcium-binding EF hand family protein; CML46	0,79	8,82E-5

	AT1G73805	calmodulin-binding protein	1,09	7,69E-12
Facteurs de transcription	AT1G62975	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein (bHLH125)	-0,92	1,10E-7
	AT2G28510	Dof-type zinc finger domain-containing protein	-0,89	5,56E-7
	AT1G12540	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-0,73	1,17E-3
	AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75)	0,73	1,10E-3
	AT5G28770	BZO2H3 (basic leucine zipper O2 homolog 3)	0,78	1,19E-4
	AT5G49450	ATBZIP1, bZIP family transcription factor	1,30	0,00E+0
Modification des protéines	ATCG00330	RPS14 (Chloroplast Ribosomal protein S14)	-0,90	3,66E-7
	AT3G61820	aspartyl protease family protein	-0,81	2,86E-5
	AT5G19100	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related	-0,71	3,27E-3
	AT2G36570	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-0,70	4,67E-3
	AT1G31817	NFD3 (Nuclear Fusion Defective 3)	0,68	9,62E-3
	AT3G59350	kinase	0,73	1,58E-3
	AT4G38470	protein kinase family protein	0,74	1,01E-3
	AT5G24490	30S ribosomal protein, putative, unknown protein	0,75	4,46E-4
	AT4G36410	UBC17 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 17)	1,19	0,00E+0
	AT1G80920	J8; heat shock protein binding / unfolded protein binding	1,43	0,00E+0
Sucres	AT2G32990	AtGH9B8, glycosyl hydrolase family 9 protein	-1,03	2,85E-10
	AT4G02290	AtGH9B13, glycosyl hydrolase family 9 protein	-0,91	2,80E-7
	AT4G30280	ATXTH18/XTH18 (Xyloglucan Endotransglucosylase/hydrolase 18)	0,78	1,44E-4
	AT3G26650	GAPA (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit)	0,91	2,92E-7
	AT5G10100	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	0,93	7,08E-8
	AT3G52840	BGAL2; beta-galactosidase, putative / lactase, putative	1,17	0,00E+0
	AT5G56870	BGAL4; beta-galactosidase, putative / lactase, putative	1,31	0,00E+0
Acides aminés	AT4G35630	PSAT (phosphoserine aminotransferase)	-0,91	2,59E-7
	AT3G13110	AtSerat2;2; SAT1 (Serine Acetyltransferase 1)	-0,89	7,93E-7
	AT2G31810	acetolactate synthase small subunit, putative	0,75	4,92E-4
	AT1G77380	AAP3 (amino acid permease 3)	0,87	1,73E-6
	AT1G10070	ATBCAT-2; branched-chain-amino-acid transaminase	1,17	0,00E+0
Processus métabolique	AT4G27570	glycosyltransferase family protein	-1,02	5,23E-10
	AT4G27560	glycosyltransferase family protein	-0,90	3,22E-7
	AT5G12890	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0,76	3,64E-4
	AT1G23800	ALDH2B7 (Aldehyde dehydrogenase 2B7)	-0,65	2,89E-2
	AT2G39570	ACT domain-containing protein	0,77	2,43E-4
Transport	AT1G44750	ATPUP11 (Arabidopsis thaliana purine permease 11)	-1,01	1,18E-9
	AT4G36670	mannitol transporter, putative	-0,97	8,74E-9
	AT3G47960	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-0,95	2,19E-8
	AT3G53960	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-0,78	1,35E-4
Lipides	AT4G22610	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0,99	2,89E-9
	AT2G03980	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	-0,87	1,85E-6
	AT1G30370	lipase class 3 family protein	0,77	2,15E-4
	AT5G56100	glycine-rich protein / oleosin	0,78	1,44E-4
Réparation	AT5G63920	TOP3A, DNA topoisomerase III alpha, putative	0,68	1,20E-2
	AT5G58720	PRLI-interacting factor, putative	0,70	4,04E-3
	AT1G70660	MMZ2 (MMS ZWEI Homolog 2); ubiquitin-protein ligase	0,91	2,37E-7
Photosynthèse	AT3G47470	LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4)	0,74	8,75E-4
	AT1G29930	CAB1 (Chlorophyll A/B Binding protein1); LHCB1.3 (Light-Harvesting Chlorophyll A/B protein 1.3)	0,90	4,34E-7
Flavonoïdes	AT1G06000	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-1,11	0,00E+0
Sulfate	AT4G04610	APR1 (APS Reductase 1); PRH19 (PAPS Reductase Homolog 19)	-1,15	0,00E+0
Morphogénèse	AT2G19800	MIOX2 (MYO-INOSITOL OXYGENASE 2)	0,87	2,36E-6
Processus inconnu	AT4G36830	HOS3-1	-1,29	0,00E+0
	AT2G16660	nodulin family protein	-1,11	0,00E+0
	AT4E10680	EUGENE prediction	-1,02	6,77E-10
	AT5G19260	unknown protein	-0,99	3,78E-9
	AT3G62010	metal ion binding / oxidoreductase	-0,93	8,75E-8
	AT5G67020	unknown protein	-0,87	1,85E-6
	AT3G44870	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-0,83	1,20E-5
	AT1G78990	transferase family protein	-0,82	1,79E-5
	AT3G44860	FAMT (Farnesoic Acid carboxyl-O-Methyltransferase)	-0,79	7,74E-5
	AT3G25640	unknown protein	-0,79	9,14E-5
	AT5G62220	AtGT18; exostosin family protein	-0,78	1,28E-4
	AT1G67920	unknown protein	-0,76	2,93E-4
	AT1G31600	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-0,74	6,74E-4
	ATCG00470	ATPE (ATP synthase epsilon chain)	-0,73	1,11E-3

AT3G04140	ankyrin repeat family protein	-0,70	4,55E-3
AT1G20530	unknown protein	-0,70	5,37E-3
AT4G36720	HVA22K (HVA22-Like protein K), GBF1 (G-box binding factor 1)	0,67	1,25E-2
AT5G22520	unknown protein	0,71	2,73E-3
AT5G54930	AT hook motif-containing protein	0,74	9,45E-4
AT3G15770	unknown protein	0,75	4,73E-4
AT3G54000	unknown protein	0,80	4,96E-5
AT1G58180	BCA6 (Beta Carbonic Anhydrase 6)	0,80	6,34E-5
AT1G56060	unknown protein	0,83	1,56E-5
AT3G06850	DIN3 (Dark Inducible 3)	0,85	4,12E-6
AT4G27450	unknown protein	0,91	2,64E-7
AT2G47400	CP12-1 (CP12 domain-containing protein 1)	0,96	1,75E-8
AT5G35525	unknown protein	0,96	1,49E-8
AT5G13190	unknown protein	0,96	1,41E-8
AT5G46295	unknown protein	0,99	3,15E-9
AT1G18810	phytochrome kinase substrate-related	1,00	1,93E-9
AT1G56660	unknown protein	1,01	6,77E-10
AT3G15450	unknown protein	1,08	1,54E-11
AT5G52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	1,09	7,69E-12
AT5G27860	unknown protein	1,10	7,69E-12
AT5G22920	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	1,15	0,00E+0
AT1G19530	unknown protein	1,29	0,00E+0
AT2G33830	dormancy/auxin associated family protein	1,31	0,00E+0
AT1G80380	phosphoribulokinase/uridine kinase-related	1,36	0,00E+0
AT4G39675	unknown protein	1,48	0,00E+0

Tableau R-3. Liste des 148 gènes dont l'expression est modifiée dans les feuilles du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0, 4 jours après inoculation avec *R. solanacearum*.

Les ratios, exprimés en Log2, correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes dans lesquelles les gènes étaient dérégulés. La classification a été réalisée selon les processus biologiques associés à chaque gène, à partir de la base de données AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>).

Catégorie	Gène	Fonction prédite	Ratio	p-value	
Défense	AT3G04720	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	-1,81	0,00E+0	
	AT1G73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	-1,78	0,00E+0	
	AT4G16260	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1,69	0,00E+0	*
	AT2G29350	SAG13 (Senescence-associated gene 13); oxidoreductase	-1,55	0,00E+0	
	AT3G44880	ACD1 (ACCELERATED CELL DEATH 1, PHEOPHORBIDE A OXYGENASE)	-1,51	0,00E+0	*
	AT4G11650	ATOSM34 (OSMOTIN 34)	-1,47	0,00E+0	
	AT3G15356	legume lectin family protein	-1,26	0,00E+0	
	AT5G01600	ATFER1 (ferretin 1)	-1,26	0,00E+0	
	AT2G35980	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	-1,20	0,00E+0	
	AT3G49110	PRX33(PEROXIDASE 33)	-1,16	0,00E+0	
	AT4G02520	ATGSTF2 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class phi) 2)	-1,03	3,08E-11	
	AT4G37990	ELI3-2 (ELICITOR-ACTIVATED GENE 3)	-1,00	2,54E-10	
	AT2G15490	UGT73B4; UDP-glycosyltransferase	-0,90	1,08E-7	
	AT3G22231	PCC1 (PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1)	0,76	1,45E-4	
AT2G43550	trypsin inhibitor, putative	0,82	5,51E-6	*	
Stress abiotique	AT3G49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)	-1,80	0,00E+0	
	AT1G51760	IAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT 3)	-1,01	1,31E-10	
	AT3G08590	2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	-0,94	8,60E-9	
	AT2G21620	RD2 (RESPONSIVE TO DESSICATION 2)	-0,92	3,19E-8	
	AT3G14990	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein	-0,88	3,35E-7	
	AT2G37760	aldo/keto reductase family protein	-0,78	4,20E-5	
	AT1G77120	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)	-0,72	6,76E-4	
	AT1G47128	cysteine proteinase (RD21A)	-0,70	2,22E-3	
	AT2G41380	embryo-abundant protein-related	-0,69	3,40E-3	*
	AT2G17840	ERD7 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7)	-0,67	6,26E-3	*
AT5G20630	GLP3 (GERMIN-LIKE PROTEIN 3)	1,08	0,00E+0		
Stress oxydatif	AT2G34500	CYP710A1 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1)	-1,57	0,00E+0	*
	AT4G08780	peroxidase, putative	-1,39	0,00E+0	
	AT3G17790	ATACP5 (acid phosphatase 5); PAP17 (purple acid phosphatase 17)	-1,29	0,00E+0	*
	AT3G48520	CYP94B3 (cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3)	-0,92	2,44E-8	*
	AT2G37770	aldo/keto reductase family protein	-0,89	1,31E-7	
	AT4G37520	peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2)	-0,83	4,44E-6	
	AT4G21580	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	-0,73	4,67E-4	
	AT3G26060	peroxiredoxin Q, putative	0,71	1,44E-3	
AT1G54050	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	1,51	0,00E+0		
Acide absicissique	AT5G59320	LTP3 (LIPID TRANSFER PROTEIN 3)	-2,50	0,00E+0	*
	AT5G59310	LTP4 (LIPID TRANSFER PROTEIN 4)	-1,91	0,00E+0	
	AT3G02480	ABA-responsive protein-related	-1,71	0,00E+0	*
	AT2G33380	RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20)	-1,65	0,00E+0	*
	AT5G13170	SWEET15; SAG29 (Senescence-associated gene 29)	-1,31	0,00E+0	*
	AT1G54100	ALDH7B4 (ALDEHYDE DEHYDROGENASE 7B4)	-1,23	0,00E+0	
	AT2G47770	benzodiazepine receptor-related	-1,21	0,00E+0	*
	AT5G25610	RD22 (RESPONSIVE TO DESSICATION 22)	-1,19	0,00E+0	*
	AT4G27410	RD26 (RESPONSIVE TO DESSICATION 26)	-1,09	0,00E+0	*
	AT2G46680	ATHB-7 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 7)	-1,06	7,70E-12	*
	AT2G47190	MYB2 (myb domain protein 2)	-1,06	7,70E-12	*
	AT5G59220	protein phosphatase 2C, putative	-1,02	6,93E-11	*
	AT2G39800	P5CS1 (DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1)	-0,98	6,77E-10	
	AT1G05680	UGT74E2 (UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein)	-0,76	1,06E-4	
AT4G34710	ADC2 (ARGININE DECARBOXYLASE 2)	-0,68	5,16E-3	*	
Auxine	AT3G44300	NIT2 (NITRILASE 2)	-1,58	0,00E+0	
	AT1G75500	WAT1 (Walls Are Thin 1); nodulin MtN21 family protein	-1,49	0,00E+0	
	AT2G17500	auxin efflux carrier family protein	-0,80	2,06E-5	*
Glucosinolate	AT3G26830	PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3)	-0,82	6,00E-6	*
	AT2G25450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	-0,67	5,39E-3	
	AT5G25980	TGG2 (GLUCOSIDE GLUCOXYDOLASE 2)	0,76	1,12E-4	
Acide salicylique	AT2G03760	SOT12 (sulfotransferase 12)	-1,32	0,00E+0	*
	AT2G43820	SAGT1 (salicylic acid glucosyltransferase 1); UGT74F2 (UDP-Glucosyltransferase 74F2)	-0,70	1,93E-3	
Acide jasmonique	AT4G16760	ACX1 (ACYL-COA OXIDASE 1)	-0,82	4,90E-6	

Ethylène	AT5G60360	AALP (ARABIDOPSIS ALEURAIN-LIKE PROTEASE)	-0,80	1,52E-5	
Gibberelline	AT1G02400	ATGA2OX6/DTA1 (GIBBERELLIN 2-OXIDASE 6)	-1,04	2,31E-11	*
	AT5G15230	GASA4 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4)	0,86	7,95E-7	*
	AT1G74670	gibberellin-responsive protein, putative	1,04	3,08E-11	*
Paroi	AT2G22470	AGP2 (ARABINOGLACTAN-PROTEIN 2)	-1,21	0,00E+0	*
	AT2G43150	proline-rich extensin-like family protein	-1,19	0,00E+0	
	AT1G09500	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	-1,06	7,70E-12	*
	AT4G34230	CAD5 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5)	-1,00	2,77E-10	*
	AT1G61820	BGLU46; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	-0,77	6,57E-5	
	AT4G19420	pectinacetyltransferase family protein	-0,66	1,06E-2	
Sucres	AT2G28950	ATEXPA6 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A6)	0,94	8,44E-9	
	AT1G02850	glycosyl hydrolase family 1 protein	-0,75	1,51E-4	
	AT2G27500	glycosyl hydrolase family 17 protein	-0,74	2,42E-4	
Facteurs de transcription	AT2G47180	ATGOLS1 (ARABIDOPSIS THALIANA GALACTINOL SYNTHASE 1)	0,66	1,04E-2	
	AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75)	-1,81	0,00E+0	*
Photosynthèse/lumière	AT3G10113	myb family transcription factor	0,88	2,69E-7	
	ATCG00340	unknown protein	-0,77	7,75E-5	
	ATCG00280	unknown protein	-0,72	6,83E-4	
Lipides	AT2G35370	GDCH (Glycine decarboxylase complex H)	0,71	1,18E-3	
	AT5G59330	pseudogene	-1,50	0,00E+0	
	AT3G62590	lipase class 3 family protein	-0,78	5,01E-5	*
Acides aminés	AT2G30550	lipase class 3 family protein	-0,73	3,94E-4	
	AT1G17745	PGDH (3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE)	-1,57	0,00E+0	*
	AT2G41190	amino acid transporter family protein	-1,17	0,00E+0	*
Modification des protéines	AT3G56200	amino acid transporter family protein	-0,99	5,23E-10	
	AT1G27190	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-1,04	3,08E-11	
	AT3G13670	protein kinase family protein, seven in absentia (SINA) family protein	-0,88	2,57E-7	
	AT1G79280	ECT8 (evolutionarily conserved C-terminal region 8)	-0,86	6,19E-7	
	AT3G13672	seven in absentia (SINA) family protein	-0,81	1,09E-5	*
	AT3G17000	UBC32 (ubiquitin-conjugating enzyme 31)	-0,75	1,92E-4	
	AT4G15530	PPDK (PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE)	-0,73	4,31E-4	
	AT2G43460	60S ribosomal protein L38 (RPL38A)	0,64	2,14E-2	
	AT1G48350	ribosomal protein L18 family protein	0,66	1,10E-2	
	AT3G47650	bundle-sheath defective protein 2 (bsd2) family	0,80	1,77E-5	
Transport	AT4G11320	cysteine proteinase, putative	0,94	1,13E-8	
	AT4G11310	cysteine-type peptidase	1,09	0,00E+0	
	AT3G23550	MATE efflux family protein	-0,98	8,70E-10	
	AT1G22570	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-0,74	3,48E-4	*
	AT3G05165	carbohydrate transporter	-0,71	1,21E-3	
	AT1G79900	ATMBAC2/BAC2 (Arabidopsis mitochondrial basic amino acid carrier 2)	-0,70	1,56E-3	
Assemblage du nucléosome	AT1G31730	epsilon-adaptin, putative	0,75	2,28E-4	
	AT5G22880	histone H2B, putative	0,97	1,28E-9	
Morphogénèse	AT5G59870	histone H2A, putative	0,98	9,24E-10	
	AT1G52690	late embryogenesis abundant protein, putative	-1,31	0,00E+0	*
	AT3G60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2)	-1,14	0,00E+0	
Processus métabolique	AT2G39030	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	-1,12	0,00E+0	
	AT5G53120	SPDS3 (SPERMIDINE SYNTHASE 3)	-0,89	1,58E-7	*
	AT3G17770	dihydroxyacetone kinase family protein	-0,86	8,77E-7	*
	AT3G03480	CHAT (ACETYL COA:(Z)-3-HEXEN-1-OL ACETYLTRANSFERASE)	-0,81	1,21E-5	
	AT3G17810	dihydroorotate dehydrogenase family protein	-0,78	5,58E-5	
Processus catabolique	AT1G17170	ATGSTU24 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 24)	-1,27	0,00E+0	
	AT5G62480	ATGSTU9 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 9)	-1,15	0,00E+0	*
Processus inconnu	AT5G64090	unknown protein	-2,74	0,00E+0	
	AT1G05340	unknown protein	-1,58	0,00E+0	*
	AT5G15500	ankyrin repeat family protein	-1,58	0,00E+0	
	AT2G25625	unknown protein	-1,36	0,00E+0	*
	AT4G01360	unknown protein	-1,34	0,00E+0	
	AT3G03341	unknown protein	-1,26	0,00E+0	

AT5G39520	unknown protein	-1,22	0,00E+0	*
AT5G17380	pyruvate decarboxylase family protein	-1,22	0,00E+0	
AT5G61820	unknown protein	-1,12	0,00E+0	
AT1G32340	NHL8 (NDR1/HIN1-like 8)	-1,12	0,00E+0	
AT1G66700	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1,11	0,00E+0	
AT1G18980	germin-like protein, putative	-1,10	0,00E+0	
AT3G19240	unknown protein	-1,08	0,00E+0	
AT4G22240	plastid-lipid associated protein PAP, putative	-1,03	3,85E-11	
AT4G11910	unknown protein	-1,03	4,62E-11	
AT5G25250	unknown protein	-1,03	3,08E-11	
AT3G57520	ATSIP2 (ARABIDOPSIS THALIANA SEED IMBIBITION 2)	-1,01	1,15E-10	
AT5G01520	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-0,97	1,99E-9	*
AT2G44790	UCC2 (UCLACYANIN 2)	-0,95	4,33E-9	
AT1G13330	unknown protein	-0,92	3,10E-8	
AT1G44960	unknown protein	-0,91	5,30E-8	
AT4G12735	unknown protein	-0,88	2,10E-7	
AT1G26761	unknown protein	-0,83	4,05E-6	
AT4G06744	leucine-rich repeat family protein / extensin family protein	-0,81	8,59E-6	
AT1G53480	MRD1 (MTO 1 RESPONDING DOWN 1)	-0,78	4,64E-5	
AT5G07000	sulfotransferase family protein	-0,75	1,87E-4	
AT5G39050	transferase family protein	-0,75	2,33E-4	
AT1G08230	unknown protein	-0,66	1,04E-2	
AT5G04250	OTU-like cysteine protease family protein	-0,66	1,17E-2	
AT3G56910	PSRP5 (PLASTID-SPECIFIC 50S RIBOSOMAL PROTEIN 5)	0,67	6,19E-3	
AT2E07770	EUGENE prediction	0,67	5,98E-3	
AT4G01390	meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein	0,73	4,45E-4	
AT1G72610	GLP1 (GERMIN-LIKE PROTEIN 1)	0,75	2,15E-4	
AT4G16008	unknown protein	0,80	2,09E-5	
AT4G29030	glycine-rich protein	0,83	3,49E-6	
AT2G33850	unknown protein	0,91	5,41E-8	
AT5G44020	acid phosphatase class B family protein	0,95	4,08E-9	

Tableau R-4. Liste des 210 gènes dont l'expression est modifiée dans les racines du mutant *wat1* par rapport au témoin sauvage Col0, 4 jours après inoculation avec *R. solanacearum*.

Les ratios, exprimés en Log2, correspondent aux moyennes de deux expériences indépendantes dans lesquelles les gènes étaient dérégulés. La classification a été réalisée selon les processus biologiques associés à chaque gène, à partir de la base de données AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>).

Catégorie	Gène	Fonction prédite	Ratio	p-value
Défense	AT4G16260	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1,85	0,00E+0
	AT5G02500	HSC70-1 (heat shock cognate 70 kDa protein 1)	-1,60	0,00E+0
	AT2G35980	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	-1,48	0,00E+0
	AT3G30775	ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5, PROLINE OXIDASE)	-1,48	0,00E+0
	AT4G12480	pEARLI 1	-1,43	0,00E+0
	AT5G06860	PGIP1 (POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1)	-1,43	0,00E+0
	AT3G04720	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	-1,35	0,00E+0
	AT2G37040	PAL1 (PHENYLALANINE AMMONIA LYASE 1)	-1,34	0,00E+0
	AT4G11650	ATOSM34 (OSMOTIN 34)	-1,34	0,00E+0
	AT3G49110	PRX33 (PEROXIDASE 33)	-1,24	0,00E+0
	AT1G02930	ATGSTF6 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 11)	-1,16	7,70E-12
	AT5G08790	ANAC081 (Arabidopsis NAC domain containing protein 81)	-1,15	7,70E-12
	AT3G15356	legume lectin family protein	-1,12	6,93E-11
	AT4G37990	ELI3-2 (ELICITOR-ACTIVATED GENE 3)	-1,11	9,24E-11
	AT1G52900	disease resistance protein (TIR class), putative	-1,10	1,77E-10
	AT4G34460	AGB1 (GTP BINDING PROTEIN BETA 1)	-1,08	5,77E-10
	AT3G13650	disease resistance response	-0,98	1,14E-7
	AT3G16530	legume lectin family protein	-0,95	4,30E-7
	AT5G45110	NPR3 (NPR1-LIKE PROTEIN 3)	-0,94	7,55E-7
	AT5G64890	PROPEP2 (Elicitor peptide 2 precursor)	-0,90	6,16E-6
	AT5G43940	ADH2 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 2)	-0,89	9,39E-6
	AT1G72930	TIR (TOLL/INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-LIKE)	-0,89	7,28E-6
	AT4G15760	monooxygenase, putative (MO1)	-0,85	4,54E-5
	AT2G43535	trypsin inhibitor, putative	0,96	2,48E-7
AT5G65210	TGA1	1,12	5,39E-11	
Stress abiotique	AT3G09440	HSC70-3 (heat shock cognate 70 kDa protein 3)	-1,76	0,00E+0
	AT1G77120	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)	-1,58	0,00E+0
	AT5G62520	SRO5 (SIMILAR TO RCD ONE 5)	-1,53	0,00E+0
	AT5G01410	PDX1 (PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.3)	-1,35	0,00E+0
	AT5G27760	hypoxia-responsive family protein	-1,34	0,00E+0
	AT5G42020	BIP (LUMINAL BINDING PROTEIN)	-1,25	0,00E+0
	AT5G11977	MIR156E	-1,25	0,00E+0
	AT5G14780	FDH (FORMATE DEHYDROGENASE)	-1,22	0,00E+0
	AT1G03220	extracellular dermal glycoprotein, putative / EDGP, putative	-1,10	1,39E-10
	AT3G02360	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	-1,03	8,21E-9
	AT4G37870	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP), putative	-0,82	2,30E-4
	AT2G47710	universal stress protein (USP) family protein	-0,76	2,23E-3
	AT3G01520	universal stress protein (USP) family protein	0,74	5,88E-3
	AT1G07590	MT1A (METALLOTHIONEIN 1A)	1,11	1,31E-10
	AT1G78290	SNRK2.8 (SNF1-Related protein Kinase 2.8)	1,17	0,00E+0
	AT1G07610	MT1C (metallothionein 1C)	1,46	0,00E+0
Stress oxydatif	AT2G34500	CYP710A1 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1)	-1,81	0,00E+0
	AT4G08780	peroxidase, putative	-1,49	0,00E+0
	AT3G48520	CYP94B3 (cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3)	-1,35	0,00E+0
	AT1G60730	aldo/keto reductase family protein	-1,24	0,00E+0
	AT2G28860	CYP710A4 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 4)	-1,23	0,00E+0
	AT1G11610	CYP71A18 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 18)	-1,02	1,13E-8
	AT2G21640	unknown protein	-0,94	9,91E-7
	AT2G37770	aldo/keto reductase family protein	-0,90	6,06E-6
Paroi	AT1G26810	galactosyltransferase family protein	-1,85	0,00E+0
	AT1G76470	cinnamoyl-CoA reductase	-1,61	0,00E+0
	AT2G22470	AGP2 (ARABINO GALACTAN-PROTEIN 2)	-1,33	0,00E+0
	AT3G13520	AGP12 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 12)	-1,17	0,00E+0
	AT5G49720	IRX2 (Irregular Xylem 2); KOR1 (KORRIGAN)	-1,05	2,33E-9
	AT2G47550	pectinesterase family protein	-1,05	2,51E-9
	AT1G55330	AGP21 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 21)	-0,99	7,88E-8
	AT5G54160	ATOMT1 (O-METHYLTRANSFERASE 1)	-0,91	3,03E-6
	AT1G20330	SMT2 (STEROL METHYLTRANSFERASE 2)	-0,90	4,99E-6
	AT3G11700	FLA18 (fasciclin_like arabinogalactan protein 18)	-0,90	5,80E-6
	AT1G11580	pectin methylesterase, putative	-0,88	1,60E-5
	AT3G17390	MTO3 (S-adenosylmethionine synthase 3)	-0,87	1,83E-5
	AT4G09030	AGP10 (Arabinogalactan protein 10)	-0,75	2,74E-3
	AT1G76790	O-methyltransferase family 2 protein	-0,69	3,07E-2
	AT2G18290	anaphase-promoting complex, subunit 10 family (APC10)	0,78	8,28E-4
Tryptophane	AT3G54640	TSA1 (TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN)	-1,23	0,00E+0
	AT5G05730	ASA1 (ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1)	-1,09	3,08E-10

Auxine	AT1G75500	WAT1 (Walls Are Thin 1); nodulin MtN21 family protein	-2,62	0,00E+0
	AT3G59900	ARGOS (AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE)	-1,26	0,00E+0
	AT1G19840	auxin-responsive family protein	-1,04	4,02E-9
Glucosinolates	AT3G26830	PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3)	-1,74	0,00E+0
	AT4G23100	RML1 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 2, ROOT MERISTEMLESS 1)	-0,99	6,07E-8
Acide salicylique	AT2G03760	SOT12 (sulfotransferase 12)	-1,99	0,00E+0
	AT3G46130	MYB111 (myb domain protein 111)	1,05	2,47E-9
	AT5G59780	MYB59 (myb domain protein 59)	1,50	0,00E+0
Éthylène	AT1G21140	nodulin, putative	-1,41	0,00E+0
	AT4G17500	ATERF-1 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1)	-1,36	0,00E+0
	AT2G19590	ACO1 (ACC OXIDASE 1)	-1,32	0,00E+0
	AT1G05010	EFE (ethylene forming enzyme)	-1,05	2,39E-9
	AT1G68765	IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION)	-0,88	1,15E-5
	AT3G23240	ATERF1/ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1)	-0,86	3,38E-5
	AT4G17490	ATERF6 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 6)	-0,84	9,45E-5
	AT3G23230	ethylene-responsive factor, putative	-0,83	1,14E-4
AT1G12010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, putative	0,85	4,44E-5	
Acide abscisique	AT1G05680	UGT74E2 (UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein)	-1,85	0,00E+0
	AT2G40340	AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B)	-1,45	0,00E+0
	AT4G17615	CBL1 (CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 1)	-1,12	4,62E-11
	AT1G69260	RPK1 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1)	-0,90	5,14E-6
	AT2G30020	protein phosphatase 2C, putative	-0,87	2,21E-5
	AT5G46845	MIR160C	0,97	1,99E-7
Brassinosteroides	AT2G44080	ARL (ARGOS-LIKE)	-0,95	5,83E-7
Phénylpropanoïde	AT5G22630	ADT5 (Arogenate dehydratase 5)	-1,45	0,00E+0
	AT1G51680	4CL1 (4-COUMARATE:COA LIGASE 1)	-1,09	4,00E-10
	AT3G13610	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-1,05	2,89E-9
	AT4G34050	CCoAOMT1 (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase 1)	-1,02	1,79E-8
	AT5G63600	FLS5 (flavonol synthase 5)	0,94	8,86E-7
Photosynthèse/Lumière	AT3G17800	unknown protein	-1,10	2,00E-10
	AT2G37970	SOUL heme-binding family protein	-0,69	3,00E-2
	AT4G18130	PHYE (PHYTOCHROME DEFECTIVE E); AML3 (ARABIDOPSIS MEI2-LIKE)	0,82	1,74E-4
	AT4G15560	CLA1 (CLOROPLASTOS ALTERADOS 1)	1,08	5,70E-10
	AT3G51910	AT-HSF7A (Arabidopsis thaliana heat shock transcription factor 7A)	1,15	7,70E-12
Facteur de transcription	AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75)	-1,21	0,00E+0
	AT1G33760	AP2 domain-containing transcription factor, putative	-1,05	2,70E-9
	AT3G01970	WRKY45 (WRKY DNA-binding protein 45)	-1,03	6,67E-9
	AT1G49475	DNA binding / transcription factor	-0,84	9,16E-5
Sucres	AT4G30440	GAE1 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERASE 1)	-1,45	0,00E+0
	AT3G55430	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1,13	2,31E-11
	AT3G26720	glycosyl hydrolase family 38 protein	0,85	5,65E-5
	AT1G70290	ATTPS8 (Arabidopsis thaliana trehalose phosphatase/synthase 8)	0,99	7,47E-8
Modification des protéines	AT1G27120	galactosyltransferase family protein	-1,83	0,00E+0
	AT1G27190	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-1,55	0,00E+0
	AT5G58430	ATEXO70B1 (exocyst subunit EXO70 family protein B1)	-0,92	1,70E-6
	AT5G57500	transferase, transferring glycosyl groups	-0,87	2,48E-5
	AT1G45000	26S proteasome regulatory complex subunit p42D, putative	-0,85	5,10E-5
	AT2G22980	SCPL13 (serine carboxypeptidase-like 13)	0,86	2,70E-5
	AT4G11130	RDR2 (RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2)	0,88	1,32E-5
	AT4G37250	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein	0,88	1,10E-5
	AT1G69100	pepsin A	0,92	2,19E-6
	AT5G03240	UBQ3 (POLYUBIQUITIN 3)	0,94	9,13E-7
AT1G53780	26S proteasome AAA-ATPase subunit, putative	0,94	8,72E-7	
Lipides	AT1G28600	carboxylic ester hydrolase	-1,20	0,00E+0
	AT3G21260	GLTP3 (GLYCOLIPID TRANSFER PROTEIN 3)	1,22	0,00E+0
Azote	AT1G37130	NIA2 (NITRATE REDUCTASE 2)	-1,41	0,00E+0
	AT5G19550	ASP2 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 2)	-1,03	7,43E-9
Sulfate	AT5G43780	APS4	0,71	1,58E-2
Transport	AT2G04040	ATDTX1; antiporter/ multidrug efflux pump/ multidrug transporter	-1,37	0,00E+0
	AT4G24570	mitochondrial substrate carrier family protein	-1,25	0,00E+0
	AT2G22500	mitochondrial substrate carrier family protein	-1,13	3,85E-11
	AT5G14040	mitochondrial phosphate transporter	-0,94	8,12E-7
	AT2G27510	ATFD3 (FERREDOXIN 3); electron carrier	-0,88	1,66E-5
	AT1G79410	transporter-related	-0,75	3,08E-3

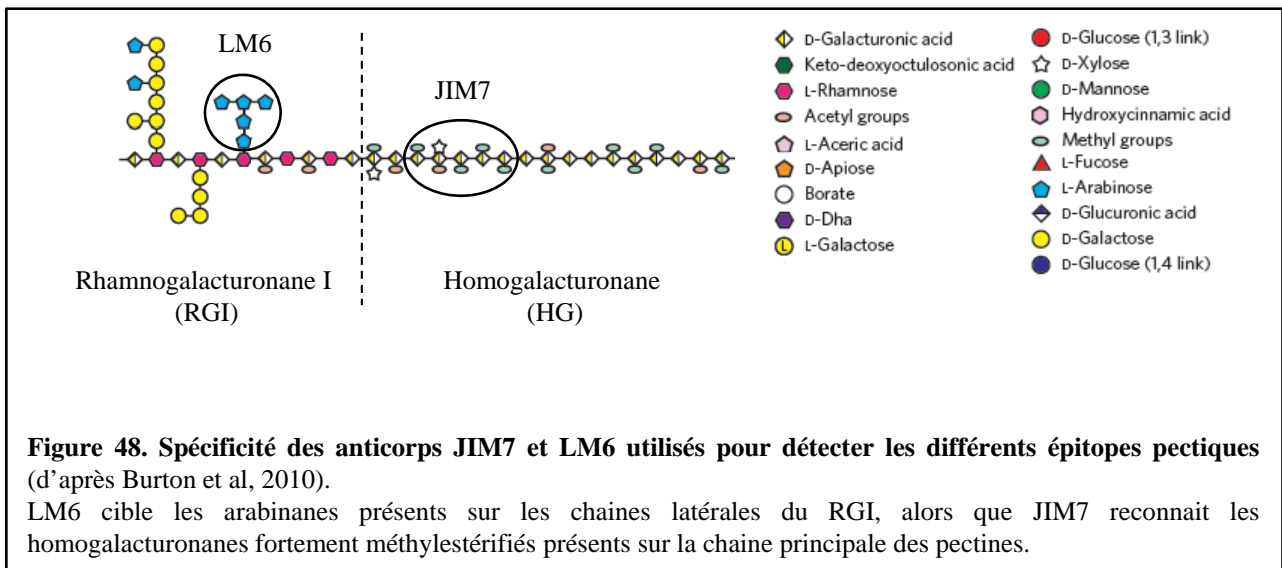
	AT4G35920	unknown protein	0,69	2,91E-2
	AT3G61010	glycosyl hydrolase family protein 85	0,89	8,14E-6
Acides aminés	AT4G35630	PSAT (phosphoserine aminotransferase)	-1,42	0,00E+0
	AT3G61440	ATCYSC1 (BETA-SUBSTITUTED ALA SYNTHASE 3;1)	-1,15	7,70E-12
	AT1G77670	aminotransferase class I and II family protein	-1,02	1,21E-8
	AT3G48560	CSR1 (CHLORSULFURON/IMIDAZOLINONE RESISTANT 1)	-0,99	7,10E-8
	AT3G03780	AtMS2 (Arabidopsis thaliana methionine synthase 2)	-0,76	2,68E-3
	AT1G65960	GAD2 (GLUTAMATE DECARBOXYLASE 2)	-0,71	1,55E-2
	AT1G03090	MCCA (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1)	0,77	1,77E-3
	AT1G80050	APT2 (ADENINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE 2)	0,77	1,29E-3
Processus métabolique	AT2G44070	eukaryotic translation initiation factor 2B family protein	-0,95	5,01E-7
	AT5G14590	isocitrate dehydrogenase, putative	-0,78	9,71E-4
	AT1G68620	unknown protein	-0,75	3,92E-3
	AT2G17280	phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein	-0,73	5,96E-3
	AT1G45110	tetrapyrrole methylase family protein	-0,68	4,46E-2
Processus catabolique	AT1G17180	ATGSTU25 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 25)	-2,41	0,00E+0
	AT5G62480	ATGSTU9 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 9)	-1,14	1,54E-11
	AT2G29490	ATGSTU1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 19)	-0,84	9,28E-5
Processus inconnu	AT4G37370	CYP81D8 (cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8)	-1,69	0,00E+0
	AT3G02550	lateral organ boundaries domain protein 41 (LBD41)	-1,61	0,00E+0
	AT1G66700	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1,56	0,00E+0
	AT4G37290	unknown protein	-1,55	0,00E+0
	AT4G12735	unknown protein	-1,53	0,00E+0
	AT5G39050	transferase family protein	-1,51	0,00E+0
	AT1G05670	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-1,38	0,00E+0
	AT4G33070	pyruvate decarboxylase, putative	-1,36	0,00E+0
	AT4G01870	tolB protein-related	-1,29	0,00E+0
	AT2G16660	nodulin family protein	-1,21	0,00E+0
	AT1G66690	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1,20	0,00E+0
	AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-1,17	0,00E+0
	AT3G43250	cell cycle control protein-related	-1,17	0,00E+0
	AT5G42830	transferase family protein	-1,17	0,00E+0
	AT5G38200	catalytic	-1,14	2,31E-11
	AT5G18470	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	-1,14	1,54E-11
	AT5G17760	AAA-type ATPase family protein	-1,12	6,93E-11
	AT4G24110	unknown protein	-1,11	7,70E-11
	AT5G55150	F-box family protein	-1,11	8,47E-11
	AT1G23890	NHL repeat-containing protein	-1,11	9,24E-11
	AT1G53480	MRD1 (MTO 1 RESPONDING DOWN 1)	-1,10	1,85E-10
	AT5G43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	-1,07	8,01E-10
	AT1G31660	unknown protein	-1,07	1,09E-9
	AT2G41180	sigA-binding protein-related	-1,06	1,96E-9
	AT2G23270	unknown protein	-1,03	8,99E-9
	AT5G25250	unknown protein	-1,01	2,07E-8
	AT5G53740	unknown protein	-0,98	1,04E-7
	AT2G05540	glycine-rich protein	-0,98	1,18E-7
	AT5G44060	unknown protein	-0,95	5,46E-7
	AT3G23170	unknown protein	-0,94	7,69E-7
	AT2G25250	unknown protein	-0,88	1,32E-5
	AT2G14247	unknown protein	-0,87	1,95E-5
	AT2G15780	glycine-rich protein	-0,86	3,87E-5
	AT5G14730	unknown protein	-0,85	4,35E-5
	AT4G26950	unknown protein	-0,85	6,21E-5
	AT4G15120	VQ motif-containing protein	-0,82	2,23E-4
	AT5G04340	C2H2; nucleic acid binding / transcription factor/ zinc ion binding	-0,82	2,24E-4
	AT1G28190	unknown protein	-0,82	2,24E-4
	AT3G52520	unknown protein	-0,79	6,44E-4
	AT1G08315	armadillo/beta-catenin repeat family protein	-0,73	7,38E-3
	AT1G18290	unknown protein	0,69	2,70E-2
	AT3G47675	unknown protein	0,69	2,84E-2
	AT5G22240	ATOF10/OF10 (Arabidopsis thaliana ovate family protein 10)	0,75	2,92E-3
	AT3G28510	AAA-type ATPase family protein	0,76	1,99E-3
	AT4G15340	ATPEN1 (Arabidopsis thaliana pentacyclic triterpene synthase 1)	0,80	3,73E-4
	AT1G21780	BTB/POZ domain-containing protein	0,81	2,79E-4
	AT3G26890	unknown protein	0,86	3,28E-5
	AT1G62035	MIR171C	0,86	2,68E-5
	AT1G70620	cyclin-related	0,87	2,07E-5
	AT2G33830	dormancy/auxin associated family protein	0,89	1,00E-5
	AT5G46295	unknown protein	0,90	6,16E-6
	AT4G32480	unknown protein	0,90	5,61E-6
	AT3G54500	unknown protein	0,93	1,18E-6
	AT5E30870	EUGENE prediction	0,94	7,42E-7
	AT1G50750	unknown protein	0,95	4,90E-7
	AT2G34730	myosin heavy chain-related	0,96	2,88E-7

AT4G34600	unknown protein	0,99	7,40E-8
AT5G27860	unknown protein	0,99	5,77E-8
AT2G38400	AGT3 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 3)	1,03	8,88E-9
AT5G25560	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	1,09	2,77E-10
AT1G52710	cytochrome c oxidase-related	1,09	2,39E-10
AT1G25097	unknown protein	1,16	7,70E-12

RESULTATS - CHAPITRE 2 :
ROLE DE LA PAROI VEGETALE DANS LE
PATHOSYSTEME ARABIDOPSIS - *R. SOLANACEARUM*

Ce second chapitre est le fruit de plusieurs approches visant à mieux comprendre le rôle de la paroi végétale d'Arabidopsis dans l'interaction avec *R. solanacearum*. Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à la caractérisation du processus infectieux de jeunes plantules dans un système *in vitro* (Digonnet et al, en préparation). J'ai également contribué au criblage d'une collection de mutants issue de l'équipe de Deborah Goffner, dans le cadre d'une collaboration avec Antonio Molina (CBGP, Madrid, Espagne) et les résultats obtenus font l'objet d'un article en préparation (Rivière et al). Enfin, dans le cadre d'une collaboration de Kempe Foundation, j'ai été associé à deux projets de l'équipe d'Hannele Tuominen (UPSC, Umea, Suède) qui feront l'objet de deux articles.

Dans ce chapitre, les différents résultats obtenus seront décrits et discutés de façon conjointe. Dans un premier temps, je vous présenterai quelques résultats marquants obtenus lors d'une approche d'immunolocalisation destinée à étudier le devenir de la paroi végétale lors de l'infection par *R. solanacearum*. Les données obtenues ont ensuite été confortées par une approche bioinformatique dont je vous présenterai la démarche suivie. Dans un second temps, une description des résultats des criblages de mutants pour leur sensibilité à la bactérie sera proposée.



1. Etude du processus infectieux de *R. solanacearum* chez *Arabidopsis* dans un système *in vitro*

1.1 Approche microscopique

La capacité des agents pathogènes à dégrader efficacement la paroi végétale est un élément important de leur processus infectieux dans le but de coloniser la plante. Il est donc important de bien comprendre les différentes étapes de l'infection et ce, dès le début de l'interaction entre les deux partenaires. Une stratégie intéressante dans cette optique est l'analyse immunocytochimique des tissus végétaux infectés. Pour cela, de nombreux anticorps spécifiques de certains épitopes des pectines ou de l'hémicellulose ont été utilisés. Parmi eux, dans le cas des pectines, les homogalacturonanes (HG) faiblement ou fortement méthylestérifiés peuvent être étudiés respectivement avec JIM5 et JIM7 (Willats et al., 2000), alors que les arabinanes peuvent être analysés avec LM6 (Willats et al., 1998) (Fig. 48). De son côté, LM10 permet d'étudier les xylanes des parois secondaires (McCartney et al., 2005).

Différents pathosystèmes ont ainsi été étudiés. Par exemple, la colonisation des racines de *Xanthosoma sagittifolium*, une plante tropicale d'intérêt agronomique important, par le champignon *Pythium myriotylum* a été menée (Boudjeko et al., 2006). Cette étude a démontré que, suite à l'inoculation, un réarrangement pariétal avait lieu notamment au niveau du cortex, puisque l'anticorps JIM5 est uniquement détectable dans la stèle, mais plus dans les cellules corticales (Boudjeko et al., 2006). L'hydrolyse de l'HG a été confirmée par la réduction de la teneur en acide galacturonique (GalA) dans les parois des cellules de racines infectées (Boudjeko et al., 2006). Concernant les xyloglucanes, aucune modification n'a été observée entre les racines saines et les racines infectées (Boudjeko et al., 2006). Dans le pathosystème Tomate – *R. solanacearum*, deux travaux ont pu mettre en évidence que des génotypes de tomate résistants à la bactérie possèdent davantage d'HG fortement méthylestérifié (détecté par l'anticorps JIM7) que les génotypes sensibles (Wydra and Beri, 2006, 2007). Suite à l'infection, ce degré de méthylestérification diminue chez les plantes sensibles et résistantes, rendant l'HG détectable par l'anticorps JIM5 (Wydra and Beri, 2006, 2007).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation du processus infectieux de *R. solanacearum* chez l'accession sauvage Col0 d'*Arabidopsis* dans un système *in vitro*. L'objectif était de déterminer les modifications pariétales subies par la plante lors de

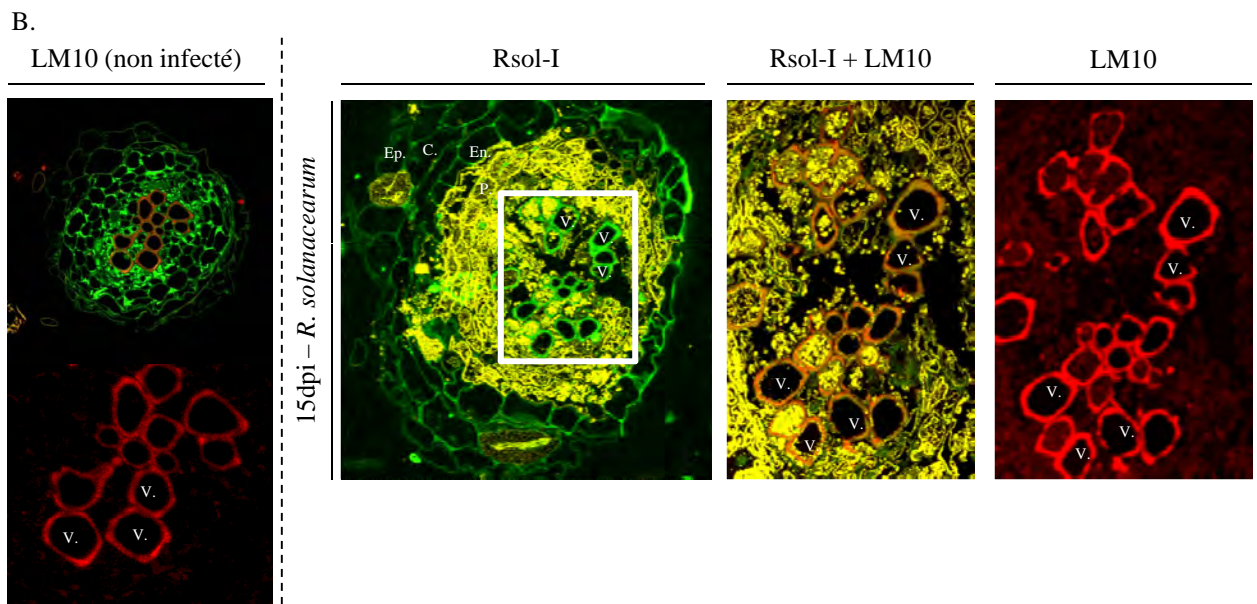
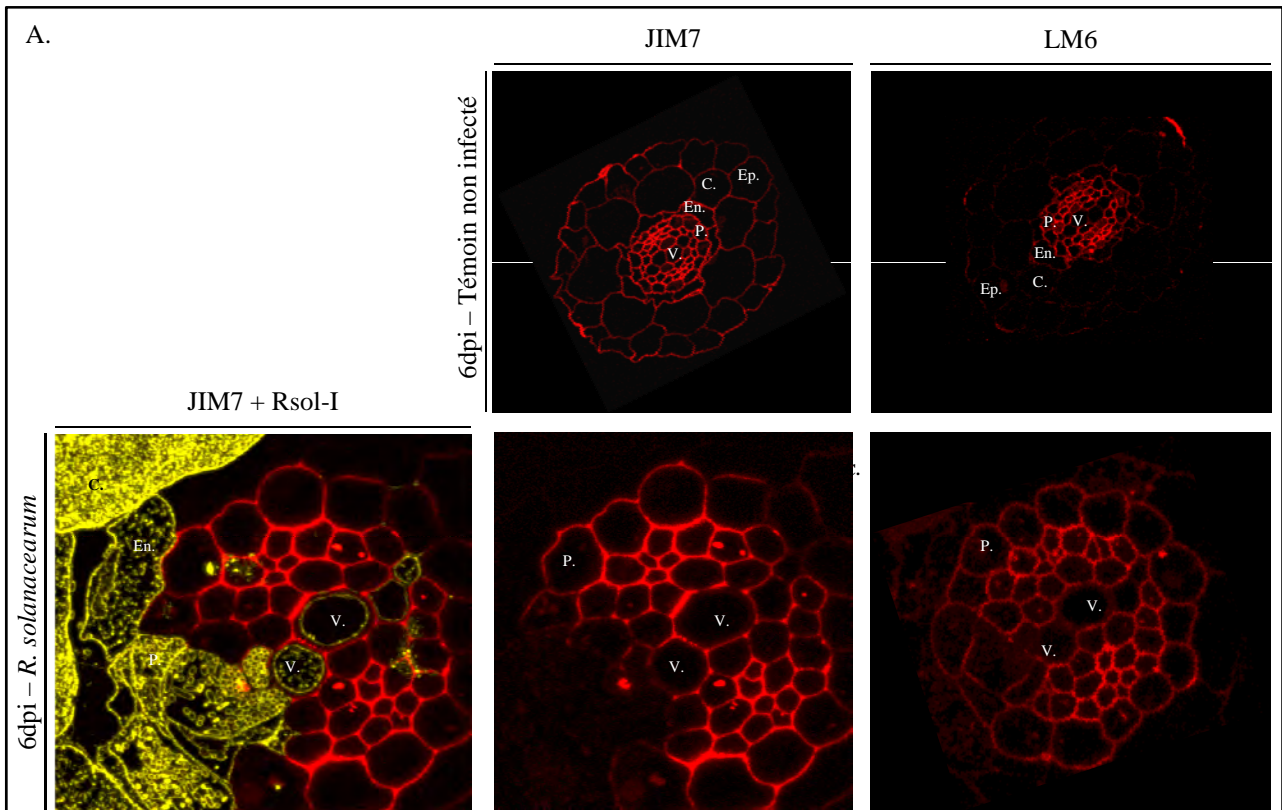


Figure 49. Modification de la composition pariétale d'Arabidopsis suite à l'inoculation avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.

A. Observations au microscope confocal de coupes transversales de racines d'Arabidopsis, 6 jours (dpi) après inoculation avec de l'eau (panel du haut) ou avec la bactérie (panel du bas). Les bactéries sont reconnues par l'anticorps Rsol-I et apparaissent en jaune. L'homogalacturonane fortement méthylestérifié est reconnu par JIM7, alors que LM6 est spécifique des arabinanes. Les composés pariétaux apparaissent en rouge.

B. Observations au microscope confocal de coupes transversales de racines d'Arabidopsis 15 jours (dpi) après inoculation avec de l'eau (témoin non infecté, photographie de gauche) ou avec la bactérie (panel du droite). Les bactéries sont reconnues par l'anticorps Rsol-I et apparaissent en jaune. L'autofluorescence des tissus végétaux est visualisée en vert. Les xylanes, détecté par LM10, apparaissent en rouge.

Ep. : épiderme ; C. : cortex ; En. : endoderme ; P. : péricycle ; V. : vaisseau.

l'infection par la bactérie et plus particulièrement, les pectines et les xylanes. Pour cela, des études d'immunolocalisation avec des anticorps spécifiques de ces composés (JIM7, LM6 et LM10) ont été menées à 6 et 15dpi dans les racines de plantules infectées avec la souche virulente GMI1000 de *R. solanacearum*. En parallèle, la bactérie a été observée à l'aide de l'anticorps spécifique Rsol-I.

Dans une racine non infectée, l'utilisation de l'anticorps JIM7 permet de visualiser la présence d'HG fortement méthylestérifié dans tous les types cellulaires, de l'épiderme aux vaisseaux (Fig. 49-A, panel du haut). Les arabinanes sont mis en évidence par LM6 dans le cylindre central, du péricycle aux vaisseaux (Fig. 49-A, panel du haut).

Dans une racine étudiée six jours après inoculation avec *R. solanacearum*, les bactéries, révélées par Rsol-I, sont présentes dans certaines cellules de l'épiderme, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et des vaisseaux (Fig. 49-A, panel du bas). De façon intéressante, à 6dpi, le signal JIM7 n'est plus détecté que dans le cylindre central, indiquant que dans l'épiderme, le cortex et l'endoderme, la paroi ne présente plus d'HG fortement méthylestérifié ou que les épitopes reconnus par l'anticorps sont masqués et ce, même si toutes les cellules ne sont pas infectées (Fig. 49-A, panel du bas). Les cellules du péricycle et les vaisseaux colonisés par les bactéries ont également une paroi dégradée au niveau de l'HG (Fig. 49-A, panel du bas). L'utilisation de LM6 permet de visualiser l'absence de dégradation des arabinanes, indiquant que l'infection de la racine ne modifie pas la composition pariétale à ce niveau (Fig. 49-A, panel du bas). L'ensemble des observations réalisées à 6dpi indiquent qu'il existe une dégradation sélective de la paroi végétale au cours de l'infection par *R. solanacearum* et que l'HG du squelette des pectines est dégradé, contrairement aux arabinanes des chaînes latérales.

Chez *Arabidopsis* Col0, l'absence de signal JIM7, ainsi que JIM5 (Catherine Digonnet, communication personnelle), dans les cellules épidermiques et corticales à 6dpi indique que l'HG est déméthylestérifié en réponse à *R. solanacearum* (Fig. 49). Curieusement, ceci est observé qu'il y ait ou non des bactéries dans les cellules. Il semblerait donc que la déméthylestérification de l'HG soit une réponse globale de la plante lors de l'infection. D'autres observations ont montré qu'il y avait une plasmolyse des cellules du cortex dès que des bactéries sont présentes autour de la racine (Catherine Digonnet, communication personnelle). Dès lors, il est possible d'imaginer deux options : soit la plante induit elle-même une réorganisation de ses pectines pour tenter de contenir la bactérie ; soit c'est la bactérie elle-même qui induit ce changement pour faciliter son processus infectieux. Il est également

possible d'imaginer une hydrolyse des HG par la plante elle-même, suite à la libération d'enzymes hydrolytiques (homogalacturonases), lors de la plasmolyse des cellules.

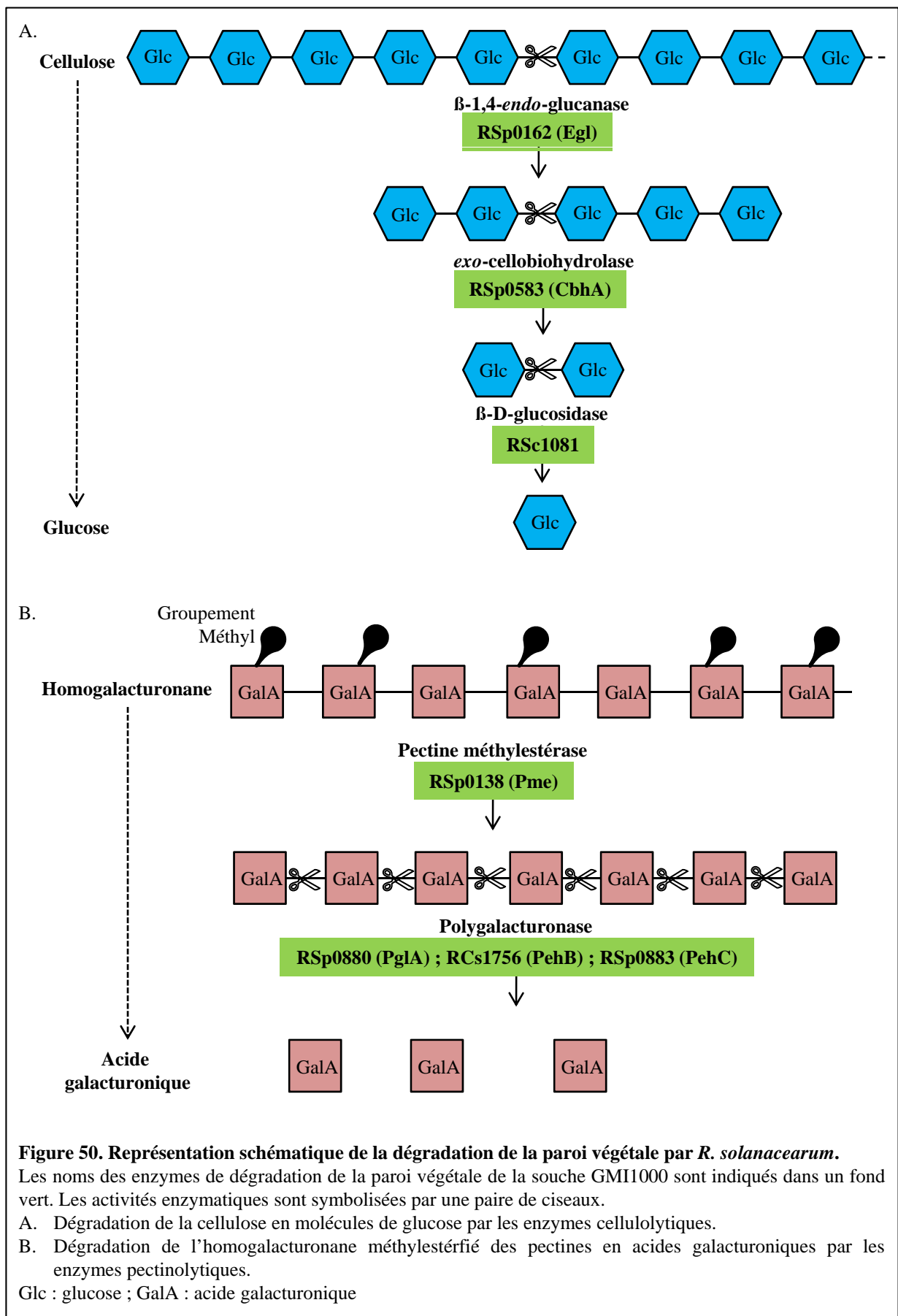
Ces observations sont malgré tout en accord avec des travaux exploitant d'autres pathosystèmes et dans lesquels il a été montré que la composition en pectine des parois était modifiée lors d'une infection (Boudjeko et al., 2006; Wydra and Beri, 2006, 2007).

Concernant le devenir des xylanes au cours de l'interaction entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum*, une étude a été effectuée à 15dpi par rapport à une racine témoin non infectée (Fig. 49-B). En l'absence d'infection, les xylanes sont détectés dans tous les vaisseaux de la racine (Fig. 49-B). A 15dpi, les bactéries ont fortement colonisé tout le cylindre central et la plupart des vaisseaux, comme le montre la coloration jaune suite au marquage des bactéries avec Rsol-I (Fig. 49-B). Bien que les vaisseaux soient pour la plupart colonisés, cela ne s'accompagne pas d'une dégradation importante des xylanes puisque le signal LM10 est parfaitement visible (Fig. 49-B). Ces données indiquent que la dégradation massive des xylanes des parois secondaires n'est pas un pré-requis à l'invasion des vaisseaux du xylème.

Comme nous venons de le voir, l'approche microscopique a révélé l'existence d'une dégradation sélective de certains composants pariétaux lors de l'infection d'Arabidopsis par R. solanacearum. Par la suite, j'ai entrepris de vérifier la corrélation existant entre la capacité théorique de la bactérie à dégrader la paroi végétale et les observations concrètes que nous venons de caractériser. Pour cela, j'ai effectué une recherche bioinformatique pour recenser, chez la bactérie, l'arsenal enzymatique de dégradation de la paroi.

1.2 Approche bioinformatique

Dans un premier temps, la démarche était basée sur l'utilisation de la base de données MaGe (Magnifying Genomes ; <http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>) qui regroupe les annotations de nombreux génomes microbiens (Vallenet et al., 2006), ainsi que la base de données créée au LIPM pour recenser les informations obtenues suite au séquençage du génome de *R. solanacearum* (<http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi>). A partir de mots-clés (cellulase, pectinemethylesterase, glucanase, polygalacturonase, xylanase, xylosidase, arabinanase...) caractéristiques des différents types d'enzymes de dégradation de



la paroi (CWDE, cell wall degrading enzyme), l'analyse bioinformatique a permis d'établir une liste de 7 enzymes présentes dans le génome de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* (Tab. XII). Il s'agit d'enzymes cellulolytiques (Egl, CbhA, glucosidase) et pectinolytiques (PehA, PehB, PehC, Pme). Pour ce qui concerne la cellulose, *Ralstonia solanacearum* possède l'arsenal suffisant pour en assurer la dégradation totale (Fig. 50-A). Pour ce qui est des pectines, les enzymes présentes chez la bactérie sont impliquées dans la dégradation du squelette (Fig. 50-B). Ce résultat n'est pas une surprise puisque ces sept enzymes ont toutes été précédemment décrites depuis une vingtaine d'années, en étudiant l'interaction entre la souche K60 de la bactérie et sa plante hôte, la tomate (Schell et al., 1988; Huang and Allen, 1997; Tans-Kersten et al., 1998; Gonzalez and Allen, 2003). Plus récemment, une étude originale a été effectuée avec la souche GMI1000, isolée sur tomate. En combinant différentes mutations de six CWDE connues chez *R. solanacearum* (Egl, CbhA, PehA, PehB, PehC, Pme), les auteurs ont pu comparer le pouvoir pathogène de 15 souches dérivées afin de déterminer l'impact de la perte de chaque enzyme sur la virulence de la bactérie sur tomate (Liu et al., 2005). Tout d'abord, la souche GMI-6, dans laquelle les six enzymes ont été inactivées, devient moins virulente sur tomate (Liu et al., 2005). Ces résultats montrent que la présence simultanée des six enzymes est nécessaire pour que *R. solanacearum* soit pleinement virulente sur tomate. En étudiant séparément le rôle des enzymes pectinolytiques (PehA, PehB, PehC, Pme) et cellulolytiques (Egl, CbhA), les auteurs ont pu établir leur importance réciproque. Ainsi, la mutation d'une seule enzyme cellulolytique (Egl ou CbhA) suffit pour diminuer la virulence de la bactérie, un phénotype accentué par la perte couplée de ces deux enzymes (Liu et al., 2005). En revanche, la perte individuelle ou combinée d'une ou plusieurs enzymes pectinolytiques n'a aucune incidence sur la virulence des souches générées, excepté pour la souche GMI-31 (triple mutant *peh*) qui semblerait être légèrement plus virulente que la souche sauvage (Liu et al., 2005). De ce fait, la dégradation de la cellulose semble être une étape plus critique que celle des pectines puisque, finalement, la virulence est réduite uniquement dans les souches déficientes pour Egl et/ou CbhA, que les enzymes pectinolytiques soient présentes ou non (Liu et al., 2005).

L'approche bioinformatique par "mots-clés" n'a en revanche pas permis d'identifier des enzymes annotées xylanase, arabinanase, xylosidase, etc, dans la souche GMI1000. A partir de ce constat, il était important de déterminer si l'absence de ce type d'annotation était restreinte à GMI1000, isolée sur tomate et virulente sur Arabidopsis, ou plus généralement étendue à toutes les souches de *R. solanacearum*. Pour cela, l'approche bioinformatique a été

Tableau XII. Arsenal enzymatique de *R. solanacearum* potentiellement impliqué dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale.

Les annotations sont issues des données disponibles sur les sites : <http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/ralso.cgi> et <http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>

Activité enzymatique	Nom	Souches de <i>R. solanacearum</i>					
		GMI1000	IPO1609	Molk2	CFBP2957	PSI07	CMR15
Glucanase	CbhA	RSp0583	RSIPO_03298	RSMK02634	RCFBP_mp10603	RPSI07_2500	CMR15v4_mp10538
	Egl	RSp0162	RSIPO_02945	RSMK04959	RCFBP_mp10153,	RPSI07_mp0109	CMR15v4_mp10129
		RSc0818	RSIPO_02176	RSMK04675	RCFBP_20597	RPSI07_2525	CMR15v4_30078
Glucosidase		RSc1081	RSIPO_01754	RSMK00055	-	RPSI07_2310	CMR15v4_20200
Pectinmethylesterase	Pme	RSp0138	RSIPO_03115	RSMK03579	RCFBP_mp10131	RPSI07_mp0104	CMR15v4_mp10121
Polygalacturonase	PehA (PglA)	RSp0880	RSIPO_03945	RSMK02990	RCFBP_mp20327	RPSI07_mp0827-	CMR15v4_mp10861
	PehB	RSc1756	RSIPO_01310	RSMK00836	RCFBP_11765	RPSI07_0327	CMR15v4_11765
	PehC	RSp0833	RSIPO_03888	RSMK02881	RCFBP_mp20277	RPSI07_mp0777	CMR15v4_mp10809

appliquée à cinq autres souches isolées sur tomate (CMR15, CFBP2957, PSI07), sur pomme de terre (IPO1609) et sur banane (Molk2), dont les génomes ont été plus récemment séquencés (Remenant et al., 2010). La recherche effectuée indique que les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques déjà décrites chez GMI1000 sont toutes présentes dans les cinq autres souches (Tab. XII). Cependant, il n'y a toujours aucune annotation concernant d'autres types de CWDE, indiquant que l'arsenal enzymatique de *R. solanacearum* est présent intégralement dans l'ensemble des souches étudiées et qu'aucune spécificité pouvant dépendre du spectre d'hôte des souches n'a pu être mise en évidence.

Les deux premières étapes de la démarche bioinformatique ont révélé qu'il n'y a pas chez *R. solanacearum* d'enzymes prédites pour dégrader autre chose que le squelette des pectines et la cellulose. Cependant, cela ne signifie pas qu'il n'existe pas réellement d'autres enzymes de dégradation de la paroi végétale. Autrement dit, soit les sept CWDE identifiées sont les seules présentes chez *R. solanacearum*, soit d'autres enzymes existent mais les annotations chez cette bactérie ne sont pas complètes. Pour déterminer laquelle des deux hypothèses est correcte, la recherche bioinformatique a été étendue à la souche ATCC33913 de *Xcc*, une bactérie au fort potentiel de dégradation de la paroi végétale, avec pas moins de 40 enzymes : 9 pectinolytiques, 13 hémicellulolytiques et 18 cellulolytiques (da Silva, 2002). Il existe des orthologues à certaines de ces enzymes chez *R. solanacearum*. Par exemple, XCC2266 possède 53% d'identité et 66% de similarité avec PehA, alors que XCC2265 est une pectine méthylestérase ayant 60% d'identité et 73% de similarité de séquence protéique avec Pme (Blanvillain, 2007). Liu et ses collaborateurs indiquent également que *Xcc* possède un orthologue de CbhA ayant plus de 75% de similarité de séquence (Liu et al., 2005). Par conséquent, il était intéressant de rechercher dans la souche GMI1000 la présence d'éventuels orthologues à une gamme plus large d'enzymes de dégradation de la paroi. Pour cela, l'utilisation de certains "mots-clés" (xylanase, xylosidase, arabinosidase, fucosidase, arabinofuranosidase, glucuronidase et galactosidase) a permis d'établir une liste de 12 protéines chez *Xcc*. La dernière étape de la démarche a consisté à rechercher, par BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), les séquences protéiques correspondantes aux 12 de *Xcc* chez *R. solanacearum* GMI1000, sans qu'aucun orthologue n'ait pu être identifié.

Autrement dit, l'approche bioinformatique indique que le génome de *R. solanacearum* ne contient pas d'enzymes annotées arabinanase, xylanase, ni même de protéines différemment annotées mais possédant une identité forte avec des CWDE de *Xcc*. En complément, l'approche microscopique a révélé que lors de l'infection de la racine

d'Arabidopsis, *R. solanacearum* n'est pas capable de dégrader les arabinanes des pectines, ni le xylane présent dans les parois des vaisseaux. Notre démarche expérimentale trouve donc un écho dans la recherche bioinformatique pour expliquer les étapes du processus infectieux de la bactérie.

La composition pariétale est donc déterminante pour résister ou non à la dégradation par les enzymes de R. solanacearum. Après avoir décrit, dans cette première partie, comment la paroi végétale répond à une inoculation avec la bactérie, nous allons voir dans une seconde partie comme Arabidopsis se comporte lorsque des gènes impliqués dans la mise en place de la paroi ou de la mort cellulaire lors de la formation du xylème sont mutés.

2. Identification de mutants “paroi et mort cellulaire” affectés dans leur réponse à *Ralstonia solanacearum*

2.1 Crible de mutants “parois”

La paroi végétale se situe à l'interface entre la plante et son environnement. De ce fait, elle joue un rôle primordial dans les interactions entre plantes et agents pathogènes, par exemple en tant que barrière physique génératrice de signaux lors d'une attaque hostile. Paradoxalement, en dépit de l'importance de la paroi végétale dans la réponse à un stress biotique, un nombre relativement restreint de mutants a été décrit, dont plusieurs exemples sont cités dans la partie 3 de l'introduction. C'est notamment le cas de *cev1/ixr2/cesa3* (Ellis and Turner, 2001; Ellis et al., 2002a; Ellis et al., 2002b), *irx5-5/cesa4* et *irx1-6/cesa8* (Hernandez-Blanco et al., 2007), *pmr4* (Vogel and Somerville, 2000; Nishimura et al., 2003) ou encore *pmr6* (Vogel et al., 2002). Le nombre restreint de mutants “paroi” identifiés dans des approches de phytopathologie s'explique par les stratégies employées : jusqu'à présent, les différentes études étaient menées sans a priori et dans certains cas, les auteurs ont pu associer paroi et réponse aux agents pathogènes. A partir d'une approche menée chez *Zinnia*, décrite dans la partie 4 de l'introduction, l'équipe de Deborah Goffner a pu identifier un panel de gènes différentiellement exprimés au cours de la formation de la paroi secondaire (Pesquet et al., 2005). Grâce à la collection de mutants “paroi” correspondants obtenus chez *Arabidopsis*, nous avons la possibilité de réaliser une étude originale afin d'ouvrir des pistes pour mieux comprendre les mécanismes liés à la paroi et déterminant la réponse aux agents

Tableau XIII. Liste des 28 mutants “paroi” présentant une réponse modifiée à différents agents pathogènes (Rivière et al, en préparation).

Les mutants sont classés par ordre alphabétique. R : mutant plus résistant que le sauvage; WR : mutant légèrement plus résistant que le sauvage ; HS : mutant hypersensible par rapport au sauvage ; = : mutant comparable au sauvage ; nd : non déterminé.

Annotation	R.	P.	H.
	<i>solanacearum</i>	<i>cucumerina</i>	<i>arabidopsidis</i>
De-etiolated 3	R	R	nd
Fragile fiber 3 (FRA3) ; Type II inositol polyphosphate phosphatase	R	R	nd
Irregular xylem 1 (IRX1) ; Cellulose synthase 8 (CESA8)	R	R	nd
IRX3 ; CESA7	R	R	nd
Walls are thin 1 (WAT1) ; Nodulin 21 family protein	R	R	nd
IRX11 ; Homeodomain containing protein	R	HS	nd
Papain-type cysteine endopeptidase (XCP2)	R	=	R
IRX10 ; Glycosyltransferase family 47	R	=	WR
Cobra-like 4	R	=	HS
IRX4 ; Cinnamoyl coA-reductase 1 (CCR1)	R	=	nd
Type-A response regulator (ARR6)	HS	R	R
Senescence-associated gene 21 (SAG21)	HS	=	R
MaoC-like dehydratase domain-containing protein	HS	=	=
Calmodulin-related	=	R	HS
Transcription initiation protein-related	=	R	HS
Expressed protein (At1g70770)	=	R	=
Expressed protein (At1g23170)	=	HS	R
IRX7 ; FRA8 ; Glycosyltransferase family 47	=	HS	R
Auxin-inducible ACC synthase	=	HS	WR
Peroxidase 33 (PRX33)	=	HS	WR
Argonaute 4 (AGO4)	=	HS	=
Expansin (AtEXP1)	=	=	R
Expressed protein (At3g47510)	=	=	R
Lipid transfer family protein	=	=	R
GTP-Binding protein (SAR1B)	=	=	WR
Methyltransferase	=	=	WR
Ring finger	=	=	WR
IRX2 ; Korrigan 1 (KOR1)	nd	R	nd
Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein	nd	HS	=

pathogènes. Pour cela, l'ensemble des mutants a été testé pour évaluer leur sensibilité à *R. solanacearum*. La puissance de ce criblage a été renforcée en ajoutant des tests d'infections avec deux champignons, *P. cucumerina* et *H. arabidopsidis*, dans le cadre d'une collaboration avec Antonio Molina (CBGP, Madrid). D'autres mutants déjà caractérisés pour leur phénotype pariétal ont également été inclus dans ce projet. L'ensemble des données fait l'objet d'un article qui sera très prochainement soumis (Rivière et al, en préparation).

Les différents tests d'infection ont permis d'identifier, parmi environ 75 lignées étudiées au total, 28 individus chez qui la mutation d'un gène "paroi" provoque une augmentation de la sensibilité ou de la résistance à au moins un des trois agents pathogènes (Tab. XIII). Parmi ces mutants, presque la moitié (13) est affectée dans sa réponse à *R. solanacearum*, dont 9 sont plus résistants que leur témoin sauvage (Tab. XIII). Par exemple, *ARR6* (*Type-A Arabidopsis response regulator 6*) est un régulateur positif de la formation des vaisseaux du protoxylème (Kondo et al., 2011). Suite à l'inoculation du mutant *arr6* avec *R. solanacearum*, les premiers symptômes apparaissent à 3dpi, soit un jour plus tôt que chez le témoin sauvage (Fig. 51-A). Tout au long de la cinétique, l'index de maladie est plus élevé chez *arr6* par rapport à Col0, indiquant que ce mutant présente une sensibilité accrue à *R. solanacearum* (Fig. 51-A). Parmi les mutants "paroi" testés, trois ont été spécifiquement sélectionnés suite à leur caractérisation au niveau du développement : *fra3* (*fragile fiber 3*), *fra8* et *ifl1* (*interfiberless 1*) (Zhong et al., 1997; Zhong et al., 2004; Zhong et al., 2005). En effet, ces trois mutants possèdent un point commun avec *wat1*, celui de ne pas produire de paroi secondaire au niveau des fibres (Ranocha et al., 2010). Suite à l'inoculation avec *R. solanacearum*, les premiers symptômes de flétrissement apparaissent à 3dpi chez le sauvage Col0, puis la maladie se développe rapidement, les plantes étant mortes à 7dpi (Fig. 51-B). Chez *fra3*, les premiers signes de maladie ne sont visibles qu'à 5dpi et un retard dans l'évolution de la maladie est très nettement observé puisque le mutant atteint le stade DI=2 à 9dpi et DI=3 à 12dpi (Fig. 51-B). Les résultats indiquent que *fra3* présente une diminution de sensibilité à *R. solanacearum*, ainsi qu'au champignon *P. cucumerina* (Tab. XIII). En revanche, les deux autres mutants "fibres" testés, *fra8* et *ifl1*, sont aussi sensibles que Col0 à la bactérie (Fig. 51-B) et *ifl1* présente une sensibilité accrue à *P. cucumerina* (Tab. XIII). Puisque les quatre mutants *wat1*, *fra3*, *fra8* et *ifl1* ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis de *R. solanacearum* et *P. cucumerina*, il semble difficile de corréler le défaut de paroi dans les fibres et le comportement vis-à-vis de ces agents pathogènes.

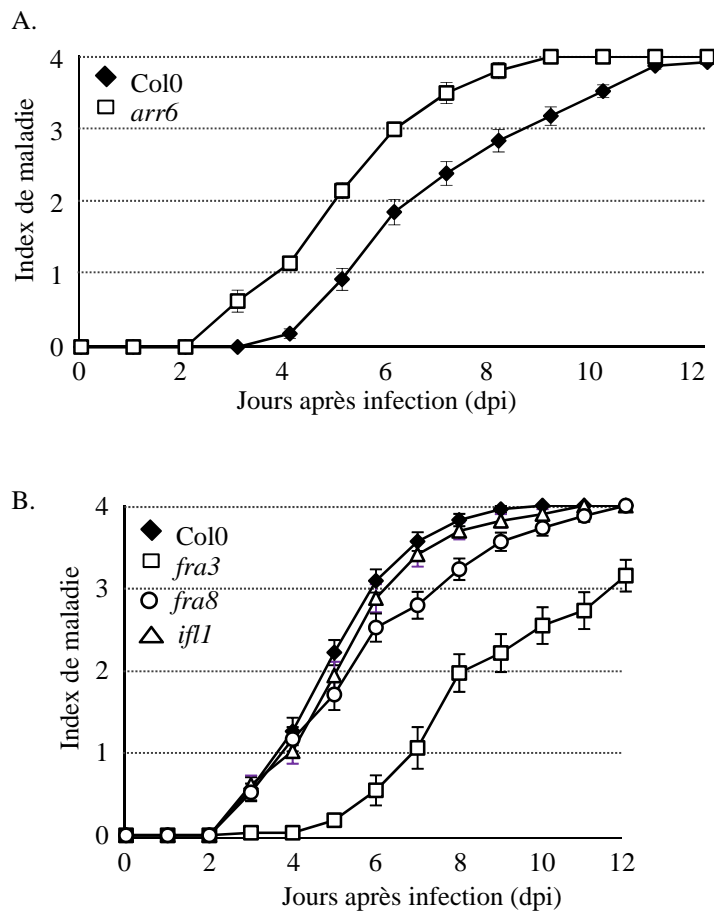


Figure 51. Exemples de mutants “paroi” présentant une sensibilité modifiée à *R. solanacearum*.

Cinétique de développement des symptômes de flétrissement selon l’index de maladie attribué quotidiennement aux différentes lignées étudiées : sauvage (losange noir) et mutant (carré blanc). Les données présentées sont les moyennes (\pm SE) des notes attribuées aux plantes (n=40 pour chaque génotype). Les données présentées sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

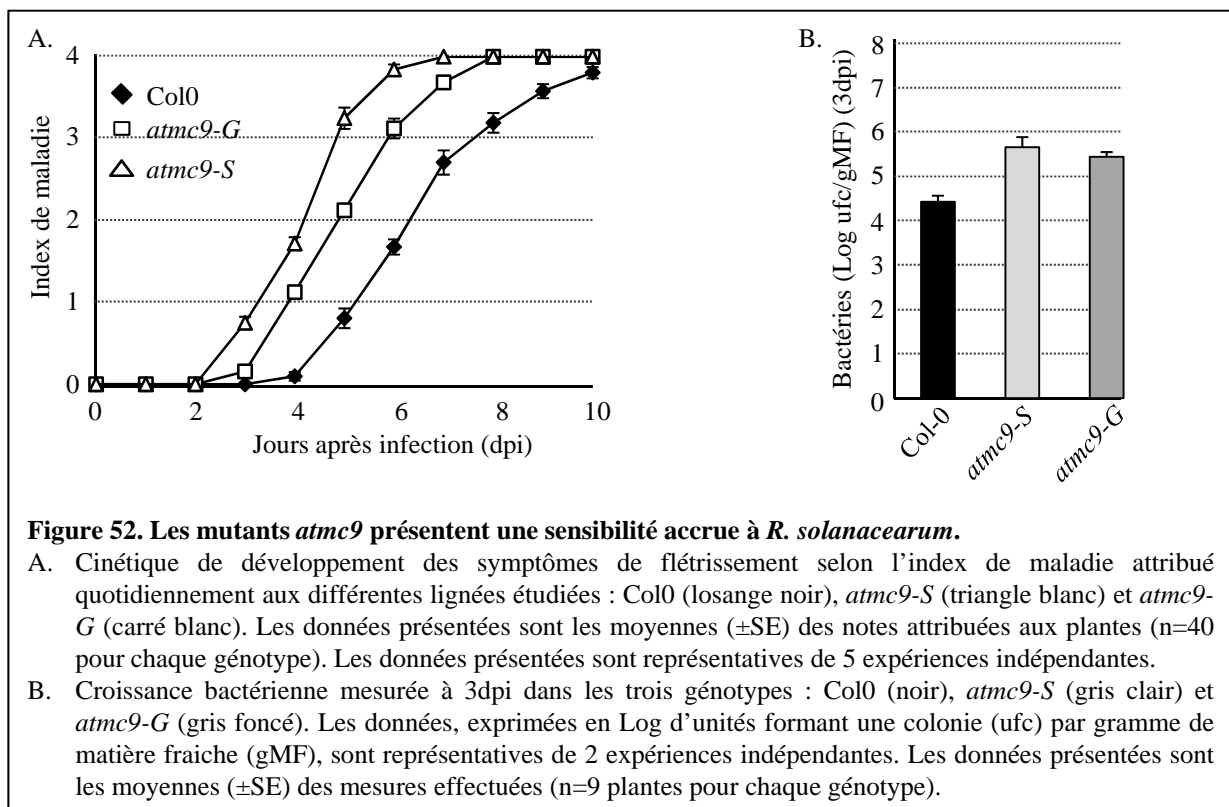
A. Sensibilité du mutant *arr6* comparée au témoin sauvage Col0.

B. Sensibilité du mutant *fra3*, *fra8* et *ifl1* comparée au témoin sauvage Col0.

L'originalité du projet vient du fait que nous avons utilisé une ressource unique de mutants "paroi" pour rechercher des lignées dont la sensibilité est modifiée. Au final, le tableau XIII fait état de 28 mutants présentant une réponse modifiée à au moins un des trois agents pathogènes testés (*R. solanacearum*, *P. cucumerina*, *H. arabidopsidis*). Bien que la corrélation n'est pas systématique entre l'altération de la paroi et la modification de la réponse aux microorganismes, ce crible nous a permis d'identifier de nouveaux candidats et ouvrent des perspectives afin de mieux comprendre le rôle de la paroi dans l'issue des interactions plantes – agents pathogènes (Rivière et al, en préparation).

2.2 Crible de mutants affectés dans la mort cellulaire des vaisseaux du xylème

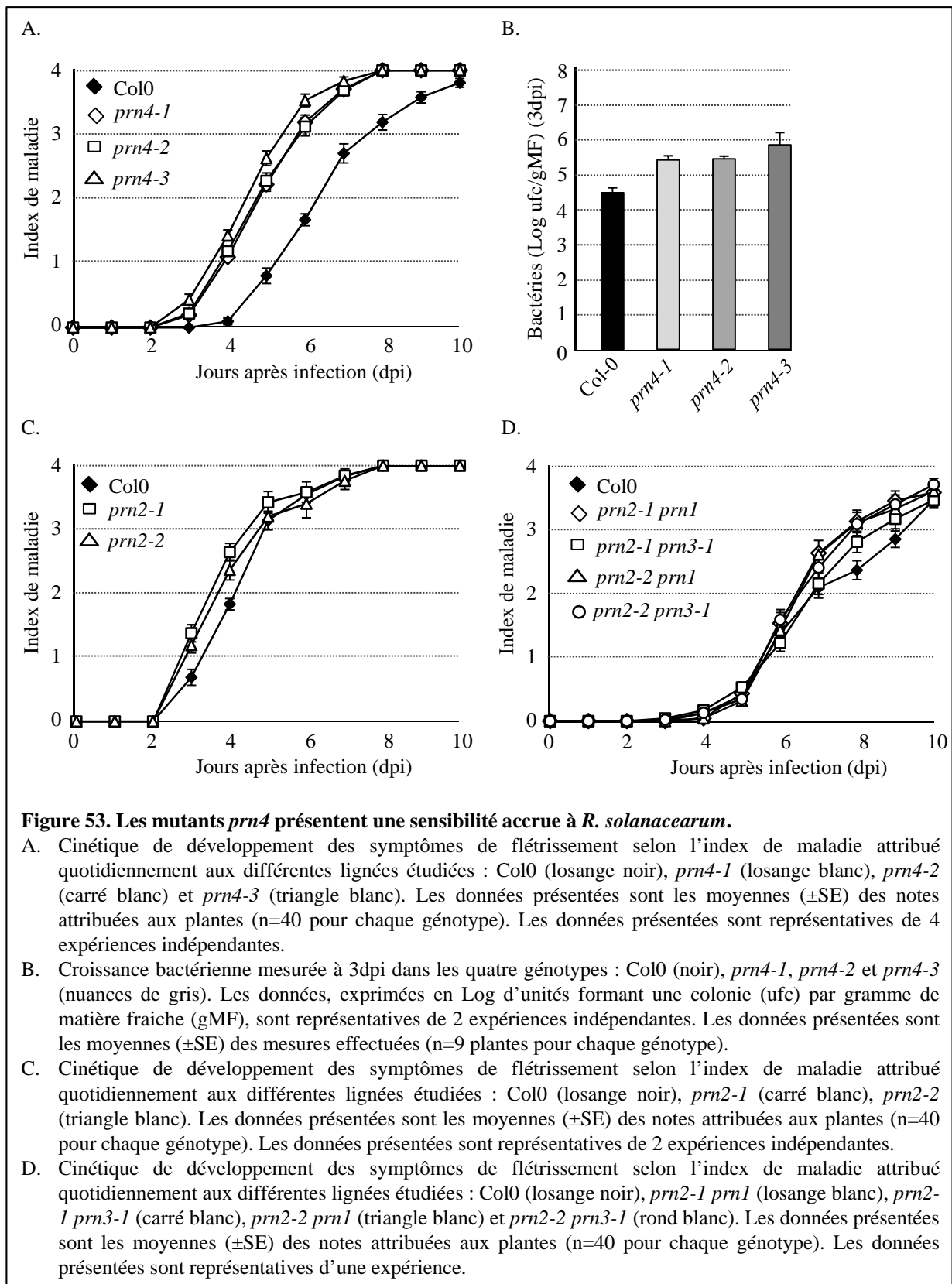
La formation des vaisseaux du xylème s'accompagne d'une étape de mort cellulaire programmée (PCD, programmed cell death) des cellules pour permettre le développement des éléments trachéaires (Turner et al., 2007). Hannele Tuominen (UPSC, Umea, Suède) s'intéresse à cette forme de PCD et l'objectif de son équipe est d'en identifier les régulateurs clés intervenant lors de la formation du xylème chez Arabidopsis et le peuplier. En combinant des données issues de séquences d'EST de tiges de peuplier en cours de mort cellulaire dans les fibres, de microarray sur les tissus vasculaires des tiges de peupliers et les informations disponibles chez Arabidopsis, plusieurs candidats ont été retenus comme de possibles régulateurs de la PCD du xylème. Parmi eux, le gène *AtMC9* code une métacaspase. Il existe 9 métacaspases chez Arabidopsis, dont trois de type I (*AtMC1* à *AtMC3*) qui possède une extension N-terminale riche en proline ou glutamine et six de type II (*AtMC4* à *AtMC9*) sans extension N-terminale (Uren et al., 2000). Leur importance en phytopathologie a été découverte très récemment et, à ce jour, seules deux études ont été publiées (Coll et al., 2010; Watanabe and Lam, 2011). Dans le premier cas, les auteurs ont déterminé que les mutants *atmc1* et *atmc2* présentaient tous les deux un même niveau de colonisation par la souche avirulente *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) que les plantes sauvages (Coll et al., 2010). Cependant, en colorant avec du Bleu de Trypan les cellules mortes dans les feuilles infiltrées avec les bactéries, il a été découvert que chez *atmc1*, les bactéries induisent une mort cellulaire deux fois moins importante que chez le sauvage, alors que chez *atmc2*, le taux de mort cellulaire est plus de deux fois supérieur à celui du sauvage (Coll et al., 2010). Ce résultat a conduit les auteurs à décrire *AtMC1* comme un régulateur positif de mort cellulaire, et *AtMC2* comme un



régulateur négatif (Coll et al., 2010). Dans la seconde étude, il a été montré que le taux de mort cellulaire provoqué par l'infiltration de la souche avirulente de *P. syringae* pv. *maculicola* (*avrRpt2*) est réduit chez le mutant *atmc4* par rapport au témoin sauvage (Watanabe and Lam, 2011). De ce fait, AtMC4 apparait comme un régulateur positif de la mort cellulaire induite par *avrRpt2* (Watanabe and Lam, 2011).

Au cours de ma thèse, j'ai testé la sensibilité de deux mutants alléliques *atmc9* vis-à-vis de *R. solanacearum*, dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe d'Hannele Tuominen et celle de Deborah Goffner (Fig. 52). Suite à l'infection, les symptômes apparaissent à 4dpi chez le témoin sauvage et la maladie évolue pour atteindre DI=4 à 10dpi (Fig. 52-A). De leur côté, les mutants *atmc9* présentent un début de flétrissement dès 3dpi et les symptômes ont déjà dépassé DI=2 à 4dpi (Fig. 52-A). L'évolution des symptômes est plus rapide chez *atmc9* dont les plantes sont mortes (DI=4) entre 7 et 8dpi (Fig. 52-A). Afin de compléter ces données de symptomatologie, la densité bactérienne présente dans les parties aériennes de plantes infectées à 3dpi a été déterminée (Fig. 52-B). A ce temps de la cinétique, 5,5 Log ufc/gMF ont été mesurés chez les deux mutants *atmc9*, soit environ 10 fois plus de bactéries que les plantes sauvages qui contiennent 4,5 Log ufc/gMF (Fig. 52-B). L'ensemble de ces résultats indiquent que la mutation du gène *AtMC9* conduit, chez *Arabidopsis*, à une forte augmentation de la sensibilité à *R. solanacearum*. Il serait intéressant d'étudier la réponse du mutant à un agent pathogène avirulent tel que *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) afin de déterminer si cela modifie la colonisation du mutant par la bactérie et si le taux de mort cellulaire évolue par rapport à un témoin sauvage.

Dans le cadre d'un autre projet, l'équipe d'Hannele Tuominen a généré une banque de données à partir de cultures cellulaires de *Zinnia* dans le but d'identifier des gènes qui sont ⁽¹⁾ activés lors de la phase de mort cellulaire des vaisseaux en différenciation et ⁽²⁾ dont l'expression est dépendant de l'éthylène. Les 4 gènes *AtPirin1-AtPirin4* d'*Arabidopsis* répondent à ces critères et constituent des candidats intéressants pour mieux comprendre les mécanismes intervenant lors de la différenciation des vaisseaux. A ce jour, un seul membre de la famille Pirin a été caractérisé. Il s'agit d'*AtPirin1*, dont le mutant *prn1* est hypersensible à l'ABA et qui a été décrit comme un régulateur positif de la germination et négatif de la transition entre le stade végétatif et le stade reproductif (Lapik and Kaufman, 2003). Les quatre gènes font actuellement l'objet d'une caractérisation fonctionnelle dans l'équipe d'Hannele Tuominen. Au cours de ma thèse, j'ai testé la sensibilité de certaines lignées vis-à-



vis de *R. solanacearum*. Il s'agit des mutants simples *prn4* et *prn2*, ainsi que les doubles mutants *prn2 prn1* et *prn2 prn3* (Fig. 53). Dans le cas de *prn4*, trois mutants alléliques (*prn4-1*, *prn4-2* et *prn4-3*) ont été testés (Fig. 53-A). De façon intéressante, les mutants *prn4* développent des symptômes de flétrissement plus précocement (3dpi) que Col0 (4dpi), et la maladie progresse plus rapidement chez *prn4* qui atteint le stade DI=4 à 8dpi, alors que toutes les plantes sauvages ne sont pas encore totalement mortes à 10dpi (Fig. 53-A). L'augmentation de l'intensité des symptômes observés chez *prn4* est corrélée à une plus forte colonisation des mutants par *R. solanacearum* comparée aux plantes sauvages : à 3dpi, les différents mutants alléliques contiennent entre 5,5 et 5,8 Log ufc/gMF, soit 10 à 30 fois plus de bactéries que les plantes sauvages (4,4 Log ufc/gMF) (Fig. 53-B). L'ensemble de ces résultats caractérisent *prn4* comme un mutant hypersensible à *R. solanacearum*. Concernant *prn2*, les deux mutants alléliques étudiés (*prn2-1* et *prn2-2*) présentent une sensibilité comparable à celle des plantes sauvages, indiquant que la perte de fonction de *PRN2* ne modifie pas la réponse d'Arabidopsis à *R. solanacearum* (Fig.53-C). En parallèle, différentes combinaisons de doubles mutants *prn2 prn1* et *prn2 prn3* ont également été inoculés avec la bactérie (Fig.53-D). Là encore, toutes les lignées se comportent comme le témoin sauvage, indiquant que la perte simultanée de *PRN2* et *PRN1* ou *PRN3* n'a pas d'effet sur la réponse des plantes à *R. solanacearum* (Fig.53-D). L'ensemble de ces données révèlent que la réponse à la bactérie n'est pas modifiée systématiquement lorsque un gène *AtPirin* est muté, indiquant que tous ne jouent pas un rôle dans l'interaction entre la plante et cet agent pathogène ou que pour les autres, un phénomène de compensation peut exister. Pour approfondir cela, il sera important de poursuivre cette étude en testant la sensibilité des simples mutants *prn1*, *prn3* et d'autres combinaisons de doubles mutants.

Enfin, la caractérisation au niveau du développement, entreprise dans le Laboratoire d'Umea, permettra certainement de mieux comprendre le rôle des quatre gènes *AtPirin* et d'*AtMC9* dans le processus de mort cellulaire lors de différenciation des vaisseaux.

3. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, la dégradation de la paroi végétale chez Arabidopsis lors de l'infection par *R. solanacearum* a été abordée par deux approches complémentaires, la microscopie et la bioinformatique. Cela a par exemple permis de corrélérer l'absence de

dégradation du xylane et l'absence de xylanase prédite chez la bactérie. La dégradation des pectines est soumise à une régulation fine puisque seul le squelette est complètement dégradé, alors que les chaînes latérales composées d'arabinanes ne le sont que très partiellement, à cause du manque d'enzyme adaptée. En revanche, chez *Arabidopsis*, alors que nous avons vu que plusieurs mutants "paroi" voient leur comportement évoluer en réponse à *R. solanacearum* par rapport à un témoin sauvage, des mutants pour une pectine méthylestérase, une arabinofuranosidase (*araf1*) (Chavez Montes et al., 2008), ou une xylosyltransferase (*xxt1* *xxt2*) (Cavalier et al., 2008), ne présentent pas une sensibilité modifiée à la bactérie (Rivière et al, en préparation). Une analyse spatio-temporelle détaillée de la colonisation de chaque type cellulaire de la racine par la souche GMI1000 de la bactérie a fait l'objet d'une investigation poussée dans l'équipe (Digonnet et al, en préparation). Il serait intéressant de tester, chez *Arabidopsis*, l'infection avec différentes souches mutées pour des enzymes de dégradation de la paroi puisqu'à ce jour, la quasi-totalité des études ont été menées sur tomate. Le criblage d'une collection de mutants "paroi et mort cellulaire" a permis d'identifier un nombre important de lignées ayant une réponse modifiée à différents agents pathogènes. Chaque lignée constitue une piste nouvelle à explorer en la caractérisant plus en détail afin d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance ou de sensibilité impliquant la paroi végétale.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ma thèse, nous avons vu que la paroi végétale joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'interaction entre *Arabidopsis* et *R. solanacearum*. Notre démarche visant à exploiter une collection de mutants "paroi" pour identifier des individus affectés dans leur réponse aux agents pathogènes s'est avérée particulièrement fructueuse. En effet, sur environ 75 mutants testés, 28 présentent une sensibilité/résistance accrue à au moins un agent pathogène (*R. solanacearum*, *P. cucumerina*, *H. arabidopsidis*). Ce résultat est porteur de promesses pour une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant les interactions biotiques au niveau de la paroi. Jusqu'à présent, les mutants "paroi" identifiés dans un contexte phytopathologique l'ont été au prix de cribles à grande échelle, menés sans *a priori*. Par exemple, il aura fallu tester la sensibilité de 115 000 plantes pour isoler les mutants *irx5-5* et *irx1-6*, résistants à *R. solanacearum* et *P. cucumerina*, dans deux cribles indépendants (Hernandez-Blanco et al., 2007).

Dans l'équipe de Deborah Goffner, nos efforts se sont concentrés sur *wat1*, tant au niveau du développement (Denancé, Ranocha et al., 2010; Ranocha et al., 2010) que de la réponse aux agents pathogènes (ce manuscrit ; Denancé et al, en préparation). L'ensemble de ces données est à prendre en considération afin de mieux comprendre le rôle joué par WAT1.

Premièrement, alors que WAT1 appartient à une famille multigénique de 46 membres chez *Arabidopsis*, nos travaux sont les premiers à constituer une analyse fine d'un des membres. Ils ont notamment permis de définir WAT1 comme étant un transporteur d'auxine localisé sur le tonoplaste (Ranocha et al., 2010, Ranocha et al, en préparation). Le mutant *wat1* étant plus résistant à *R. solanacearum*, de nouvelles pistes de recherche s'ouvrent et soulèvent plusieurs questions : quelle est l'importance des 45 autres protéines de la famille dans la réponse à un stress biotique ? D'autres mutants ne transportant plus d'auxine sont-ils eux aussi plus résistants à *R. solanacearum* ? Le transport d'auxine est-il détourné au profit de la bactérie pour agir comme un facteur de sensibilité ? Pour y répondre, il sera important de tester la sensibilité d'autres mutants de la famille WAT1, ainsi que différents mutants altérés dans le transport d'auxine (*aux1* par exemple).

Deuxièmement, nous avons pu définir que *wat1* développe une immunité vasculaire. Dès lors, une question se pose : la sève du mutant constitue-t-elle un environnement hostile pour les agents pathogènes vasculaires ? Il sera important de préciser ce point en confirmant,

dans un premier temps, la réduction de la croissance de *R. solanacearum* en présence de sève *wat1*. A partir de là, il pourra être envisagé d'étudier au niveau biochimique la composition de la sève du mutant par rapport à celle de plantes sauvages.

Troisièmement, notre approche métabolomique ciblée a permis de déterminer que la mutation *wat1* provoque une perturbation du métabolisme de l'auxine, de l'acide salicylique et des glucosinolates indoliques. Nos résultats soulignent les connexions métaboliques intervenant dans les mécanismes de résistance. Cela illustre l'importance de combiner des approches puisque l'analyse du transcriptome n'aurait pas permis à elle seule d'identifier ces mécanismes. Récemment, Ward et ses collaborateurs ont déterminé la reprogrammation métabolique induite chez *Arabidopsis* en réponse à *Pst* et ont pu établir des différences entre la régulation au niveau transcriptomique et la perturbation de certaines voies métaboliques (Ward et al., 2010). C'est par exemple le cas des IGS : alors que les gènes de biosynthèse *CYP79B2* et *CYP79B3* sont induits lors de l'infection par *Pst*, la teneur en IGS est réduite au niveau métabolique (Ward et al., 2010). Ce résultat met en avant la finesse des régulations post-transcriptionnelles pouvant exister lors des interactions entre plantes et agents pathogènes et soulève quelques interrogations : comment les microbes ont-ils développés des stratégies pour exploiter la plante à leur avantage ? Les plantes sont-elles aussi capables de manipuler leur agresseur lors de l'établissement d'une résistance ?

Quatrièmement, notre approche stratégique visant à étudier séparément les feuilles et les racines lors des analyses transcriptomiques et métabolomiques s'est avéré être un choix payant puisque nous avons pu déterminer que les effets de la mutation *wat1* se font ressentir essentiellement au niveau des racines. Curieusement, l'étude, dans les racines, de mécanismes impliqués dans la résistance ou la sensibilité de mutants aux agents pathogènes sont rares. Récemment, une étude a montré que les racines développent des réponses spécifiques à différents PAMP (Millet et al., 2010). Par exemple, *flg22* induit une réponse de défense, caractérisée par un dépôt de callose, dans les couches épidermiques de la zone d'élongation de la pointe racinaire, alors que la chitine n'induit cette même réponse que dans les zones matures de la racine (Millet et al., 2010). Cela a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que les plantes ont développé des réponses immunitaires spécifiquement dans certains tissus selon la nature de l'agent pathogène qui les attaque (Millet et al., 2010). En retour, les agents pathogènes ont acquis le moyen de contourner ses réponses spécifiques. Dans les feuilles, la suppression du dépôt de callose induit par *flg22* nécessite l'injection d'effecteurs de *Pst* DC3000. Or, dans les racines, un mutant *Pst* DC3000 *hrcC*, incapable d'injecter les effecteurs, demeure capable de supprimer les défenses dans les racines (Millet et al., 2010).

Ce résultat met en avant l'existence de mécanismes différents contrôlant les interactions entre plantes et agents pathogènes dans les feuilles et les racines. Il s'agit d'un exemple qui accentue l'évidence que l'issue d'une interaction est déterminée par la capacité de la plante ou de l'agent pathogène à déjouer les stratégies de l'autre, dès la prise de contact entre les deux partenaires, que ce soit au niveau des feuilles ou du système racinaire.

Une lutte plus efficace contre ces envahisseurs nécessite une meilleure compréhension des premières étapes de l'interaction avec la plante hôte. L'étude immunocytologique est une approche particulièrement adaptée, via l'observation à l'échelle microscopique des modifications induites lors d'une infection. Une telle stratégie a, par exemple, été employée pour le pathosystème *Xanthosoma sagittifolium* - *Pythium myriotylum* (Boudjeko et al., 2006), où lors de l'infection par *R. solanacearum* de la tomate (Vasse et al., 1995), le pétunia (Zolobowska and Van Gijsegem, 2006), *M. truncatula* (Turner et al., 2009) et, au cours de ce projet, chez *Arabidopsis* (Digonnet et al, en préparation). Nous concernant, cette approche nous a permis de corréler les modifications pariétales induites ou non chez *Arabidopsis* en présence de la bactérie à l'arsenal enzymatique qu'elle possède.

Ensuite, il apparaît opportun de suivre la voie ouverte dans le cas d'interactions symbiotiques où les dialogues moléculaires existant entre la plante hôte et le champignon symbiotique ont été caractérisés avec l'identification des facteurs Nod et Myc, intervenant respectivement lors de la symbiose fixatrice d'azote et la mycorhization (Ardourel et al., 1994; Maillet et al., 2011). Un tel dialogue existe très probablement lors d'une attaque par un microorganisme hostile. Dans le cas de *R. solanacearum*, un bout de chemin a déjà été parcouru puisqu'il est connu depuis une dizaine d'années que la bactérie perçoit un signal émanant de la plante, un évènement indispensable requis pour la mise en place du pouvoir pathogène (Aldon et al., 2000). Découvrir la nature de ce signal constitue un vrai challenge et permettrait d'identifier, pour la première fois en phytopathologie, le facteur déclenchant l'établissement de l'infection d'une plante hôte par *R. solanacearum*. La paroi végétale, ou du moins, un composé pariétal, pourrait en être à l'origine (Aldon et al., 2000). Il est possible d'imaginer l'existence d'un système permettant à la bactérie d'utiliser la paroi, ou un produit de dégradation, comme élément déclencheur d'une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du pouvoir pathogène de la bactérie. Un tel système de perception et d'assimilation de composés végétaux existe chez *Xcc* : il s'agit des CUT loci (Carbohydrate utilization containing TBDT loci) (Blanvillain et al., 2007). Un tel système fait intervenir un transporteur de la membrane externe de la bactérie (TBDT), un transporteur de la membrane interne, un régulateur et des enzymes de dégradation. *R. solanacearum* pourrait-elle employer

un tel mécanisme ? Si l'on regarde la localisation de PrhA dans le génome de la bactérie, on s'aperçoit que ce TBDT (Rsp0878) est situé à proximité d'une enzyme de dégradation de la paroi végétale (PglA, RSp0880), d'une protéine transmembranaire (Rsp0881) et d'un régulateur (Rsp0887). Il serait intéressant de déterminer la fonctionnalité de ce système chez *R. solanacearum* afin d'évaluer le rôle de la paroi végétale dans l'établissement de l'interaction. Pour cela, il serait intéressant par exemple de déterminer si *PrhA* est induit en présence d'acide polygacturonique ; si PrhA est capable d'en transporter ; ou comment s'expriment les différents gènes du locus potentiel dans une souche mutée pour le régulateur.

A ce jour, *R. solanacearum* est responsable de pertes économiques très importantes sur de nombreuses plantes d'intérêt agronomique car il n'existe pas de moyen de lutte efficace, hormis l'utilisation de variété résistantes. Au cours de ma thèse, nous avons pu caractériser *watI* comme un mutant ayant une résistance basale fortement accrue vis-à-vis de la bactérie. Le gène *WATI* est présent dans le génome d'espèces cultivées (tomate, maïs...). L'intérêt d'*Arabidopsis* étant restreint au laboratoire, il serait judicieux d'étudier comment se comportent ces espèces, lorsque l'orthologue de *WATI* est désactivé, en réponse à l'infection par des agents pathogènes qui leur sont adaptés. Dans un contexte où l'augmentation de biomasse lignocellulosique devient un critère de plus en plus important pour répondre aux besoins grandissants en alimentation et en énergie, il sera primordial de pouvoir développer des variétés répondant à cet aspect, tout en veillant à ne pas provoquer la sensibilité à des agents pathogènes. Nos résultats, chez *Arabidopsis*, montrent que la biomasse et le rendement (production de graines) est réduit chez *watI* mais sa résistance est accrue envers différents agresseurs. Un des grands enjeux pour l'avenir est d'augmenter la production sans effet néfaste sur la capacité des plantes à mieux se protéger contre les agents pathogènes.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL & METHODES

1. Matériel biologique

1.1 Matériel végétal

L'écotype sauvage Columbia (Col0) d'*Arabidopsis* (*A. thaliana*) utilisé au cours de ce travail provient du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) et correspond à l'accession N1093. Les mutants *wat1-1* et *wat1-3* correspondent à deux lignées d'insertion ADN-T isolées à partir de la collection SALK et correspondent respectivement aux lignées N501389 et 799H03.

Pour le semis, les graines, stockées à 4°C pour lever la dormance, subissent une stérilisation de surface pendant 20 minutes dans un mélange 5% (m/v) hypochlorite et 0,02% (v/v) Tween20, puis elle sont rincées 3 fois dans de l'eau ultra-pure, sous atmosphère stérile. Les graines sont semées sur milieu Murashige and Skoog (MS) supplémenté en vitamines (Sigma M3900 au 1/1000^{ème}) (Murashige and Skoog, 1962), puis placées en chambre de culture (jour : 16h à 22°C ; nuit : 8h à 20°C ; humidité relative : 40%). Les jeunes plantules sont repiquées 7 jours plus tard sur des pots de tourbe (Jiffy France, Lyon) et placées en chambre de culture (jour : 9h à 22°C ; nuit : 15h à 22°C ; humidité relative : 50%) pendant trois semaines. Sauf indication spécifique, les plantes sont étudiées à l'âge de 4 semaines.

Lorsque des transformations ont été réalisées afin d'introduire une construction dans un génotype, les plantes Col0 ou *wat1-1* ont été transformées par immersion florale selon le protocole décrit (Clough and Bent, 1998). Les individus issus des transformations ont été sélectionnés *in vitro* pour leur résistance à l'hygromycine (15µg/ml) ajoutée au milieu MS. L'analyse de la ségrégation sur plusieurs générations successives a permis d'obtenir des lignées homozygotes, 100% résistantes à l'antibiotique.

1.2 Souches bactériennes et fongiques

La souche GMI1000 de *R. solanacearum* est cultivée à 28°C dans du milieu BG (Plener et al., 2010). La souche 8004DXopAC de *Xcc* est cultivée à 30°C dans du milieu Moka

(Blanvillain et al., 2007). La souche DC3000 de *Pst* est cultivée à 28°C dans du milieu complet King B (King et al., 1954). La rifampicine (50 µg/ml final) est l'antibiotique utilisé pour la sélection de *Xcc* 8004DXopAC et *Pst* DC3000. Les isolats PcBMM de *P. cucumerina*, B0510 de *B. cinerea*, JR2 de *V. dahliae* et 5431 de *V. albo-atrum* sont cultivés à 28°C sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Hernandez-Blanco et al., 2007; Yadeta et al., 2011). L'isolat IMI 349061 de *C. higginsianum* est cultivé à 17°C sur milieu Mathur (O'Connell et al., 2004).

2. Analyses biologiques

2.1 Inoculations et détermination de la croissance des agents pathogènes *in planta*

Infection racinaire avec *R. solanacearum*

L'inoculation est réalisée par immersion du système racinaire dans une culture bactérienne à une DO=0,05 (5.10^7 bactéries/ml). Pour les premières expériences, une blessure artificielle des racines a été réalisée avant infection, en coupant la base des Jiffy, selon le protocole décrit initialement (Deslandes et al., 1998). Par la suite, cette étape a été supprimée. Après inoculation, les plantes sont placées dans une salle culture aux conditions suivantes : photopériode de 12h à une température de 28°C (jour et nuit) et 80% d'humidité relative. Suite à l'infection, un suivi journalier de l'apparition des symptômes de flétrissement et du développement de la maladie est assuré de façon quantitative en attribuant une note fixée par un index de maladie. Cette échelle, comprise entre 0 (absence de symptômes) et 4 (mort de la plante) permet de mesurer le niveau de sensibilité des plantes vis-à-vis de la bactérie. Les notes intermédiaires 1, 2 et 3 sont attribuées respectivement lorsque 25, 50 et 75% des feuilles d'une rosette sont flétries (Deslandes et al., 1998). Pour chaque expérience, entre 40 et 50 plantes par géotypes ont été inoculées et au moins deux expériences indépendantes ont été menées.

La croissance bactérienne *in planta* a été mesurée en suivant les étapes décrites (Deslandes et al., 1998) : les parties aériennes issues de 3 lots de 3 plantes sont collectées et stérilisées en surface avec de l'éthanol 70° avant d'être broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Des dilutions successives de l'extrait brut sont étalées sur du milieu BG contenant de la

rifampicine (50µg/ml) et les colonies sont dénombrées 48h après incubation à 28°C. Chaque dépôt est réalisé en 2 répliques.

Dans le cas des infections *in vitro*, des plantules âgées de 7 jours sont repiquées sur du milieu de Peters (2,5g/L Peters medium ; 10g/L bacto agar) et les boîtes de culture sont placées verticalement dans les conditions suivantes : photopériode de 12h à une température de 28°C (jour et nuit) et 80% d'humidité relative. Puis, trois jours après, l'inoculation est réalisée stérilement par dépôt de quelques microlitres de suspension bactérienne (5.10^7 ufc/ml), ou d'eau pour les plantules témoins, sur le système racinaire. Les boîtes sont à nouveau placées en chambre de culture durant la cinétique.

Infection foliaire par piercing avec *X. campestris* pv. *campestris* et *R. solanacearum*

L'inoculation des feuilles par piercing de la nervure centrale avec *Xcc* et *R. solanacearum* a été réalisée selon le protocole décrit (Xu et al., 2008). Elle consiste à mettre l'aiguille en contact avec une solution bactérienne à une DO=0,1 (1.10^8 bactéries/ml) avant de percer trois trous dans la veine principale en marge des feuilles, à raison de 4 feuilles infectées par plantes. Après inoculation, les plantes sont placées dans une salle culture aux conditions suivantes : photopériode de photopériode de 9h à une température de 22°C (jour et nuit) et 70% d'humidité relative.

Le dénombrement de *Xcc* a été effectué selon le protocole décrit (Xu et al., 2008). Pour cela, 5 disques foliaires sont prélevés sur 5 plantes (1 feuille par plante) à l'aide d'un emporte pièce juste au-dessus du pétiole des feuilles infectées. Ces disques sont groupés, broyés 2 fois 30 secondes à l'aide du broyeur MasterMill MM300 (Retsch) et 500µl d'eau sont ensuite ajoutés au broyat. Des dilutions successives sont ensuite étalées sur milieu Moka et les bactéries sont comptées après 48h d'incubation à 28°C. Chaque dépôt est réalisé en 2 répliques.

Infection foliaire par infiltration avec *P. syringae* pv. *tomato*, *X. campestris* pv. *campestris* et *R. solanacearum*

L'inoculation des feuilles par infiltration avec *Pst*, *Xcc* et *R. solanacearum* a été réalisée selon le protocole décrit (Katagiri et al., 2002). Une demi-feuille est infiltrée à l'aide d'une seringue sans aiguille, avec une solution bactérienne à une DO=0,0005 (5.10^5 bactéries/ml), à raison de 4 feuilles infectées par plantes. Après inoculation, les plantes sont

placées dans une salle culture aux conditions suivantes : photopériode de 9h à une température de 22°C (jour et nuit) et 70% d'humidité relative.

Le dénombrement de *Pst* a été effectué selon le protocole décrit (Bouchez et al., 2007). Il s'agit du même protocole que pour *Xcc*, à deux modifications près : les disques foliaires sont prélevés dans la zone infiltrée et les dilutions successives sont étalées sur milieu King B.

Infection foliaire avec *P. cucumerina*

Les inoculations avec *P. cucumerina* ont été réalisées par pulvérisation de spores (4.10^6 sp/ml) sur des plantes âgées de 3 semaines, selon le protocole décrit (Llorente et al., 2005). Au moins 15 plantes par génotype ont été inoculées pour chaque expérience. Après infection, les plantes sont placées dans une salle de culture dans les conditions suivantes : photopériode de 10h à 24°C le jour et 22°C la nuit.

La biomasse fongique a été déterminée par qRT-PCR en mesurant l'expression du gène β -*TUBULIN* du champignon dans les plantes inoculées, selon le protocole décrit précédemment (Hernandez-Blanco et al., 2007). L'expression du gène At5g25760 (UBIQUITIN 21) d'*Arabidopsis* a été utilisée pour normaliser le niveau de transcrite dans chaque échantillon. La biomasse fongique mesurée chez le sauvage est fixée à la valeur arbitraire de 1 et celle des mutants *wat1* est exprimée de façon relative à celle mesurée dans les plantes sauvages. Les amorces utilisées sont : 5'-CAAGTATGTTCCCCGAGCCGT-3' et 5'-GAAGAGCTGACCGAAGGGACC-3', pour la β -*TUBULIN* ; 5'-AAAGGACCTTCGGA GACTCCTTACG-3' et 5'-GGTCAAGAATCGAACTTGAGGAGGTT-3', pour l'ubiquitin 21 d'*Arabidopsis*.

Infection racinaire avec *Verticillium*

L'inoculation avec *V. dahliae* et *V. albo-atrum* a été réalisée par immersion du système racinaire de plantes âgées de 2 semaines dans un inoculum contenant 1.10^6 conidies/ml, selon le protocole décrit (Yadeta et al., 2011). Au moins 10 plantes par génotype ont été infectées pour chaque expérience. Une fois inoculées, les plantes sont placées dans les conditions de culture suivantes : photopériode de 16h à 21°C le jour et 19°C la nuit.

La biomasse fongique a été déterminée par qRT-PCR en mesurant l'expression du gène *ITS1* (*Internal Transcribed Spacer*) de *Verticillium* dans les plantes inoculées, selon le protocole décrit (Ellendorff et al., 2009). L'expression du gène ATCG00490 (sous-unité large de la Rubisco) d'*Arabidopsis* a été utilisée pour normaliser le niveau de transcrite dans chaque

échantillon (Yadeta et al., 2011). La biomasse fongique mesurée chez le sauvage est fixée à la valeur arbitraire de 1 et celle des mutants *wat1* est exprimée de façon relative à celle mesurée dans les plantes sauvages. Les amorces utilisées sont : 5'-AAAGTTTTAATGGTTCGCTAAGA-3' et 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' pour *ITS1* de *Verticillium* ; 5'-GCAAGTGTTGGGTTCAAAGCTGG-3' et 5'-AACGGGCTCGATGTGGTAGC-3' pour la Rubisco d'Arabidopsis.

Infection foliaire avec *C. higginsianum*

L'inoculation avec *C. higginsianum* a été réalisée par pulvérisation d'une solution de spores fongiques (1.10^6 spores/ml) sur des plantules âgées de 2 semaines, selon le protocole décrit (O'Connell et al., 2004). Une fois inoculées, les plantes sont placées dans les conditions de culture suivantes : photopériode de 16h à 25°C le jour et la nuit.

Infection foliaire avec *B. cinerea*

L'inoculation a été réalisée en déposant un échantillon de mycélium du champignon sur une surface de 3mm sur la face ventrale de feuilles détachées d'Arabidopsis (24 feuilles par génotype), selon le protocole décrit (Valette-Collet et al., 2003). Suite à l'infection, les feuilles ont été placées sur du papier filtre imbibé d'eau dans des boîtes de Pétri afin de maintenir un taux élevé d'humidité. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 21°C à la lumière du jour. Le diamètre des nécroses a été mesuré au bout de 20h.

2.2 Mesure de la croissance bactérienne *in vitro*

Pour la mesure de la multiplication de *R. solanacearum* en présence de tryptophane, auxine et acide salicylique, la croissance bactérienne a été déterminée par lecture de la densité optique à 600nm (DO_{600}) en utilisant le lecteur à plaque FluoStar Omega (BMG Labtech, Allemagne ; <http://www.bmglabtech.com>). Pour la préparation de l'inoculum, 4 cultures de 5ml sont réalisées sur la nuit sous agitation dans du milieu BG à 28°C. Les cultures sont ensuite centrifugées 5 minutes à 6000rpm et le culot est repris dans 5ml de milieu BG. La DO_{600} est ensuite ajustée à 0,2 pour chacun des 4 inoculum. En parallèle, des solutions de milieu BG contenant le composé à tester à une teneur égale à 2X sont préparées. Ensuite, 8 répétitions de 100µl de ces solutions sont déposées sur une ligne d'une plaque 96 puits. Puis, 100µl de chaque inoculum sont ajoutés dans 4 puits, et 100µl de milieu BG sans bactéries

sont ajoutés dans les 4 autres puits. De cette manière, chaque ligne de la plaque contient 4 puits contenant du milieu BG avec le composé à la concentration 1X souhaitée et des bactéries à la concentration de 1.10^8 ucf/ml ; ainsi que 4 puits témoins sans bactéries.

Pour la mesure de la croissance bactérienne dans la sève, 2,5µl d'inoculum à $DO_{600}=0,4$ (4.10^8 ucf/ml) sont ajoutés à 97,5µl de sève, afin d'obtenir 100µl de réaction à 1.10^7 ucf/ml.

2.3 Détermination de la teneur en acide salicylique *in planta* par HPLC-Fluorescence

Pour l'extraction, 250mg de feuilles sont broyées dans de l'azote liquide, à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat est ensuite repris dans 400µl de méthanol à 90%, puis 50µl d'étalon interne, l'acide ortho-anisique (oANI) à 1ng/µl dans du méthanol à 70%, sont ajoutés. Après centrifugation (10 000g à température ambiante pendant 20 min), le surnageant est placé dans un nouveau tube et le culot est extrait une seconde fois dans 400µl de méthanol 100%. Après centrifugation (10 000g à température ambiante), le second surnageant est mélangé au premier et l'ensemble est évaporé au speedvac pendant 4h. Ensuite, 300µl d'eau ultrapure MilliQ à 80°C sont ajoutés, ainsi que 20µl d'acide trichloro acétique à 5%. Le pH est ajusté à 2 avec du HCl 2M. Les tubes sont ensuite laissés 1h à 80°C. Après refroidissement, la phase aqueuse est soumise à une extraction par 2 volumes d'éther. Après centrifugation (3000g à température ambiante pendant 10 min), la phase étherée est placée dans un nouveau tube et la phase aqueuse est extraite une seconde fois dans les mêmes conditions. Après centrifugation, la seconde phase étherée est mélangée à la première et l'ensemble est évaporé 15min au speedvac. Si les échantillons ne sont pas traités aussitôt, les tubes sont placés à 4°C ou -20°C si le temps d'attente avant l'analyse dépasse 24h.

Pour le dosage, les échantillons sont repris dans 125µl d'acétonitrile, 125µl de tampon phosphate (KH_2PO_4 à 100mM) et 250µl d'eau ultrapure MilliQ. Puis, les échantillons sont filtrés sur une colonne de nylon 0,2 µm par centrifugation 2min à 7000 rpm. Le dosage est réalisé grâce à un système HPLC (Dionex) équipé d'un spectrofluorimètre (Jasco). La séparation est réalisée sur la colonne HPLC LC-ABZ (25cm x 4,6mm x 5µm, Supelco SA, France), selon le protocole décrit (Tronchet et al., 2010). L'élution commence avec 15% d'acétonitrile dans un tampon phosphate de potassium (KH_2PO_4) 25mM, pH 2,6, puis la concentration en acétonitrile est augmentée en 18 min jusqu'à 55%. La colonne est ensuite lavée durant 5min dans un mélange à 80% d'acétonitrile dans l'eau. Les conditions de

détection par fluorescence sont $\lambda_{em}=407$ nm et $\lambda_{ex}=305$ nm pour l'acide salicylique, $\lambda_{em}=365$ nm et $\lambda_{ex}=305$ nm pour l'acide ortho-anisique. Une gamme d'étalonnage est réalisée afin de quantifier l'acide salicylique et l'acide ortho-anisique dans les extraits végétaux. Le matériel végétal analysé provient de trois répliques biologiques et deux séries de mesures (répliques techniques) ont été réalisées pour chaque échantillon.

2.4 Analyses métabolomiques

Les échantillons ont été constitués en regroupant les feuilles ou les racines prélevées sur 10 plantes âgées de 4 semaines et infectées ou non avec *R. solanacearum*, et ce, dans trois répliques biologiques indépendantes. Dès la récolte, les échantillons ont été placés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C .

Analyse globale du métabolisme primaire. Les analyses ont été réalisées selon le protocole décrit (Fiehn et al., 2006). Toutes les étapes d'extraction ont été effectuées dans des tubes Eppendorf Safelock. Après broyage dans l'azote liquide, la poudre est remise en suspension dans 1ml de solution composée d'eau, de chloroforme et de méthanol (ratio : 1:1:2,5) à -20°C . Les échantillons sont ensuite extraits pendant 10 minutes à 4°C sous agitation à 14000rpm. Le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation (5min à 20000g) et 900 μl de surnageant ont été mélangés à 20 μl d'une solution de ribitol (étalon interne) à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du méthanol. Puis, 50 μl ont été collectés, séchés pendant 2h30 au Speedvac et stockés à -80°C ou utilisés rapidement. Pour la dérivation, 10 μl d'une solution de métoxyamine à 20mg/ml dans de la pyridine ont été ajoutés aux échantillons, aux témoins et aux standards et l'ensemble a été placé à 28°C sous agitation pendant 1h30. Ensuite, 90 μl de N-méthyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) ont été ajoutés et la réaction a été poursuivie pendant 30 min à 37°C . Après refroidissement, 50 μl ont été transférés dans un flacon Agilent. Au bout de 2h30, 1 μl d'échantillon a été injecté pour l'analyse en GC-MS, en utilisant un chromatographe à phase gazeuse Agilent 7890A couplé à un spectromètre de masse Agilent 5975C, équipé d'une colonne de type Restek Rxi-5SilMS. Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel AMDIS (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). L'identification des métabolites est établie à partir de différentes bases de données disponibles. Les aires de pics ont été déterminées en utilisant le logiciel Quanlynx (Waters).

Analyse ciblée des glucosinolates indoliques et de l'acide raphanusamique. Les échantillons sont broyés à l'azote liquide, puis lyophilisés. Ils sont ensuite soumis à une extraction par 3 mL de méthanol/eau 75:25 dans un broyeur de Potter-Elvehjem (VWR, France), après addition de la sinigrine comme étalon interne. L'extrait est récupéré après centrifugation, et le culot est réextrait par 2 mL du solvant d'extraction, 15 min aux ultrasons. La réunion des deux extraits successifs est mise à évaporer sous vide (Speedvac) sur la nuit. Les extraits secs sont repris par 150 µL d'acétonitrile/eau, et injectés pour analyse en LC-MS, mode électrospray négatif. La LC-MS s'effectue sur un instrument Quattro LC doté d'une interface électrospray (Micromass, Manchester, GB), du logiciel MassLynx, d'une chaîne HPLC Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA). Les composés sont séparés sur une colonne Uptisphere C18 (Interchrom, Montluçon, France) de longueur 150 mm, de diamètre interne 2 mm, et de diamètre de particule 5 µm, à l'aide d'une phase mobile comprenant le solvant A, acétonitrile/eau (95:5, v/v, 0.5% acide acétique), et le solvant B, acétonitrile/eau (5:95, v/v, 0.5% acide acétique). Le profil de l'élution graduée est le suivant, à un débit de 0,2 mL/min : 10% de A pendant 5 min; gradient linéaire jusque 70% sur 35 min; rinçage à 100% de A en 15 min, et remise à l'équilibre à 10% de A pendant 20 min. Les potentiels de source sont fixés à 15 V pour le cône, 3 kV pour le capillaire et 2 V pour l'extracteur. Le bloc source et le gaz de désolvatation sont chauffés respectivement à 120 et 350°C. L'azote est utilisé comme gaz de désolvatation et de nébulisation. L'argon sert de gaz de collision (3.5×10^{-3} mbar) dans le cas du dosage de l'acide raphanusamique. Les glucosinolates sont analysés en mode négatif, balayage complet. L'identité des glucosinolates est postulée d'après leur profil isotopique en spectrométrie de masse (spécifique des composés à plusieurs atomes de soufre), leur masse et leur temps de rétention, comparé aux analyses de nos expériences passées. La quantité estimée d'un glucosinolate dans un extrait est estimée par l'aire du pic chromatographique LC-MS rapportée à l'aire du pic de l'étalon interne sinigrine, en faisant l'hypothèse que les composés ont des facteurs de réponse proches. L'acide raphanusamique est analysé en mode positif, en spectrométrie de masse en tandem, mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) sur la transition m/z 164 \rightarrow m/z 118 (énergie de collision 15 eV) avec confirmation par la transition m/z 164 \rightarrow 59 (énergie de collision 30 eV). Il est dosé par étalonnage externe, au moyen d'une gamme étalon.

2.5 Récolte de sève

La sève du xylème a été collectée à partir de plantes sauvages Col0 et *wat1-1* d'*Arabidopsis* en adaptant le protocole décrit pour le chou Bartolo (Ligat et al., 2011). La récolte de sève a été réalisée sur des plantes âgées de 4 semaines ayant été cultivées dans les conditions suivantes : photopériode de 9h à 22°C le jour et 20°C la nuit, à 70% d'humidité relative. Les plantes ont été placées dans des mini-serres, sous humidité saturante, 12h avant le début de la récolte. La sève a été obtenue à partir de 50 plantes par géotypes. Pour cela, 3 feuilles par plantes ont été sectionnées à l'aide d'une lame de rasoir environ 1 cm au-dessus du pétiole. L'extrémité coupée a été lavée avec de l'eau pour éliminer les débris cellulaires, puis soigneusement séchée avec une serviette en papier. La sève du xylème qui s'écoule au niveau de la section des feuilles encore attachée à la plante a été récoltée à l'aide d'une micropipette. Ensuite, la sève a été filtrée avec un filtre Milipore 0,45µm (Carrigtwohill, Ireland) et stockée à -20°C.

3. Techniques de biologie moléculaire

3.1 Extractions d'ADN, d'ARN et transcription inverse

Les extractions d'ADN et d'ARN totaux ont été effectuées selon les protocoles décrits respectivement dans les kits DNeasy Plant Mini Kit et RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, <http://www.qiagen.com>). La transcription inverse des ARN en ADNc a été réalisée à partir d'1µg d'ARN totaux en suivant les recommandations du kit Superscript III (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>).

3.2 Analyse de transcrit par RT-PCR

La présence de transcrit correspondant au gène *WAT1* a été déterminée en utilisant les amorces 5'-CCTTATGGGGAGTTCCGGAG-3' et 5'-ATCAAGACCGCTCCAATAATC-3', permettant l'amplification d'un fragment d'ADNc de 961pb. Le gène *ACT2* a été utilisé comme contrôle avec les amorces 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGG-3' et 5'-CTCGGCCT

Tableau XIV. Liste des amorces utilisées pour l'analyse des gènes par qRT-PCR

Gène	Amorces sens	Amorces antisens
<i>WAT1</i>	5'-CGGTAAGAGCGAAGAGAGGA-3'	5'-GCACGTTCAATACCATGCTC-3'
<i>PR-1</i>	5'-CGAAAGCTCAAGATAGCCCACA-3'	5'-TTCTGCGTAGCTCCGAGCATAG-3'
<i>PR-4</i>	5'-AGCTTCTTGCGGCAAGTGT-3'	5'-TGCTACATCCAAATCCAAGCCT-3'
<i>PR-5</i>	5'-GACTGTGGCGGTCTAAGATGT-3'	5'-TGAATTCAGCCAGAGTGACG-3'
<i>PDF1.2</i>	5'-TTCTCTTTGCTGCTTTTCGACG-3'	5'-GCATGCATTACTGTTTCCGCA-3'
<i>At3g18780</i>	5'-ATGGAAGCTGCTGGAATCCAC-3'	5'-TTGCTCATACGGTCAGCGAT-3'
<i>At5g09810</i>	5'-GTGGTCGTACAACCGGTATT-3'	5'-AAGGATAGCATGAGGAAGAGCA-3'
<i>At1g13320</i>	5'-GACCGGAGCCAACCTAGGAC-3'	5'-AAAACCTGGTAACCTTTCCAGCA-3'

TGGAGATCCACA-3', amplifiant un fragment d'ADNc de 228pb. Les couples d'amorces ont été choisis de telle sorte qu'ils permettent de discriminer d'éventuelles contaminations avec de l'ADN génomique (1601pb pour *WAT1* et 287pb pour *ACT2*) (Ranocha et al., 2010).

3.3 Analyse de transcrit par qRT-PCR

L'analyse par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) a été réalisée avec l'appareil Light Cycler (Roche applied Science, <http://www.roche-applied-science.com>) et le kit Light Cycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I (Roche applied Science) à partir d'1 µl d'ADNc dilués dix fois. Les échantillons sont constitués d'ADNc de feuilles ou de racines prélevées sur 10 plantes (Col0 ou *wat1-1*) infectées ou non avec *R. solanacearum*. Pour chaque PCR, 4 échantillons de gamme sont ajoutés et correspondent à des dilutions successives d'un mélange d'ADNc provenant des différents échantillons de l'expérience. Les conditions de PCR sont les suivantes : 1 cycle de 9 min à 98°C suivi de 45 cycles de 5 secondes à 95°C, 10 secondes à 65°C et 20 secondes à 72°C. Les couples d'amorces utilisés pour les analyses de qRT-PCR sont répertoriés dans le tableau XIV. La spécificité des amplifications a été systématiquement vérifiée par l'analyse des courbes de fusion obtenues à la fin de chaque série de qRT-PCR. L'expression relative de chaque gène candidat a été calculée selon le modèle de calcul d'efficacité corrigée (Ramakers et al., 2003; Pfaffl, 2004) et les données ont été normalisées avec la moyenne géométrique de trois gènes de références (Vandesompele et al., 2002). Les gènes de références (At1g13320, At3g18780 et At5g09810) ont été choisis parce que leur expression ne varie pas lors de l'interaction avec *R. solanacearum* (Hu et al., 2008).

3.4 Analyse transcriptomique

Les analyses ont été réalisées avec la puce CATMA contenant 22 089 gènes d'Arabidopsis, à l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, Evry, France) (Crowe et al., 2003; Hilson et al., 2004). Deux comparaisons biologiques indépendantes ont été effectuées. Pour chaque réplique biologique, les échantillons ont été obtenus en groupant les ARN issus de feuilles ou racines de 10 plantes (Col0 ou *wat1-1*) infectées ou non avec *R.*

solanacearum. Les feuilles de rosettes et les racines ont été récoltées sur des plantes âgées de 4 semaines cultivées en jour court. La qualité des ARN a été vérifiée avec une puce Agilent, puis la synthèse d'ADNc, l'hybridation et l'analyse des puces CATMA ont été réalisées selon le protocole décrit (Lurin et al., 2004). L'analyse statistique des résultats et l'identification des gènes différentiellement exprimés ont été menées selon la procédure décrite (Gagnot et al., 2008). Les données de microarray ont été déposées dans la base CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: CNRS09-05-wat1-ralstonia2), selon les consignes du "Minimum Information About a Microarray Experiment".

3.5 Clonage

Construction *ProWAT1:GUS*

Les amorces 5'-AAAAAGCAGGCTTCTCTACCATACACATCATCGCGTA-3' et 5'-AGAAAGCTGGGTCTGGATCGAGCTTAACAATCGATCA-3' ont été utilisées pour amplifier un fragment de 2980pb immédiatement en amont du codon ATG du gène *WAT1*, à partir du clone BAC F10A5 (Arabidopsis Biological Resource Center). Les séquences soulignées correspondent aux sites de recombinaison Gateway (Invitrogen). Le fragment obtenu a ensuite été amplifié avec un couple d'amorces contenant les séquences de recombinaison Gateway 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' et 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'. Le produit PCR final a ensuite été cloné dans le vecteur pDONR207 (Invitrogen), puis transféré dans le vecteur binaire pMDC162 (Curtis and Grossniklaus, 2003). La construction *ProWAT1:GUS* a été introduite dans la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Constructions *ProWAT1:WAT1* et *ProPRX66:WAT1*

La séquence promotrice de *WAT1* (2980pb) a été amplifiée à partir du produit PCR cloné dans le vecteur pDONR207 décrit dans le paragraphe précédent, avec les amorces 5'-TTGGTACCTCTACCATACACATCATCGC-3' et 5'-CATGAATTCTGGATCGAGCTTAACAATC-3'. La séquence promotrice de *PRX66* a été amplifiée à partir d'ADN génomique extrait chez Arabidopsis, avec les amorces 5'-CCGGTACCTATTAGTGAAATAATCAAGTTC-3' et 5'-CCGAATTCTTTATGGTAATGTGTTTTGGG-3', permettant d'obtenir un fragment de 1345pb immédiatement en amont du codon ATG du gène *PRX66*. Après ces

Tableau XV. Liste des amorces utilisées pour détecter les mutations lors de la génération de doubles/triples mutants et l'introduction de transgènes chez *wat1-1*

Mutation/construction	Amorces sens	Amorces antisens	Référence
<i>wat1-1</i>	5'-CAACACACACAAACACACAC-3'	5'-CATTGTCCGTTGACTGATGG-3'	Ranocha et al, 2010
<i>jar1-1</i>	5'-CAATGGAAACGCTACTGACCCTGA-3'	5'-ATAAACTTTGGACGGCTTTGACTAGTTCTA-3'	Laurie-Berry et al, 2006
<i>Pro35S:AFB1</i>	5'-AAGAAGACGTTCCAACCAC-3'	5'-CAATGACTTCGACATTGAGCCTTGGCA-3'	Navarro et al, 2006
<i>NahG</i>	5'-ATGAAAAACAATAAACTTGGCTTG-3'	5'-CTGACCTTCCAGCACATGACTAC-3'	Voronese et al, 2006
<i>ein2-1</i>	5'-GCTGGTGGTTTGAGATGGAA-3'	5'-TTTACATCAGAGTCTTCCTTCAGACT-3'	Roman et al, 1995
<i>cyp79b2</i>	5'-TGGACAAGTATCATGACCCAATCATCCACG-3'	5'-GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG-3'	Zhao et al, 2002
<i>cyp79b3</i>	5'-TGTTCTATGCATGGACTGGTGGTCAACATG-3'	5'-GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG-3'	Zhao et al, 2002

étapes d'amplification, les séquences *ProWAT1* et *ProPRX66* se trouvent entourées par les sites de restriction des enzymes KpnI (immédiatement en amont du promoteur) et EcoRI (immédiatement en amont de l'ATG), dont les séquences sont soulignées dans les amorces utilisées.

La séquence codante de *WAT1* (1180pb, entre l'ATG et le codon STOP inclus) a été amplifiée à partir d'une préparation du vecteur pGEM-T contenant la séquence codante *WAT1* avec les amorces 5'-CCAGAATTCATGGCGGATAACACCGATA-3' et 5'-GGGAGCTCTCAAACATTGTCCGTTGACT-3'. Après cette étape, la séquence *WAT1* est située entre les sites de restriction d'EcoRI (immédiatement en amont de l'ATG) et SacI (immédiatement en aval du STOP), dont les séquences sont soulignées dans les amorces utilisées.

Les fragments purifiés (*ProWAT1*, *ProPRX66* et *WAT1*) ont ensuite été introduits individuellement dans le vecteur pGEM-Teasy (Promega) puis vérifiés par digestion enzymatique et séquençage. L'étape suivante a consisté à introduire *ProWAT1* et *WAT1* ou *ProPRX66* et *WAT1* dans le vecteur pGreenII 0179 (Hellens et al., 2000) en suivant les recommandations du kit T4 DNA Ligase (Invitrogen). Les constructions *ProWAT1:WAT1* et *ProPRX66:WAT1* ainsi générées ont été introduites dans la souche GV3101 ou C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens*, en même temps que le plasmide Psoup qui permet la réplication du plasmide pGreenII 0179 (Hellens et al., 2000).

4. Génération de doubles/triples mutants

Le mutant *wat1-1* a été croisé avec des mutants ou lignées transgéniques affectées dans différentes voies métaboliques et hormonales. Dans le cas où les différentes mutations sont détectées par PCR, les couples d'amorces utilisés pour chaque gène sont indiqués dans le tableau XV. La mutation *wat1-1* est détectée par PCR (Tab. XV).

Acide jasmonique. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec *jar1-1* (Staswick et al., 1992). La détection de la mutation *jar1-1* est réalisée par PCR (Tab. XV), suivie d'une digestion du fragment amplifié (250pb) avec l'enzyme XbaI (Laurie-Berry et al., 2006). Une lignée homozygote a été identifiée : *wat1-1 jar1-1* [2.2].

Acide salicylique. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec une lignée Col0 portant le transgène *NahG* (Lawton et al., 1995). La détection du transgène est réalisée par PCR (Tab. XV) (Veronese et al., 2006). Une lignée homozygote a été identifiée : *NahG wat1-1* [3.4].

Auxine. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec le mutant *tir1-1* portant le transgène *Pro35S:AFB1* (Navarro et al., 2006). La détection du transgène est obtenue par PCR (Tab. XV). La mutation *tir1-1* est mise en évidence en sélectionnant les plantules ayant une élévation racinaire plus importante que le sauvage en présence de 0,2µM d'auxine (Ruegger et al., 1998). Une lignée homozygote a été identifiée : *wat1-1 35S:AFB1* [1.18.16].

Ethylène. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec *ein2-1* (Roman et al., 1995). La détection de la mutation *ein2-1* se fait par PCR (Tab. XV), suivie d'une digestion enzymatique avec AflII. Une lignée homozygote pour les deux mutations a ainsi été identifiée : *ein2-1 wat1-1* [3.17.28.6].

Glucosinolates. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec le double mutant *cyp79b2 cyp79b3* (Zhao et al., 2002). La détection des mutations *cyp79b2* et *cyp79b3* se fait par PCR (Tab. XV). Le croisement a abouti à l'identification de 4 lignées homozygotes pour les trois mutations : *cyp79b2 cyp79b3 wat1-1* [2.8.2], [2.8.3], [2.8.6] et [3.3.2].

Tryptophane. Le mutant *wat1-1* a été croisé avec *trp5* (Li and Last, 1996). Les plantes sont sélectionnées sur du milieu MS contenant du saccharose (0.5%), 300µM de 6-Méthylanthranilate et 25µM de L-Trp en lumière continue à 22°C. Les individus résistants sont ensuite transférés sur du milieu MS contenant 50µM de Trp pendant une semaine puis repiqués en Jiffy (Li and Last, 1996). Ce croisement a permis d'identifier deux lignées homozygotes pour les deux mutations : *wat1-1 trp5* [9.3] et [9.16].

5. Microscopie

5.1 Coloration GUS et observations

Afin d'étudier l'expression de *WATI* en réponse à *R. solanacearum*, dans les lignées Col0-*ProWATI:GUS*, les expériences de coloration et d'observation de l'activité GUS ont été menées selon le protocole décrit (Jefferson et al., 1987). Brièvement, les plantules ont été prélevées à différents temps après inoculation *in vitro*, placées dans 2ml de tampon GUS, infiltrées sous vide pendant 5 minutes, puis incubées dans le tampon à 12°C pendant une nuit. La composition du tampon GUS est la suivante (pour 50ml): 2ml de Triton 2,5%; 1ml de Ferrocyanure de K à 5mM ; 1ml de Ferricyanure de K à 5mM ; 12,5ml de PBS pH7 à 0,2M ; 0,625ml de X-Gluc à 40mM ; 32,875ml d'eau. La fixation est réalisée en remplaçant le tampon GUS par une solution composée d'éthanol/formaldéhyde/acide acétique (63%/2%/5%) pendant 3 jours. Enfin, le tampon de fixation est remplacé par de l'éthanol 70° pour décolorer les tissus. L'activité GUS a été visualisée à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'une caméra pour prendre les photographies.

5.2 Immunocytologie et observations confocales

Suite à l'inoculation *in vitro* de plantules Col0 d'*Arabidopsis* avec la souche GMI1000 de *R. solanacearum*, des échantillons ont été constitués à différents temps de la cinétique d'infection. Pour cela, l'extrémité apicale des racines a été prélevée et fixée à 5°C pendant une nuit dans un tampon composé de 50mM cacodylate (pH 7.2) et 2,5% (v/v) de glutaraldéhyde. Les échantillons ont ensuite été rincés trois fois dans le tampon puis déhydratés progressivement dans de l'éthanol à différents degrés (20%, 40%, 70% and 100%). Ensuite, les racines sont imprégnées successivement dans différentes solutions alcooliques contenant de la résine LR White (Electron microscopy sciences) à concentration croissante (33%, 50%, 66% and 100%). La résine est alors polymérisée pendant une nuit à 70°C. Des coupes semi-fines de 1µm ont été réalisées avec un ultra-microtome (Ultracut E Reichert) équipé d'un diamant. Pour les observations microscopiques, des coupes semi-fines ont été bloquées pendant une nuit à 4°C dans un tampon PBST-BSA (phosphate à 0,1M, 2% Tween, 1% de sérum albumine bovine), dans lequel les anticorps primaires ont été ajoutés

selon les besoins aux dilutions suivantes (v/v) : LM6 et LM10 (1:10) et JIM7 (1:2), Rsol-I (1:200). Les anticorps LM6, LM10 et JIM7 sont commercialisés chez Plant Probes (Angleterre ; www.plantprobes.net) et Rsol-I est produit par Plant Research International (Pays-Bas ; <http://www.pri.wur.nl/uk>). Les coupes ont ensuite été rincées trois fois avec du tampon PBST-BSA, puis incubées pendant 2h avec des anticorps secondaires de chèvres utilisés au 1:1000 (v/v). Pour la révélation de LM6, LM10 et JIM7, l'anticorps secondaire est un IgG anti-rat couplé à la sonde fluorescente Alexa Fluor 633 (Molecular Probes) et pour Rsol-I, il s'agit d'un IgG anti-lapin couplé la sonde fluorescente Alexa Fluor 547 (Molecular Probes). Les échantillons sont ensuite rincées trois fois dans du tampon PBST-BSA, puis avec de l'eau désionisée. Les observations ont été effectuées avec le système Leica TCS SP2 AOBS équipé d'un microscope inversé (Leica DM RXA2, Wetzlar, Germany) et d'un objectif 63x à immersion à l'huile (ouverture numérique 1.2). L'autofluorescence a été observée dans un spectre de 590 à 650nm. Les échantillons ont été analysés à une longueur d'onde d'excitation de 488nm.

REMERCIEMENTS

La réalisation de l'ensemble des expériences n'aurait pas été possible sans la contribution d'un certain nombre de personnes que je souhaite remercier ici. Les mutants *wat1-1* et *wat1-3* ont été obtenues dans l'équipe par **Amandine Freydiere**. Concernant les tests de sensibilité aux différents agents pathogènes, les infections avec *P. cucumerina* et *H. arabidopsidis* ont été effectuées par **Marie-Pierre Rivière** dans le laboratoire d'**Antonio Molina** (Madrid, Espagne) ; les infections avec *V.dahliae* et *V. albo-atrum* ont été réalisées par **Koste Yadeta** dans le laboratoire de **Bart Thomma** (Wageningen, Pays-Bas) ; la sensibilité à *B. cinerea* a été évaluée par **Caroline Levis** (IJPB, Versailles) ; la réponse à *C. higginsianum* a été déterminée avec l'aide de **Mathieu Larroque** (LRSV, Toulouse). L'ensemble des croisements de mutants ou lignées transgéniques avec *wat1* et la sélection des individus qui en sont issus est l'œuvre de **Philippe Ranocha** (LRSV, Toulouse). La construction *ProPRX66:WAT1* et l'obtention de lignées *wat1* la possédant ont été réalisées par **Nicolas Oria** de l'équipe de **Lise Jouanin** (IJPB, Versailles), de même que l'étude de l'activité GUS dans la lignée *PRX66:GUS*. Les données transcriptomiques ont été générées par **Sandra Pelletier** et **Jean-Pierre Renou** (URGV, Evry) et, pour certains gènes cibles,

validées par qRT-PCR grâce à l'aide de **Xavier Barlet** (LIPM, Toulouse). L'analyse des données transcriptomiques avec la base de données AREX et l'utilisation du logiciel de hiérarchisation ont été possible grâce au travail d'**Hélène San Clemente** et **Bruno Savelli** (LRSV, Toulouse). Le métabolome global a été étudié par **Gilles Clément** (IJPB, Versailles), alors que **François Perreau** (IJPB, Versailles) a déterminé la teneur en glucosinolates indoliques et en acide raphanusamique. Le dosage de l'acide salicylique a pu être possible grâce aux conseils techniques de **Gisèle Borderies** (LRSV, Toulouse) et ma formation à l'utilisation de l'HPLC par **Sylvie Fournier** (LRSV, Toulouse). Pour l'étude du processus infectieux de *R. solanacearum* chez Arabidopsis, les observations au microscope confocal sont essentiellement le fruit du travail de **Catherine Digonnet** (LRSV, Toulouse) et **Yves Martinez** (IFR40, Toulouse). Merci à vous tous pour votre contribution à ce travail.

ANNEXE

ANNEXE

Mon travail de thèse a essentiellement consisté à caractériser la résistance accrue de *wat1* vis-à-vis de *R. solanacearum*. Cependant, j'ai également eu l'occasion de participer à la caractérisation du mutant faite au cours de son développement. Ces travaux ont donné lieu à la publication de deux articles (Ranocha et al., 2010 ; Denancé, Ranocha et al., 2010), inclus dans cette partie annexe du manuscrit.

1^{er} Article :

Ranocha Ph, **Denancé N**, Vanholme R, Freydier A, Martinez Y, Hoffmann L, Köhler L, Pouzet C, Renou J-P, Sundberg B, Boerjan W, Goffner D. (2010). *Walls are thin 1 (WAT1)*, an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula Nodulin21*, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. **The Plant Journal** 63(3): 469-483.

Ma contribution à cet article comprend la réalisation de la construction *ProWAT1:GUS* ; la transformation d'Arabidopsis avec la construction *Pro35S:WAT1-GFP* et une partie de la sélection des plantes qui en sont issues ; et la recherche chez Arabidopsis des protéines avec un double domaine DUF6 prédit.

2nd Article :

Denancé* N, Ranocha* Ph, Martinez Y, Sundberg B, Goffner D. Light-regulated compensation of *wat1* (*walls are thin1*) growth and secondary cell wall phenotypes is auxin-independent. (2010). **Plant Signaling & Behavior** 5(10): 1302-1304.

(*contribution équivalente des auteurs)

Pour cette publication, j'ai contribué aux expériences de transport basipète d'auxine radiomarquée dans des hampes de plantes ayant été cultivées en lumière continue, ainsi qu'à l'écriture de l'article.

Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of Medicago truncatula NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers

Philippe Ranocha¹, Nicolas Denancé¹, Ruben Vanholme², Amandine Freydier¹, Yves Martinez¹, Laurent Hoffmann¹, Lothar Köhler³, Cécile Pouzet¹, Jean-Pierre Renou⁴, Björn Sundberg⁵, Wout Boerjan² and Deborah Goffner^{1,*}

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

²VIB Department of Plant Systems Biology, UGent Department of Plant Biotechnology and Genetics, 9052 Gent, Belgium,

³Institut fuer Biologie III, Albert Ludwigs Universitaet Freiburg, 79104 Freiburg, Germany,

⁴Unité de Recherche en Génomique Végétale INRA-CNRS, 91057 Evry, France, and

⁵Umeå Plant Science Center, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, 90183 Umeå, Sweden

Received 24 February 2010; revised 21 April 2010; accepted 5 May 2010; published online 14 June 2010.

*For correspondence (fax +33 0 562193502; e-mail goffner@scsv.ups-tlse.fr).

SUMMARY

By combining *Zinnia elegans in vitro* tracheary element genomics with reverse genetics in *Arabidopsis*, we have identified a new upstream component of secondary wall formation in xylary and interfascicular fibers. *Walls are thin 1 (WAT1)*, an *Arabidopsis thaliana* homolog of *Medicago truncatula NODULIN 21 (MtN21)*, encodes a plant-specific, predicted integral membrane protein, and is a member of the plant drug/metabolite exporter (P-DME) family (transporter classification number: TC 2.A.7.3). Although *WAT1* is ubiquitously expressed throughout the plant, its expression is preferentially associated with vascular tissues, including developing xylem vessels and fibers. *WAT1:GFP* fusion protein analysis demonstrated that *WAT1* is localized to the tonoplast. Analysis of *wat1* mutants revealed two cell wall-related phenotypes in stems: a defect in cell elongation, resulting in a dwarfed habit and little to no secondary cell walls in fibers. Secondary walls of vessel elements were unaffected by the mutation. The secondary wall phenotype was supported by comparative transcriptomic and metabolomic analyses of *wat1* and wild-type stems, as many transcripts and metabolites involved in secondary wall formation were reduced in abundance. Unexpectedly, these experiments also revealed a modification in tryptophan (Trp) and auxin metabolism that might contribute to the *wat1* phenotype. Together, our data demonstrate an essential role for the *WAT1* tonoplast protein in the control of secondary cell wall formation in fibers.

Keywords: *Arabidopsis*, secondary cell wall, fiber development, *NODULIN21*-like, tonoplast, plant drug/metabolite exporter.

INTRODUCTION

Lignified secondary walls are deposited in specialized cell types at a final stage of their development. Localized mainly in vascular tissues, they confer cellular rigidity and hydrophobicity, and are therefore essential for mechanical support and solute conduction. The secondary wall can be viewed as an intricate, natural composite material and, in angiosperm species, the major components are cellulose,

xylan and lignin. Beyond their fundamental importance in plant development, lignocellulosic materials also serve as primary feedstock for materials and bioenergy (Kenney *et al.*, 1990). In recent years, our understanding of the molecular mechanisms underlying secondary wall formation has been increased through both forward genetic approaches and genomics followed by reverse genetics.

One major high-throughput screening initiative of Arabidopsis mutant populations involved searching for phenotypic alterations in xylem morphology (collectively known as *irx* mutants for irregular xylem; Turner and Somerville, 1997). In this way, the three different catalytic subunits of cellulose synthase (CESA) of the secondary cell wall complex were identified (Turner and Somerville, 1997; Taylor *et al.*, 1999). More recently, genome-wide co-expression analysis with CESA genes allowed for the identification of new genes involved in secondary wall formation, as witnessed by the *irx* collapsed xylem vessel phenotype in the corresponding mutants (Brown *et al.*, 2005; Persson *et al.*, 2005). Another forward genetic screen for altered stem-breaking properties led to the identification of a series of *fra* mutants (for fragile fiber; Zhong *et al.*, 2004, 2005). These mutants are characterized by thinner (or absent) secondary walls in the fibers. A variety of mechanisms including microtubule severing (*fra2*, a katanin-like mutant; Burk *et al.*, 2001), glucuronoxylan biosynthesis (*fra8*, glycosyltransferase family 47; Zhong *et al.*, 2005) and signaling transduction processes (*fra3*, a type-II inositol polyphosphate phosphatase; Zhong *et al.*, 2004) involved in secondary wall formation were uncovered in this screen.

Genomics approaches and expression profiling carried out in secondary wall-forming tissues (poplar and pine wood) and cell culture systems, notably in the *Zinnia elegans* tracheary element (TE) system (Hertzberg *et al.*, 2001; Milioni *et al.*, 2001; Demura *et al.*, 2002; Pesquet *et al.*, 2005) have provided many clues into new mechanisms in wall formation (Mellerowicz and Sundberg, 2008). Expression profiling of an equivalent to the *Zinnia* system in Arabidopsis led to the identification of NAC transcription factors, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 6 (VND6) and VND7, which are essential switches for metaxylem and protoxylem vessels, respectively (Kubo *et al.*, 2005). A distinct set of NAC domain proteins has also been shown to regulate secondary wall biosynthesis specifically in fibers. RNA interference inhibition of both SECONDARY WALL ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1 (SND1) and NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1 (NST1) expression resulted in a severe reduction in fiber secondary cell wall thickness (Mitsuda *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2007a). More recently, several other transcription factors involved in secondary wall biosynthesis have been identified that act downstream of SND1/NST1, some of which (MYB46, SND3, MYB103 and KNAT7) are direct targets of SND1 (Zhong *et al.*, 2007b, 2008).

In a previous study, we identified hundreds of new xylogenesis markers in subtractive libraries constructed from differentiating *Zinnia* TE cultures at the onset of secondary wall formation (Pesquet *et al.*, 2005). Among them, there was a gene that was annotated '*Medicago truncatula* NODULIN 21 (*MtN21*) homolog'. *MtN21* was originally

identified by differential screening of an *M. truncatula* nodule library in the presence versus absence of *Sinorhizobium* (*Rhizobium meliloti*), hence the name 'nodulin' (Gamas *et al.*, 1996). As the full genome of Arabidopsis became available, it appeared evident that despite the fact that Arabidopsis is not subject to nodulation, the genome contained numerous 'nodulin' genes. Although 'nodulin' genes may be involved in nodulation in leguminous species, they must play other roles in plant development, especially in non-nodulating species. The current knowledge of annotated *MtN21*-like genes is limited to a study suggesting a correlation between the induction of a pine *NODULIN21* homolog by auxin and adventitious root formation (Busov *et al.*, 2004). However, the function of *NODULIN21* genes has remained completely unknown. Herein, we identified a member of the plant-specific *NODULIN21* gene family, designated *WAT1* (*At1g75500*), which is essential for secondary wall formation in fibers of Arabidopsis.

RESULTS

Identification and characterization of an *MtN21* homolog in Arabidopsis

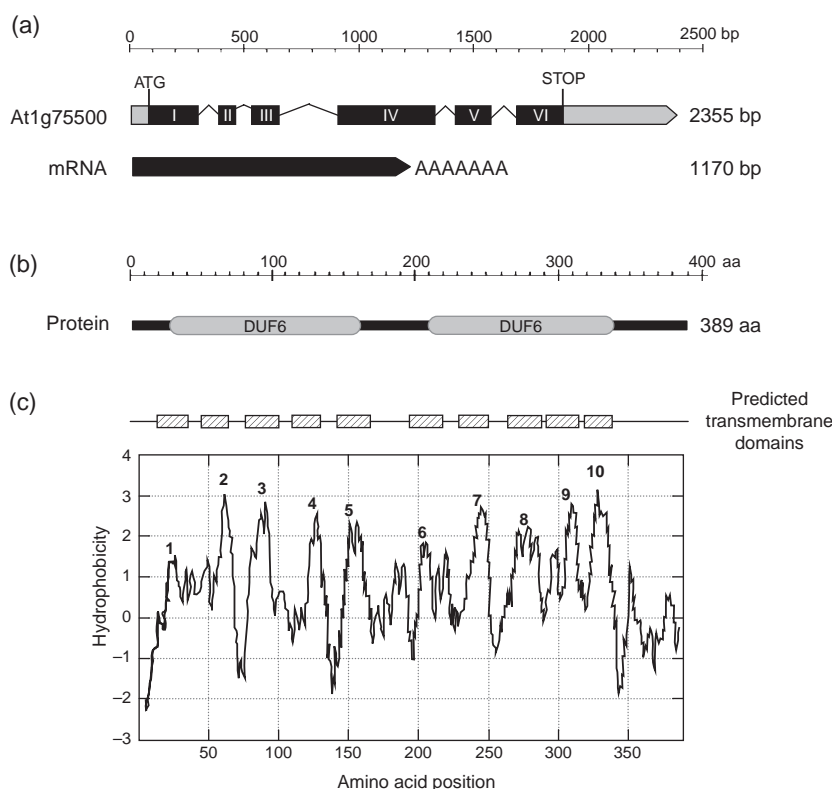
In a previous study aimed at identifying genes expressed at the onset of secondary cell wall formation in *Z. elegans* TE cultures (Pesquet *et al.*, 2005), an expressed sequence tag (EST) annotated as '*MtN21* homolog' was identified (GenBank accession number: DV017571). A BLASTX search identified *At1g75500* as the closest homolog of the *Zinnia MtN21* gene in Arabidopsis, exhibiting 83% sequence identity at the protein level over a stretch of 146 amino acids (Figure S1). A closer examination of *At1g75500* indicated a full-length genomic sequence of 2355 bp, divided into six exons and five introns (Figure 1a). The cDNA sequence is 1170 bp in length, and the resulting predicted protein is composed of 389 amino acids with a theoretical molecular weight of 42.6 kDa. From here on, the *At1g75500* gene will be denoted *WAT1* (for WALLS ARE THIN 1). An amino acid sequence search against the InterPro domain database indicated that *WAT1* contains two DOMAINS OF UNKNOWN FUNCTION 6 (DUF6; InterPro Domain Accession Number IPR000620; Figure 1b). Analysis of the hydrophobicity profile of *WAT1* predicted that each of the two DUF6s encompass five potential alpha helical transmembrane-spanning domains (Figure 1c). These structural features suggest that *WAT1* is a membrane protein belonging to the plant drug/metabolite exporter (P-DME) family (Jack *et al.*, 2001). BLAST searches demonstrated that *WAT1* has homologs in a variety of plant species, including poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*), rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*) and the moss, *Physcomitrella patens*. Homologs were not found in yeast and animal genomes, indicating that *WAT1* is a member of a plant-specific gene family.

Figure 1. Predicted structural characteristics of *WAT1* and its corresponding protein.

(a) Intron–exon structure, as predicted from the gene sequence. The 2355-bp-long gene comprises five introns (lines) and six exons (black boxes), and encodes a 1170-bp mRNA.

(b) Predicted domains of *WAT1*. According to INTERPROSCAN predictions, the 389-amino-acid protein contains two DUF6 domains.

(c) Hydrophobicity profile of *WAT1*. Hydrophobic regions are numbered from 1 to 10 on the graph, and are represented as hatched boxes above the hydropathy plot.



***WAT1* is expressed throughout the plant, and is associated with secondary wall-forming cells**

To determine where *WAT1* is expressed throughout plant development, RT-PCR analysis was performed. Although *WAT1* was expressed ubiquitously throughout the plant, slightly higher expression levels were detected in stems and hypocotyls (Figure 2a), organs with relatively large proportions of cells with secondary walls. These results are in agreement with publicly available transcriptomic data (<http://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004).

To further investigate the tissue- and cell-specific expression of *WAT1*, a promoter-GUS transcriptional fusion construct, harboring 3 kb of intergenic sequence upstream of *WAT1*, was introduced into *Arabidopsis* to drive reporter gene expression. GUS staining in Pro*WAT1*:GUS plants was detectable in all organs and developmental stages (Figure 2b–i). However, GUS activity was preferentially localized in provascular tissues in mature embryos, and in vascular tissues of leaves, stems, and roots. In roots, *WAT1* was also highly expressed in the apex and elongation zone (Figure 2h). In the middle portion of 20-cm-high stems, *WAT1* was expressed in developing xylem, in pith cells surrounding the vascular bundles, and in the phloem. In the interfascicular region, *WAT1* was expressed in the starch sheath, the outermost layers of developing fibers, and in fibers directly

adjacent to the vascular bundles (Figure 2f). However, *WAT1* did not appear to be systematically expressed in all interfascicular fiber cells. At the stem base, additional sites of *WAT1* expression include medulla sheath cells (the outermost cell layer of the central core of the pith that becomes lignified at maturity) and xylem fibers within the vascular bundle (Figure 2g).

***WAT1* is localized on the tonoplast**

To characterize the subcellular localization of *WAT1*, *Arabidopsis* lines transformed with a Pro35S:*WAT1*:GFP construct were analyzed (Figure 3). Prior to microscopic observation, transgenic roots were treated with FM4-64 at 4°C to label the plasma membrane. A highly specific GFP signal was observed at the tonoplast and in transvacuolar strands (Figure 3c). The ‘wavy’ shape of the *WAT1*:GFP signal is characteristic of tonoplast labeling (Reisen *et al.*, 2005). *WAT1* localization clearly did not overlap with the FM4-64-labeled plasma membrane (Figure 3c,d). To confirm the tonoplast localization of *WAT1*, *WAT1*:GFP and δ -tonoplast intrinsic protein (δ -TIP):RFP were transiently co-expressed in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* leaves (Figure S2). *WAT1*:GFP co-localized with delta-TIP:RFP at the tonoplast and in transvacuolar strand membranes.

Finally, when *wat1* (see below) was transformed with Pro35S:*WAT1*:GFP, the tonoplast-localized GFP signal was conserved (data not shown). Moreover, all aspects of the

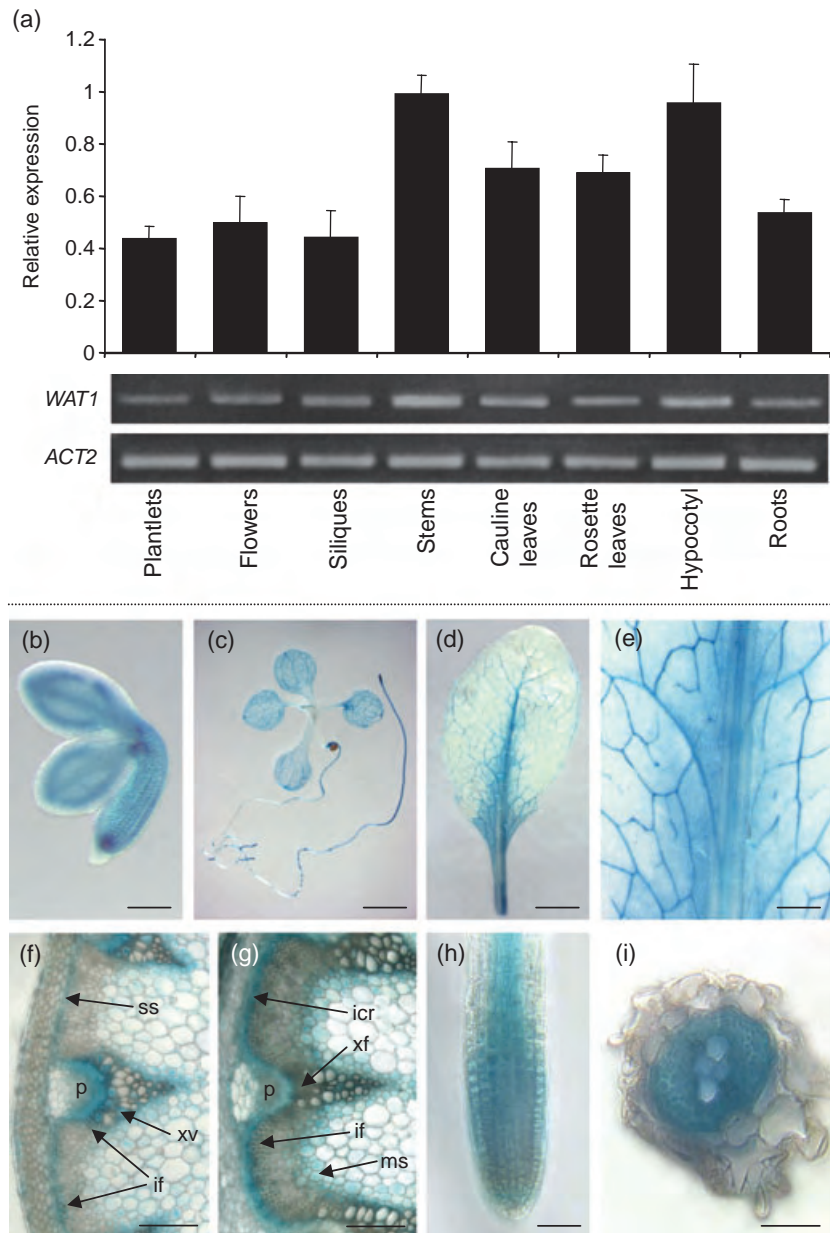


Figure 2. Temporal and spatial expression of *WAT1*.

(a) RT-PCR analysis of *WAT1* expression in 10-day-old plantlets, and flowers, siliques, inflorescence stems, cauline leaves, rosette leaves, hypocotyls and roots of 2-month-old plants. The quantity of cDNA template in each RT-PCR reaction was normalized to the signal from the actin-encoding *ACT2* gene (Fulton and Cobbett, 2003), and primers were designed to rule out the amplification of genomic DNA. Histogram bars represent the normalized *WAT1* expression levels versus *ACT2* expression levels.

(b–i) Pro*WAT1*:GUS line.

(b) Mature embryo imbibed for 24 h. Scale bar: 100 μ m.

(c) A 10-day-old *in vitro* grown plantlet. Scale bar: 5 mm.

(d) A 2-month-old rosette leaf. Scale bar: 5 mm.

(e) Close-up of rosette leaf veins. Scale bar: 1 mm.

(f) Cross section of the middle part of a 20-cm-high inflorescence stem; if, interfascicular fibers; p, phloem; ss, starch sheath; xv, xylem vessel. Scale bar: 20 μ m.

(g) Cross section of the basal part of a 20-cm-high inflorescence stem; icr, interfascicular cambial region; if, interfascicular fibers; ms, medullary sheath; p, phloem; xf, xylary fiber. Scale bar: 20 μ m.

(h) Root tip of 2-month-old plant. Scale bar: 50 μ m.

(i) Cross section of 2-month-old hypocotyl. Scale bar: 1 mm.

mutant phenotype described below were restored to the wild type (Figure S3). This set of experiments proves two things. First, the phenotypic alterations described below are indeed caused by the extinction of the *WAT1* gene. Second, the tonoplast localization of *WAT1* demonstrated by these experiments reflects its true localization *in planta*.

Identification of mutant lines carrying T-DNA insertions in the *WAT1* gene

Two allelic *wat1* mutant lines were identified. *wat1-1*, isolated from a Columbia (Col) ecotype population in the SALK collection (Alonso *et al.*, 2003), harbors a T-DNA insertion situated 55 bp upstream from the ATG translation start

codon. *wat1-2*, obtained from the Wassilewskija (Ws) ecotype population in the Versailles collection (Bechtold *et al.*, 1993), has a T-DNA insertion located 28 bp downstream of the stop codon (Figure 4a). RT-PCR analysis performed on 10-day-old *in vitro* plantlets indicated undetectable *WAT1* expression in *wat1-1*, and a reduction to 50% residual expression in the *wat1-2* mutant line, as compared with the wild type (Figure 4b,c). Detailed phenotypic characterization was carried out on both *wat1-1* and *wat1-2* (with the exception of comparative transcriptomics for *wat1-2*), and in agreement with its reduced but not null *WAT1* expression, *wat1-2* always had an observable yet less drastic phenotype compared with *wat1-1*. Therefore, for the sake of clarity, only

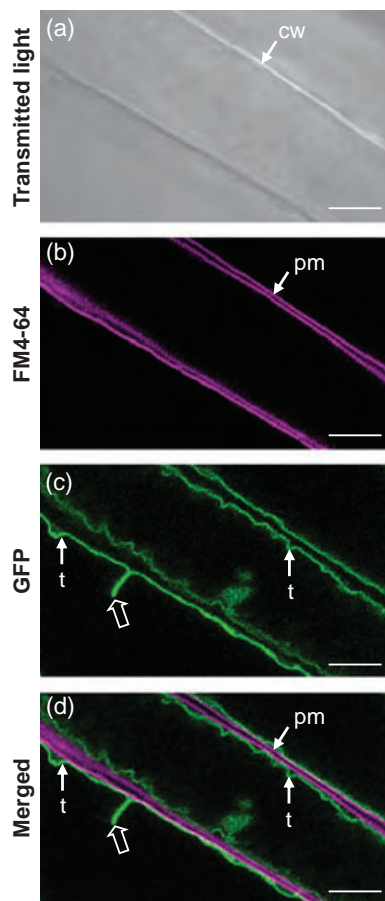


Figure 3. WAT1:GFP fusion localizes to the tonoplast in Arabidopsis epidermal cells.

Root epidermal cells from Arabidopsis plants expressing WAT1:GFP were analyzed by confocal microscopy. FM4-64 fluorescence is in magenta and GFP fluorescence is in green.

Empty arrows in (c, d) point to transvacuolar strand membranes; cw, cell wall; pm, plasma membrane; t, tonoplast. Scale bars: 10 μ m.

results obtained with *wat1-1* will be illustrated (except for metabolomic data, which varies slightly between *wat1-1* and *wat1-2*). It should be noted that heterozygous *wat1* lines did not exhibit any abnormal phenotypes.

***wat1* is shorter, bushier and has altered mechanical properties compared with the wild type**

Under all of the growth conditions tested (*in vitro*, soil-grown, and different light/dark and humidity regimes), *wat1* did not exhibit any visual phenotypic alterations in the early stages of plant development. The first differences were visible in 4-week-old plants. At this stage, the *wat1* rosette diameter and leaf size were smaller than the wild type. The difference in rosette size was maintained throughout development (Figure 5a; Table 1). Mutant leaves were also darker green. A pigment quantification assay revealed that they had a slightly higher chlorophyll *a* and *b* content (Table 1). Stems were shorter in *wat1* (Figure 5b,c). As

shown by scanning electron microscopy, and in longitudinal sections, *wat1* had shorter, more irregular, slightly bulging epidermal cells, indicating a cell elongation defect (Figure 5d,e). At the flowering stage, mutant stem apices became red, dry and bent downwards (Figure 5b). As a consequence, seed yield was dramatically reduced (by about 10 times) in *wat1* plants (Table 1). Mutants also produced twice as many stems as the wild type (Table 1). Mechanical tests were performed on mutant and wild-type stems. The breaking stress, which is proportional to the force required for breaking apart the bottom part of the stems, was lower in *wat1*, demonstrating that mutant stems were significantly less strong than their wild-type counterparts (Figure 5f).

***wat1* exhibits reduced secondary cell wall deposition in fibers**

The overall organization of the vascular bundles and interfascicular fibers was not altered in *wat1* stems (Figure 6). Under UV light (Figure 6a,b), the intensity of autofluorescence in the interfascicular region was lower in the mutant, suggesting a decrease in phenolic compound deposition. Stem sections treated with Mäule reagent, which stains guaiacyl (G) lignin units brown and syringyl (S) red, clearly showed that *wat1* had less lignin, and was deficient in S unit lignin in interfascicular and xylary fibers (Figure 6c,d). Depending on the plant, this ranged from a drastically reduced red staining of fiber walls (Figure 6d) to a complete lack of red coloration (data not shown). The xylem vessels and interfascicular fibers were observed in more detail. Little to no secondary walls were deposited in the interfascicular fibers (Figures 6e,f and S4c). Moreover, these cells were larger in *wat1* compared with the wild type (Figure S4d). Neither xylem vessel size nor cell wall thickness was affected by the *wat1* mutation (Figures S4a,b). The effect of the *wat1* mutation on xylan content and distribution was also tested in LM10 immunolocalization experiments (Figure 6i–n). LM10 is an antibody raised against xylan, a major non-cellulosic polysaccharide of plant cell walls that is especially abundant in secondary cell walls (McCartney *et al.*, 2005). The LM10 label was greatly reduced in interfascicular and xylary fibers of *wat1* stems (Figure 6i,j). The fiber-specific reduction of secondary cell wall deposition was also observed in adult hypocotyls (Figure 6k,l), the organ that shares the closest resemblance to wood in terms of cell type, morphology and organization (Chaffey *et al.*, 2002). In young roots in which only xylem vessels have secondary cell walls, no difference in LM10 labeling was detected between *wat1* and the wild type (Figure 6m,n).

Early stages of fiber differentiation proceed normally in *wat1*

To address the question as to whether WAT1 is also essential for early stages of fiber differentiation, or more

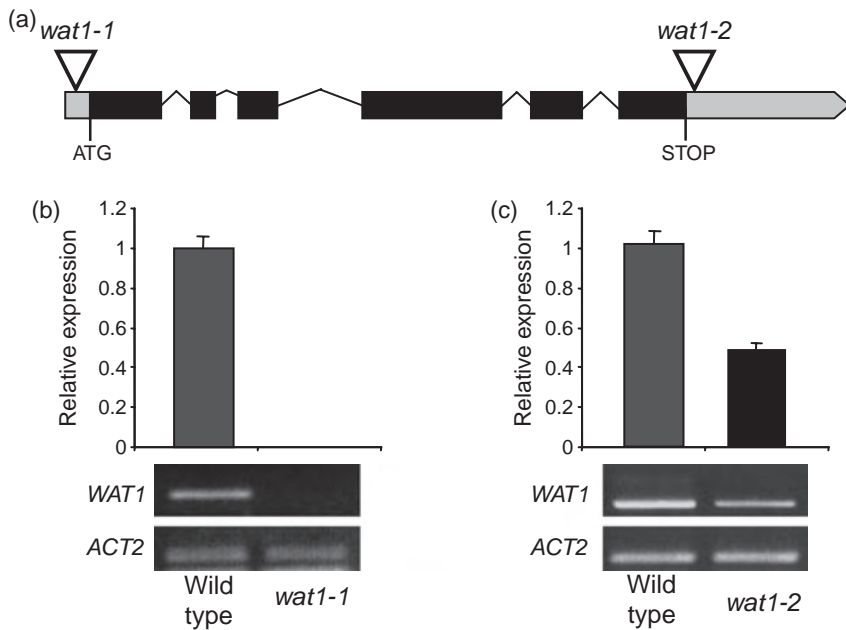


Figure 4. Isolation of *wat1* T-DNA insertion mutants.

(a) Position of the T-DNA insertion sites in *wat1-1* and *wat1-2*. Gray boxes, 5' and 3' untranslated regions; black boxes, exons; lines, introns.

(b) RT-PCR analysis in *wat1-1* mutant and in wild-type 10-day-old *in vitro* plantlets. Histogram bars represent *WAT1* expression levels normalized versus *ACT2* expression levels.

(c) RT-PCR analysis in *wat1-2* mutant and in wild-type 10-day-old *in vitro* plantlets. Same legend as (b).

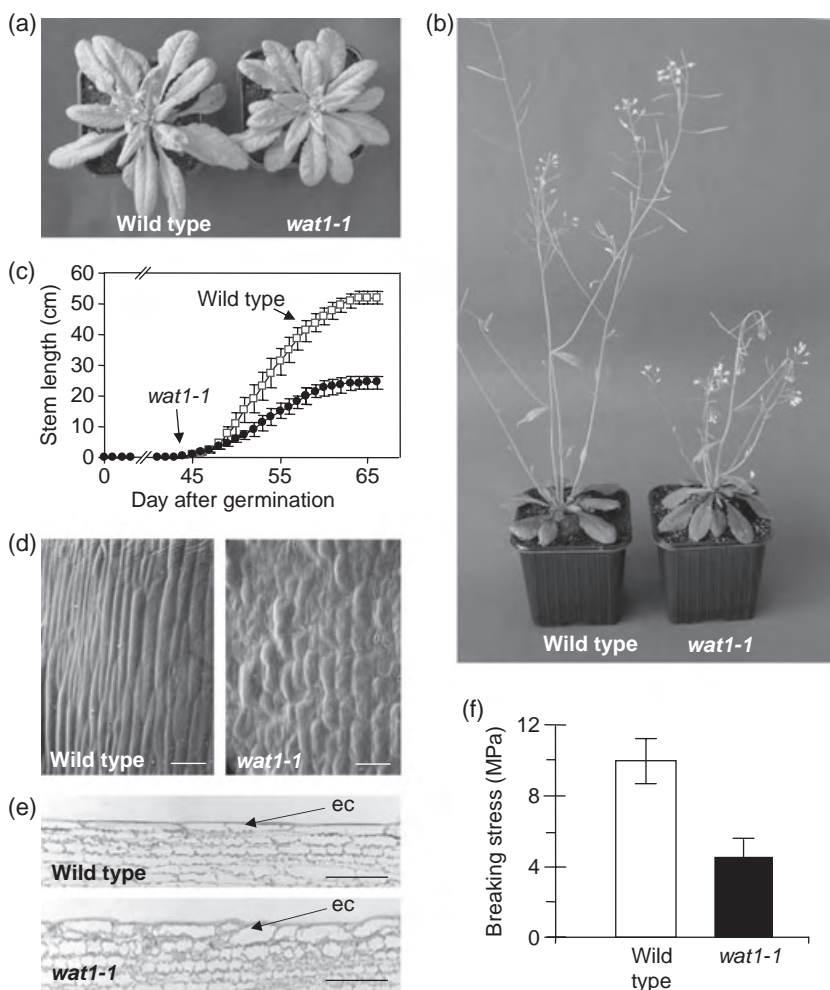


Figure 5. Phenotypic characteristics of *wat1-1*.

(a) Seven-week-old plants.

(b) Two-month-old plants.

(c) Height of inflorescence stems. Mean \pm SD, $n = 10$ biological replicates.

(d) Basal part of 7-cm-high stems visualized by scanning electron microscopy. Scale bar: 50 μ m.

(e) Longitudinal section of the basal part of 7-cm-high stems stained with toluidine blue; ec, epidermal cell. Scale bar: 20 μ m.

(f) Breaking stress of primary stems. Mean \pm SE, $n = 9$ and 6 biological replicates, respectively.

Table 1 Overview of the *wat1-1* mutant phenotype. Rosettes and stems were measured 9 weeks after germination, when plants were senescing and flower had production ended. Seeds were harvested, counted and weighted when completely dry. Data represent the means \pm SDs; $n = 20$ for rosette and stems; $n = 10$ for seeds

	Wild type	<i>wat1-1</i> ^a
Rosette diameter (cm)	12.7 \pm 1.0	9.8 \pm 0.7**
Number of rosette leaves per plant	27.4 \pm 1.5	27.3 \pm 1.1
Average rosette leaf surface (cm ²)	12.6 \pm 1.5	8.5 \pm 1.3**
Chlorophyll <i>a</i> content	0.453 \pm 0.021	0.587 \pm 0.036*
Chlorophyll <i>b</i> content	0.20 \pm 0.09	0.26 \pm 0.01*
Number of inflorescence stems per plant	10.8 \pm 4.5	27.4 \pm 3.3**
Weight of approximatey 1000 dry seeds (mg)	19.1 \pm 1.2	17.9 \pm 2.5*
Seeds per plant (mg)	137.4 \pm 2.4	14.1 \pm 1.7**

^aAsterisks indicate values found to be significantly (Student's *t*-test) different from the wild type: * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$.

specifically for the later stages of secondary wall deposition, we observed the morphology of interfascicular cells in longitudinal stem sections (Figure 6g,h). Developing *wat1* fibers elongated and had tapered ends, indicating that the initial phases of fiber differentiation appear to progress in a normal fashion.

The identification of fiber mutants in Arabidopsis led to the definition of a set of new fiber differentiation markers. Among them are *fragile fiber 3* and *fragile fiber 8*, for which the corresponding genes encode a type-II inositol polyphosphate phosphatase (*fra3*; Zhong *et al.*, 2004) putatively involved in actin organization and a glycosyltransferase GT47 involved in xylan synthesis (*fra8*; Zhong *et al.*, 2005). To test the impact of the *wat1* mutation on *FRA3* or *FRA8* expression, Pro*FRA3*:GUS or Pro*FRA8*:GUS were introduced into *wat1-1*. Pro*FRA3*:GUS expression was spatially and temporally comparable with wild-type expression, whereas the Pro*FRA8*:GUS expression level was greatly decreased in *wat1-1* (Figure S5). In agreement with LM10 labeling, the decrease in Pro*FRA8*:GUS activity in *wat1-1* was specific to fibers, and was not observed in xylem vessels. Together, morphological and marker gene expression data position

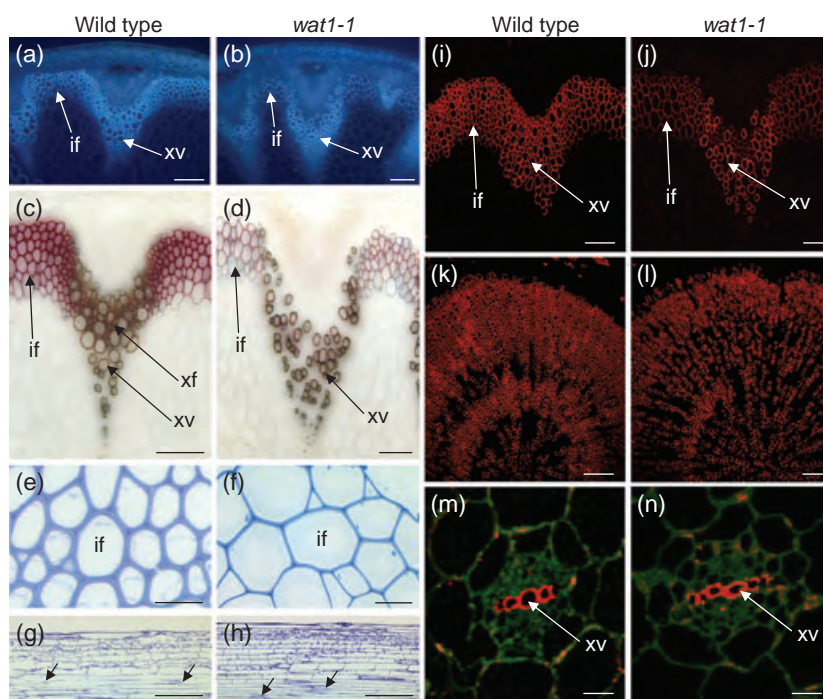


Figure 6. Reduction of secondary cell wall deposition in *wat1-1*.

(a, b) Cross section of the basal part of wild type (a) and *wat1-1* (b) stems observed under UV light. Scale bar: 150 μ m.

(c, d) Cross section of the basal part of wild type (c) and *wat1-1* (d) stems stained with Mäule reagent. Scale bar: 20 μ m.

(e, f) Cross section of the basal part of wild type (e) and *wat1-1* (f) stems stained with toluidine blue. Close-up of interfascicular region. Scale bar: 4 μ m.

(g, h) Longitudinal section of the basal part of wild type (g) and *wat1-1* (h) stems stained with toluidine blue. Arrows designate tapered ends of interfascicular fiber cells. Scale bar: 20 μ m.

(i–n) Indirect immunofluorescence micrographs of wild-type and *wat1-1* stems (i and j), hypocotyls (k and l) and *in vitro* grown 10-day-old root (m and n) sections labeled with the LM10 monoclonal antibody. The LM10 signal is represented by the red color scale. In (m) and (n), the autofluorescence signal (488 nm, in green) was also indicated to help visualize the overall shape and size of the sections. Scale bar: 50 μ m in (i) and (j); 150 μ m in (k) and (l); and 1 mm in (m) and (n).

Key: if, interfascicular fibers; xf, xylary fibers; xv, xylem vessel.

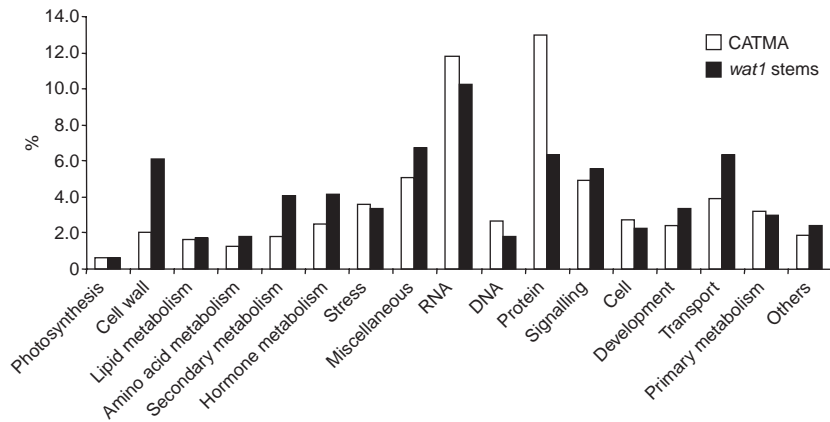


Figure 7. Functional categories of differentially expressed genes in *wat1-1*.

Differentially expressed genes in *wat1-1* stems were classified into functional categories using the *Arabidopsis thaliana* pathway analysis program, MAPMAN v2.1.1 (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan>). All of the genes available on the CATMA chip were also classified into functional categories. These two sets of data are represented by black (*wat1-1*) and white (CATMA) bars.

WAT1 after fiber initiation, and between *FRA3* and *FRA8*, in the fiber signaling pathway.

Comparative transcriptomics and metabolomics suggest a link between secondary walls, auxin metabolism and *WAT1* gene function

To progress in our understanding of the biological role of *WAT1* in secondary wall development, comparative transcriptomics were performed on the basal portions of *wat1-1* versus Col inflorescence stems. The relative proportions of the de-regulated genes in *wat1-1* were calculated for the different functional categories and compared with the overall distribution of the functional categories of the genes spotted on the CATMA arrays. Certain functional categories were particularly affected by the mutation (Figure 7). In addition to the expected categories, such as cell walls and secondary metabolism, they also included hormones and transport. The cell wall-related data set has been compiled in Table S1. Clearly, the reduced secondary wall deposition in the fibers of *wat1-1* may be accounted for by the downregulation of suites of genes associated with the biosynthesis of the different wall polymers. Secondary cellulose deposition requires the coordinated regulation of *CESA8*, *CESA7* and *CESA4*. These genes were all significantly downregulated in *wat1-1*. Similarly, a GT43, *IRX9*, recently identified through co-expression analysis with *CESA8*, *CESA7* and *CESA4*, and shown to be involved in glucuronoxylan synthesis in secondary walls, was among the most highly downregulated genes in *wat1-1*. As for lignin biosynthetic genes, all but *CCoAOMT* and *HCT* were downregulated in *wat1-1*.

Of significant interest is the downregulation of two fiber-specific transcription factors, *SND1* and *NST1*, in *wat1-1* (Table S1). Moreover, direct targets of these two transcription factors (*KNAT7*, *MYB46* and *MYB103*) were also downregulated in the mutant. *KNAT7* and *MYB103* were the most highly downregulated transcription factors in *wat1-1*. Interestingly, none of the vessel-specific transcription factors (i.e. *VND6* and *VND7*) were downregulated in *wat1-1*, which is

in agreement with the fact that *wat1* xylem vessel thickness was unaffected by the mutation.

As indicated in Figure 7, there is also a relatively high proportion of de-regulated hormone genes in the base of *wat1-1* stems. A more detailed examination indicated that the large majority of these genes were involved in auxin metabolism (Table S1). Many auxin-responsive genes from the small auxin-up RNA (*SAUR*) and auxin/indole-3-acetic acid (*AUX/IAA*) families, as well as auxin influx transporter genes (*AUX1*, *At2g38120*; *AUX1*-like, *At2g21050*) were downregulated in *wat1-1*, whereas genes putatively involved in auxin biosynthesis (*NIT2*, *At3g44300*) and conjugation (GH3-like, *At4g03400*) were upregulated. The expression of *PIN* genes was not affected by the *wat1* mutation. Interestingly, a microarray-wide search indicated that the most tightly co-regulated genes with *WAT1* include *AUX1*, *IAA9* and *IAA13* (data not shown).

A comprehensive analysis of the methanol/chloroform-soluble metabolite fraction in mutant and wild-type stems, carried out using liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), corroborated the transcript profiling data. Changes in readily identifiable metabolite composition are reported in Table 2. The exhaustive data set is also available in Table S2. In agreement with the reduced secondary wall development in fibers, all detected monolignols and oligolignols were significantly reduced, whereas phenylalanine accumulated in *wat1*. This is in agreement with histochemical observations indicating less lignin in fiber walls (Figure 6d), and the transcriptional downregulation of the phenylpropanoid and monolignol pathway genes in *wat1-1* (Table S1). On the other hand, lignans accumulated in the *wat1* mutant. This does not contradict the transcript data, as lignans are presumably a minor sink for monolignols, compared with lignin in *Arabidopsis* stems. Quercetin, a flavonol, and flavonol glycosides accumulated in *wat1*. It is possible that the higher lignan and flavonoid contents result from a redirection of the flux of carbon that is normally channeled into lignin.

Table 2 Changes in known metabolite composition in *wat1-1* stems, as determined by LC-MS and GC-MS

Category	Metabolite name ^a (detection method)	Peak area in arbitrary units (average ± SD) ^b	
		Col	<i>wat1-1</i>
Amino acids	Phenylalanine (LC-MS)	53.8 ± 14.0	110.3 ± 50.2*
	Tryptophan (LC-MS)	350.4 ± 162.0	73.1 ± 73.3*
	Threonine (GC-MS)	38 393.2 ± 9973.4	12 865.8 ± 7356.4*
Lignans	G(8-5)G glucoside (LC-MS)	20.6 ± 8.4	44.1 ± 13.9*
	Reduced G(8-5)G glucoside (LC-MS)	18.0 ± 6.3	35.7 ± 9.2*
Mono/oligolignols	Sinapyl alcohol (LC-MS)	26.6 ± 8.4	1.5 ± 0.9**
	G(8-5)G (LC-MS)	24.3 ± 12.3	1.5 ± 0.9*
	G(t8-O-4)G(8-5)G (LC-MS)	11.8 ± 5.2	2.3 ± 1.8*
	S(8-5)G (LC-MS)	34.5 ± 10.5	1.5 ± 0.9**
	G(8-O-4)S(8-5)G (LC-MS)	11.5 ± 5.7	1.5 ± 0.9*
	Trilignol 1 (LC-MS)	22.2 ± 9.0	6.6 ± 3.5*
	Trilignol 2 (LC-MS)	14.6 ± 6.3	3.6 ± 2.9*
Flavonol (glycosides)	Glc-Rha-Kaempferol (LC-MS)	154.6 ± 42.7	929.3 ± 269.2**
	Glc-Glc-Rha-Kaempferol (LC-MS)	247.0 ± 70.0	937.1 ± 142.8**
	Rha-Rha-Kaempferol (LC-MS)	399.6 ± 139.3	5947.9 ± 2102.3**
	Quercitin (LC-MS)	15.8 ± 13.4	51.6 ± 10.0*
	Glc-Rha-Quercitin (LC-MS)	11.0 ± 15.1	130.7 ± 54.9*
	Glc-Rha-Isorhamnetin (LC-MS)	6.0 ± 5.6	90.1 ± 47.8*
Others	Shikimic acid (GC-MS)	732.3 ± 260.1	93.9 ± 64.4*
	Galactinol (GC-MS)	24 802.4 ± 2527.7	10 183.2 ± 1990.7**

^aFor nomenclature of lignan and mono/oligolignols, G and S are used for guaiacyl and syringyl units, to name the units from coupling reactions of coniferyl and sinapyl alcohol. The interunit bond formed during the radical coupling reaction is specified in parentheses (Morreel *et al.*, 2004). G(8-5)G glucoside is also known as dehydrodiconiferylalcohol glucoside (DCG).

^bAsterisks mark values found to be significantly different from the wild type (Student's *t*-test): **P* < 0.05; ***P* < 0.005.

More surprisingly, Trp metabolism was modified in *wat1*. Trp itself was reduced in *wat1* (down to 20% of wild-type levels in *wat1-1*), whereas other indolic compounds accumulated in the mutants (Table S3). The nature of these compounds appeared to be dependent on the genetic background (tryptophan-191 in *wat1-1* and acetyl-tryptophan in *wat1-2*). In agreement with reduced Trp levels, *wat1* plantlets were more sensitive to the toxic analog 5-Me-Trp than were the wild-type plants (Figure 8).



Figure 8. *wat1* is more sensitive to 5-Me-Trp, a toxic analog of Trp. *wat1-1* and Col-0 were grown for 20 days on MS medium supplemented with 100 μM 5-Me-DL-Trp.

Auxin levels are significantly decreased in *wat1* stems

In Arabidopsis, IAA is synthesized via Trp-dependent pathways (Benjamins and Scheres, 2008). As Trp content was low and many auxin-responsive genes were downregulated in *wat1-1*, we postulated that the auxin content would also be lower. As a first step to evaluate auxin levels *in planta*, the *DR5:GUS* reporter construct was introduced into *wat1-1* by crossing. DR5 is a highly active, synthetic auxin response element derived from the soybean GH3 promoter (Ulmasov *et al.*, 1997). In imbibed seeds, roots and leaves, GUS activity was similar in the mutant as compared with the wild type (Figure 9a–d, i, j). The major difference between the wild type and *wat1-1* was observed in the inflorescence stem (Figure 9e–h). In the wild type, DR5-driven GUS activity was intense in the vascular bundles in both the basal and apical portions, whereas in *wat1-1*, GUS staining was unaffected in the apical portion, but was very weak at the stem base (Figure 9h).

Free IAA was then measured in 10-day-old plants, and at the apical and basal portions of inflorescence stems. No significant differences were observed in 10-day-old *in vitro*-grown plantlets (Figure 9k). However, auxin content was significantly lower at the base of the inflorescence stem of *wat1*. These results confirm the *DR5:GUS* data, and may explain the massive downregulation of auxin-response genes in the base of *wat1-1* stems (Table S1). Finally, the decrease in auxin content in the basal portion of the stem

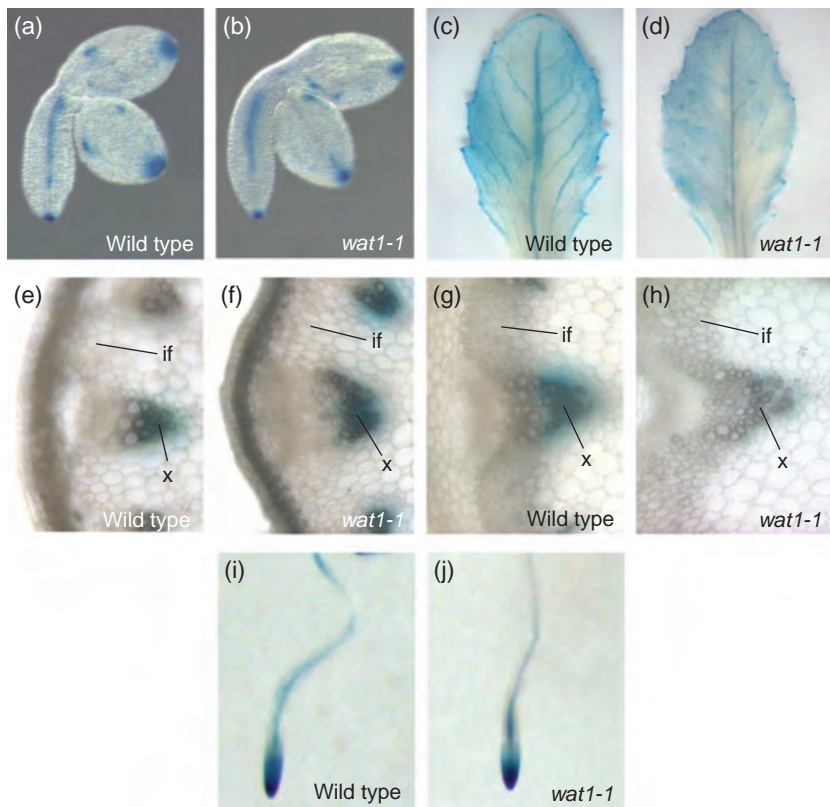


Figure 9. Effect of the *wat1* mutation on DR5:GUS expression and free indole-3-acetic acid (IAA) content.

(a–j) DR5:GUS expression in the wild type and *wat1-1* background.

(a, b) Imbibed seed.

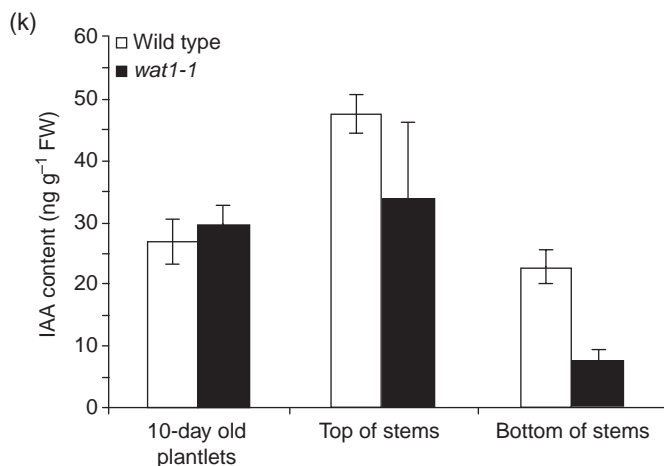
(c, d) Adult rosette leaf.

(e, f) Cross section of the apical part of a 20-cm-high stem.

(g, h) Cross section of the basal part of a 20-cm-high stem.

(i, j) Main root tip in 2-month-old plants. if, interfascicular fibers; x, xylem.

(k) Free IAA content in wild type and *wat1-1*. IAA was measured in 10-day-old plantlets grown *in vitro*, and the basal and apical portions of 20-cm-high stems. Mean \pm SD, $n = 5$ biological replicates.



could be conceivably accounted for by a decrease in *in situ* Trp-dependent biosynthesis and/or a decrease in auxin transport. To address this issue, auxin transport in the stem was measured. Basipetal auxin transport was significantly reduced in *wat1* stems (Figure S6).

DISCUSSION

WAT1 is a new upstream regulator of secondary wall formation in fibers

In this study we have coupled together genomics derived from the *Zinnia* TE system and reverse genetics in Arabid-

opsis to identify a gene that is essential for secondary wall formation in stem fibers. Indeed, the most striking feature of the *wat1* phenotype is the severe decrease in secondary cell wall thickness of interfascicular and xylary fibers (Figure 6). This phenotype can be readily correlated with the transcriptional downregulation of genes known to be involved in the biosynthesis of secondary cellulose, xylan and lignin in *wat1-1* stems (Table S1) and metabolites in lignin biosynthesis (Table 2).

Key transcriptional regulators of fiber secondary wall formation (SND1 and NST1), in addition to their direct targets (MYB103, KNAT7 and MYB46) were also downreg-

ulated in *wat1-1*. This positions WAT1 upstream of SND1 and NST1 in the fiber development signaling pathway. Moreover, as we observed that early steps in fiber differentiation are initiated in *wat1*, this implies that SND1 and NST1 do not actually trigger fiber differentiation as such, but act later in initiating secondary wall formation.

Interestingly, the expression of xylem vessel-specific transcription factors (VND6 and VND7) was unaffected by the *wat1* mutation. This is in keeping with the specificity of the fiber phenotype. Based on these findings, we conclude that our transcriptomic data provide a set of new fiber-specific markers, many belonging to gene families that have yet to be associated with either fiber development or secondary wall formation (i.e. WRKY, zinc finger and bHLH).

Despite its upstream position and likely role in a more fundamental process than wall formation *per se*, the mutation of WAT1 does not provoke a particularly drastic growth phenotype throughout plant development. WAT1 is already expressed in the seedling stage (Figure 2); however, *wat1* exhibits no obvious morphological or cellular phenotype during the early stages of development. One possible explanation could be functional redundancy with other proteins at early stages of vegetative growth. Interestingly, despite the absence of a growth phenotype at this stage, *wat1* plantlets were hypersensitive to 5-Me-Trp, suggesting that perturbations in Trp/auxin homeostasis might be a primary causal factor in the *wat1* phenotype.

WAT1 establishes a link between the tonoplast, Trp/auxin metabolism and secondary walls in Arabidopsis fibers

WAT1 belongs to the P-DME family (2.A.7.4), a subset of the 10 transmembrane spanner (TMS) DME family (2.A.7.3), which in turn is classified in the drug/metabolite transporter superfamily (DMT) [Transport Classification Database (TCDB); <http://www.tcdb.org>; Saier *et al.*, 2006; Jack *et al.*, 2001]. According to TCDB criteria, both plant and non-plant DME members possess a conserved structure: a tandem DUF6 that defines the 10 TMS. Non-plant members of the DME family are derived from phylogenetically divergent bacteria and archaea, and have been shown to export amino acids (Daßler *et al.*, 2000; Livshits *et al.*, 2003) and diverse solutes, including methylamine (Ferguson and Krzycki, 1997) and the pigment indigoidine (Rouanet and Nasser, 2001).

The P-DME family is essentially comprised of predicted proteins with sequence homology to the original cDNA encoding MtN21. In Arabidopsis, there are 46 NODULIN21 family members. Among them, in addition to WAT1, six (*At1g44800*, *At4g08300*, *At1g21890*, *At1g43650*, *At2g40900* and *At3g56620*) exhibit preferential expression in xylem (Zimmermann *et al.*, 2004). Some NODULIN21 family members have been identified in systematic plant membrane proteomes. Curiously, WAT1 has been detected in both the plasma membrane and tonoplast fractions in two indepen-

dent studies carried out on Arabidopsis cell suspension cultures (Marmagne *et al.*, 2004; Jaquinod *et al.*, 2007). In the present study, WAT1 was localized uniquely on the tonoplast (Figure 3). A NODULIN21 protein was also identified in the tonoplast proteome of cauliflower buds (Schmidt *et al.*, 2007). To our knowledge, the involvement of a tonoplast-localized protein in secondary wall development has never been described.

One intriguing result is the concomitant reduction of both Trp and auxin content in the basal portion of *wat1* stems. This suggests that a Trp-dependent auxin biosynthetic pathway may function in the stem itself. There are at least four distinct Trp-dependent auxin biosynthetic routes that have been proposed in Arabidopsis (Benjamins and Scheres, 2008; Tao *et al.*, 2008), yet little is known about their spatial and temporal regulation. Earlier physicochemical evidence has been provided for stem-localized auxin biosynthesis (Sundberg and Ugglå, 1998). Although apical shoots and developing leaves are important sources of polarly transported auxin, responsible for the induction of vascular tissues, and maintaining secondary xylem and phloem production from the cambium, vascular localized auxin biosynthesis can easily be envisaged in order to maintain appropriate auxin levels during its transport, particularly in large plants such as trees (Ugglå *et al.*, 1998; Sundberg *et al.*, 2000). Moreover, a nitrilase gene, NIT2, potentially involved in one of the Trp-dependent auxin biosynthetic pathways, is highly upregulated in *wat1-1* stems, presumably as a compensatory mechanism in response to low auxin levels (Table S1). That said, we cannot rule out that the decrease in auxin content in the basal portion of *wat1* stems is the result, at least in part, of reduced basipetal auxin transport. It is possible that the observed auxin transport defect is a consequence of flavonoid accumulation (Brown *et al.*, 2001), which itself is likely to be a repercussion of redirected phenylpropanoid metabolites away from lignin in the absence of secondary wall deposition in fibers. At this point, it would be difficult to assess the relative contribution of the decrease in auxin transport and the possible reduction in *in situ* Trp-dependent auxin synthesis to explain the lower auxin content at the stem base.

The auxin depletion in the basal portion of the *wat1* stem corresponds to the spatial localization where the secondary walls of fibers are deposited. This suggests that (i) there is no compensation mechanism for *wat1* in this cell type and (ii) this step in fiber development requires auxin. Given the essential role of xylem vessels in plant survival, a greater functional redundancy may be present to ensure vessel function more so than fiber development. Auxin is well known to induce differentiation of parenchyma cells to tracheary elements (vessels) in cell cultures, callus cultures and parenchymatic tissues (Aloni, 1987), and auxin depletion delays lignification of xylem fibers in Populus, and

results in a xylem phenotype similar to *wat1* (Björklund *et al.*, 2007). In conclusion, we have identified WAT1 as a tonoplast protein that functions downstream of FRA3 and upstream of NST1/SND1 in the signaling cascade, leading to secondary cell wall formation in fibers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plants and growth conditions

The mutant lines *wat1-1* and *wat1-2* were isolated from the T-DNA mutagenized populations in the SALK collection (Alonso *et al.*, 2003) and the Versailles collection (Bechtold *et al.*, 1993), respectively (lines N501389 and EXJ52). Positive lines were identified with the following gene-specific primers: *wat1-1* (CAACACACAAACACACAC and CATTGTCCGTTGACTGATGG), *wat1-2* (GTCTCAATCAAAGCTCCCA and GGCTTCTATTGCGTTAGGCG).

For *in vitro* experiments, seeds were surface-sterilized and sown on agar-solidified MS medium including sucrose (10 g L⁻¹) and 2-(*N*-morpholino)-ethanesulphonic acid (MES) buffer (0.5 g L⁻¹), pH 5.7, in culture rooms with an 8-h photoperiod (120 μmol photons m⁻² sec⁻¹) at 22°C. Plants were also routinely grown in Jiffy peat pellets (9 h light, 200 μmol photons m⁻¹ sec⁻¹, 22°C, 65% RH).

DNA and amino acid sequence analysis

Sequence alignments were performed with CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). INTERPROSCAN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan>) was employed for the prediction of functional domains of the protein. Transmembrane helices were predicted using TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) (Krogh *et al.*, 2001). The hydrophobicity plot was produced according to Kyte and Doolittle (1982), with ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>), using a 15-residue window.

RNA isolation and gene transcript analysis by RT-PCR

Total RNA was prepared using the *Extract-all* reagent (Eurobio, <http://www.eurobio.fr>), and then used to generate cDNA with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, <http://www.clontech.com>). PCR was performed with the following gene-specific intron-spanning primers (5' → 3'): WAT1 (CCTTATGGGGAGTTCCGGAG and ATCAAGACCGCTCCAATAATC); ACT2 (GGTAACATTGTGCTCAGTGG and CTCGGCCTTGGAGATCCACA). Following electrophoresis and ethidium bromide staining, RT-PCR products were quantified. Two independent experiments were performed with consistent results.

Construction of the ProWAT1:GUS gene fusion, plant transformation and GUS assays

The oligonucleotides AAAAAGCAGGCTTCTCTACCATACACATCATCGCGTA and AGAAAGCTGGGTCTGGATCGAGCTTAACAATCGATCA were used to amplify the 2980 bp immediately upstream of the ATG of WAT1 from BAC sequence F10A5 (Arabidopsis Biological Resource Center, <http://abrc.osu.edu>). This PCR product was amplified with oligonucleotides GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT and GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT containing recombination sequences. The final PCR product was cloned into pDONR207 (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>), and was subsequently transferred into the binary plasmid pMDC162 (Curtis and Grossniklaus, 2003).

ProWAT1:GUS was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 for floral-dip transformation (Clough and Bent, 1998) of Arabidopsis (Ecotype Columbia). Seeds were selected on MS

medium containing hygromycin. GUS assays were conducted as described previously (Jefferson *et al.*, 1987).

Construction of the Pro35S:WAT1:GFP gene fusion

The oligonucleotides CCTTCGTTGATCGATTGTTAAGCT and GCTGGAGAGTGATTTGTCCAAAGT were designed to amplify the WAT1 sequence (1170 bp) from Arabidopsis cDNA. The obtained product was used as a template first with the oligonucleotide pairs AAAAAGCAGGCTTCATGGCGGATAACACCGATAATCGGA and AGAAAGCTGGGTCAACATTGTCCGTTGACTGATGGAGT, and then with GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT and GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT, containing the recombination sequences. The final PCR product was cloned into pDONR207, and subsequently transferred into the binary plasmid pGFP-C-BIN.

A Pro35S:GFP:GFP control construct was generated by transferring the GFP from pDONR207:GFP into pGFP-C-BIN. pDONR207:GFP and pGFP-C-BIN containing the GFP2.5 coding sequence were a gift from the John Doonan laboratory (John Innes Centre, <http://www.jic.ac.uk>). Plant transformation was as described above. Seeds were selected on MS medium containing kanamycin.

Microscopy

Cross sections of fresh 20-cm-high Arabidopsis stems (100–150 μm) were stained either according to Atanassova *et al.* (1995) or with 0.05% toluidine blue O (Sigma-Aldrich, <http://www.sigma-aldrich.com>) in 0.1 M NaPO₄ buffer (pH 7.0). Autofluorescence was observed with a Leica microscope (excitation filter Bp 340–380 nm; suppression filter Lp, 430 nm; <http://www.leica.com>). Images were recorded with a CCD camera (Photonic Science, <http://www.photonic-science.co.uk>).

For scanning electron microscopy, 7-cm-high stems were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer (pH 7.0), dehydrated in successive ethanol series, critical-point dried, sputter-coated with gold-palladium (50 nm) and observed using a Hitachi S450 scanning electron microscope (<http://www.hitachi-hita.com>).

For LM10 immunohistochemistry, samples were treated and observed as previously described (Chávez Montes *et al.*, 2008).

For transient co-localization studies, the delta-TIP:RFP fusion protein was used as a specific fluorescent reporter protein for the tonoplast (Hunter *et al.*, 2007). One-month-old *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with WAT1:GFP and δ-TIP:RFP. Epidermal cells were observed 3 days post-infiltration. For plasma membrane labeling, transgenic Arabidopsis roots were incubated with FM4-64 (Invitrogen) for 15 min at 4°C. Observations were performed with a Leica TCS SP2 AOBs confocal laser-scanning microscope. GFP was excited at 488 nm and detected in the 498–551-nm range. FM4-64 and δ-TIP:RFP were excited at 561 nm and detected in the 610–671- and 571–623-nm range, respectively. No image enhancement was performed.

Microarray analysis

Microarray analysis was performed with the CATMA array containing 24 576 gene-specific tags corresponding to 22 089 genes from Arabidopsis (Crowe *et al.*, 2003; Hilson *et al.*, 2003). RNA was extracted from the basal 5 cm of 20-cm-high stems of Col and *wat1-1* using an RNeasy kit (Qiagen, <http://www.qiagen.com>). Two independent biological comparisons were carried out. For each comparison, one technical replication with fluorochrome reversal was performed. RNA integrity check, cDNA synthesis, hybridization and array scanning were performed as described by Lurin *et al.* (2004). Statistical analysis and identification of differentially expressed genes were as described in Gagnot *et al.* (2007).

Mechanical tests

Loading experiments in tension were carried out on an Instron universal testing machine (Instron Wolpert, <http://www.instron.com>), as described by Spatz *et al.* (1998). The samples were the 3–5 cm basal part of 20-cm-high stems. Basically, stems were subjected to longitudinal tension until they broke. The breaking stress was determined as the level of stress the sample was able to hold at rupture.

Chlorophyll quantification

Chlorophyll *a* and *b* contents were measured spectrophotometrically (absorbance at 664 and 649 nm, respectively) in a 95% ethanol extract from 200 mg fresh weight (FW) of rosette leaves (Lichtenthaler, 1987).

Metabolomic analyses by GC–MS and LC–MS

Bottom parts (between 1 and 10 cm) of 25-cm-high stems were frozen in liquid nitrogen, ground and extracted in 1.5 ml of MeOH/CHCl₃/H₂O (6/4/5), according to the method described in The Golm Metabolome Database (http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/analytic/gmd_prot.html). Five biological replicates were analyzed (except for *wat1-2* GC–MS, in which four were analysed).

GC–MS: 200 µl of the polar phase was freeze-dried (SpeedVac). Derivatisation was performed as described by Fiehn *et al.* (2000; http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/analytic/gmd_prot.html). A 1-µl volume was splitless injected on an HP6890 GC with a Varian FactorFour VF-5ms column, coupled to an HP5973 mass detector. The oven temperature was 70°C for 5 min, then increased by 5°C min⁻¹ to 325°C.

LC–MS: 600 µl of the polar phase was freeze-dried and redissolved in 100 µl of water (1% acetonitril, ACN). A 15-µl volume was injected to a Waters Acquity UPLC[®] with an Acquity UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) column. A two-buffer (A/B) gradient was used. A: 100/1/0.1 H₂O/ACN/ammonium acetate (2 M), pH 5. B: 75/25/1/0.1 ACN/MeOH/H₂O/ammonium acetate. Gradient: 95% A for 0.5 min, decreased to 50% A in 30.0 min. Flow: 200 µl min⁻¹. Column temperature: 40°C. Indolic compounds were integrated at 278 nm. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) coupled the LC to the ion trap LCQ Classic (ThermoQuest, <http://www.thermoscientific.com>; vapour temperature 450°C, capillary temperature 150°C, source current 5 mA, sheath gas 21, aux gas 3, mass range 135–1000 amu).

Quantification of endogenous IAA

Samples were extracted (after adding 50 pg [¹³C₆] IAA/mg fresh weight of sample as an internal standard), and IAA levels were determined by the isotope dilution technique (¹³C₆:¹²C₆ ratios) and gas chromatography-selected reaction monitoring mass spectrometry, described in Edlund *et al.* (1995).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Edouard Pesquet for the essential pioneering *Zinnia* work, Christophe Pineau and Elian Perruc for invaluable tips on handling *Arabidopsis* on a day-to-day basis, Magalie Pichon for assistance with selecting the *wat1* mutant, Patricia Nouvet for having taken care of the seed stocks in the first place, Amélie Fragnière, Catherine Digonnet, Marine Chasseray, Dominique Laressergues, Lise Jouanin (INRA Versailles, France) Catherine Lapierre (INA-PG, France) and Luc Saulnier (INRA Nantes, France) for help with mutant phenotyping, Hélène San Clemente for helping with sequence analysis, Alain Jauneau for microscopy

expertise, the UMR5546 'Services Communs', Kjell Olofsson for technical assistance and Karin Ljung for help with IAA analysis (both Umeå Plant Science Centre, Sweden), Björn Usadel (Max-Planck-Institute, Gölm, Germany) for assistance with functional classification, Hans-Christian Spatz (Institut fuer Biologie III, Freiburg, Germany) for putting the Instron testing machine at our disposal, Christophe Ritzenhaler (IBMP, Strasbourg, France) for advice on the GFP experiments, and the Lorenzo Frigerio laboratory (University of Warwick, UK) for the *Agrobacterium* strain containing the δ-TIP:RFP. The authors are grateful to Zheng-Hua Ye (University of Georgia, USA) and Tom J. Guilfoyle (University of Missouri, USA) for ProFRA3:GUS-, ProFRA8:GUS- and DR5:GUS-transformed seeds, respectively. We would like to acknowledge Génoplatte, FORMAS excellence center FUNCFIBER and the Research Foundation – Flanders (grant number G.0352.05N) for financial support. RV is indebted to the Agency for Innovation by Science and Technology (IWT) for a predoctoral fellowship.

SUPPORTING INFORMATION

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

TAIR annotation spreadsheet.

Figure S1. Alignment at the amino acid level of the *Zinnia elegans* expressed sequence tag DV017571 and its *Arabidopsis* homolog At1g75500.

Figure S2. The WAT1:GFP fusion protein co-localizes with δ-TIP:RFP to the tonoplast in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells.

Figure S3. Phenotypic characteristics of the *wat1* and the complemented *wat1* mutants.

Figure S4. Xylem and fiber cell diameter and wall thickness in wild-type and *wat1-1* stems.

Figure S5. Effect of the *wat1-1* mutation on the expression of ProFRA3:GUS and ProFRA8:GUS.

Figure S6. Acropetal and basipetal auxin transport in wild-type and *wat1-1* stems.

Table S1. Comparative transcriptomics of *wat1-1* stems and the wild type for selected categories of genes discussed in the text.

Table S2. Changes in metabolite composition in *wat1-1* and *wat1-2* stems compared with their respective wild types (Col and Ws).

Table S3. Changes in abundance of indolic compounds in *wat1-1* and *wat1-2* stems compared with their respective wild types (Col and Ws), as determined by UV-absorption at 278 nm.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

REFERENCES

- Aloni, R. (1987) Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**, 179–204.
- Alonso, J.M., Steponova, A.N., Leisse, T.J. *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653–657.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.T., Monties, B., Fritig, B. and Legrand, M. (1995) Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**, 465–477.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **316**, 1194–1199.
- Benjamins, R. and Scheres, B. (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 443–465.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T. and Sundberg, B. (2007) Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood:

- gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J.* **52**, 499–511.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L. and Muday, G.K.** (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 524–535.
- Brown, D.M., Zeef, L.A.H., Ellis, J., Goodacre, R. and Turner, S.R.** (2005) Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell*, **17**, 2281–2295.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H. and Ye, Z.H.** (2001) A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell*, **13**, 807–827.
- Busov, V.B., Johannes, E., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., Spiker, S.L., Lanz-Garcia, C. and Goldfarb, B.** (2004) An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. *Planta*, **218**, 916–927.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S. and Sundberg, B.** (2002) Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiol. Plant.* **114**, 594–600.
- Chávez Montes, R.A., Ranocha, Ph., Martinez, Y. et al.** (2008) Cell wall modifications in *Arabidopsis* plants with altered α -L-arabinofuranosidase activity. *Plant Physiol.* **147**, 63–77.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V. et al.** (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res.* **31**, 156–158.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**, 462–469.
- Daßler, T., Maier, T., Winterhalter, C. and Böck, A.** (2000) Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol. Microbiol.* **36**, 1101–1112.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G. et al.** (2002) Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during trans-differentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 15794–15799.
- Edlund, A., Eklöf, S., Sundberg, B., Moritz, T. and Sandberg, G.** (1995) A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiol.* **108**, 1043–1047.
- Ferguson, D.J. and Krzycki, J.A.** (1997) Reconstruction of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **179**, 846–852.
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L.** (2000) Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 3573–3580.
- Fulton, L.M. and Cobbett, C.S.** (2003) Two α -L-arabinofuranosidase genes in *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during vegetative growth and flower development. *J. Exp. Bot.* **54**, 2467–2477.
- Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Tacconat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A. and Brunaud, V.** (2007) CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res.* **36**(Database issue), D986–D990.
- Gamas, P., Niebel, F.C., Lescure, N. and Cullimore, J.V.** (1996) Use of subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**, 233–242.
- Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J. et al.** (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 14732–14737.
- Hilson, P., Small, I. and Kuiper, M.T.** (2003) European consortia building integrated resources for Arabidopsis functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 426–429.
- Hunter, P.R., Craddock, C.P., Di Benedetto, S., Roberts, L.M. and Frigerio, L.** (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiol.* **145**, 1371–1382.
- Jack, D.L., Yang, N.M. and Saier, M.H. Jr** (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3620–3639.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J. and Bourguignon, J.** (2007) A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 394–412.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Kenney, W.A., Sennerby-Forsse, L. and Layton, P.** (1990) A review of biomass quality research relevant to the use of poplar and willow for energy conversion. *Biomass*, **21**, 163–188.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L.L.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. and Demura, T.** (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* **19**, 1855–1860.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132.
- Lichtenthaler, H.K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods Enzymol.* **148**, 350–382.
- Livshits, V.A., Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V. and Vitushkina, M.V.** (2003) Identification and characterization of the new gene rhtA involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **154**, 123–135.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S. et al.** (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089–2103.
- Marmagne, A., Rouet, M.A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. and Ephritikhine, G.** (2004) Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 675–691.
- McCartney, L., Marcus, S.E. and Knox, J.P.** (2005) Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 543–546.
- Mellerowicz, E.J. and Sundberg, B.** (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 293–300.
- Milioni, D., Sado, P.E., Stacey, N.J., Domingo, C., Roberts, K. and McCann, M.C.** (2001) Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Mol. Biol.* **47**, 221–238.
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Ohme-Takagi, M.** (2007) NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 270–280.
- Morreel, K., Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Goeminne, G., Ralph, S., Messens, E. and Boerjan, W.** (2004) Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant Physiol.* **136**, 3537–3549.
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G.P. and Somerville, C.R.** (2005) Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 8633–8638.
- Pesquet, E., Ranocha, Ph., Legay, S., Digonnet, C., Barbier, O., Pichon, M. and Goffner, D.** (2005) Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol.* **139**, 1821–1839.
- Reisen, D., Marty, F. and Leborgne-Castel, N.** (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biol.* **5**, 13.
- Rouanet, C. and Nasser, W.** (2001) The PecM protein of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*, membrane topology and possible involvement in the efflux of the blue pigment indigoidine. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 309–318.
- Saier, M.H. Jr, Tran, C.V. and Barabote, R.D.** (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* **34**(Database issue), D181–D186.
- Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S. and Martinoia, E.** (2007) Novel tonoplast transporters identified using a proteomic

- approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiol.* **145**, 216–229.
- Spatz, H.-C., Köhler, L. and Speck, T.** (1998) Biomechanics and functional anatomy of hollow stemmed sphenopsids: I. *Equisetum giganteum*. *Am. J. Bot.* **85**, 305–314.
- Sundberg, B. and Uggla, C.** (1998) Origin and dynamics of indoleacetic acid under polar transport in *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.* **104**, 22–29.
- Sundberg, B., Uggla, C. and Tuominen, H.** (2000) Cambial growth and auxin gradients. In *Cell and Molecular Biology of Wood Formation* (Savidge, R., Barnett, J. and Napier, R., eds). Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, pp. 169–188.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K. et al.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164–176.
- Taylor, N.G., Scheible, W.R., Cutler, S., Somerville, C.R. and Turner, S.R.** (1999) The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell*, **11**, 769–780.
- Turner, S.R. and Somerville, C.R.** (1997) Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell*, **9**, 689–701.
- Uggla, C., Mellerowicz, E.J. and Sundberg, B.** (1998) Indole-3-acetic acid controls cambial growth in scots pine by positional signaling. *Plant Physiol.* **117**, 113–121.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963–1971.
- Zhong, R., Burk, D.H., Morrison, W.H. III and Ye, Z.H.** (2004) *FRAGILE FIBER3*, an *Arabidopsis* gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell*, **16**, 3242–3259.
- Zhong, R., Peña, M.J., Zhou, G.K., Nairn, C.J., Wood-Jones, A., Richardson, E.A., Morrison, W.H. III, Darvill, A.G., York, W.S. and Ye, Z.H.** (2005) *Arabidopsis fragile fiber8*, which encodes a putative glucuronyltransferase, is essential for normal secondary wall synthesis. *Plant Cell*, **17**, 3390–3408.
- Zhong, R., Richardson, E.A. and Ye, Z.H.** (2007a) Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta*, **225**, 1603–1611.
- Zhong, R., Richardson, E.A. and Ye, Z.H.** (2007b) The *MYB46* transcription factor is a direct target of *SND1* and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 2776–2792.
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L. and Ye, Z.H.** (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 2763–2782.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621–2632.

Accession number: Expression data from this article were deposited according to 'Minimum information about a microarray experiment' (MIAME) standards in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under accession number GSE10716, and at CATdb (complete Arabidopsis transcriptome database; <http://urgv.evry.inra.fr/CATdb>) under project name 'RS06-04_Noduline-like'.

Full legends for Supporting Information

Figure S1. Alignment at the amino acid level of the *Zinnia elegans* EST DV017571 and its *Arabidopsis* homolog At1g75500.

Z. elegans EST and the amino acid sequence corresponding to At1g75500 were obtained from GenBank (accession numbers DV017571 and NP_565111 respectively). *Z. elegans* EST was translated under its six frames using the Translate tool from the ExPASy website (<http://www.expasy.ch>). “3'5' Frame 1” was the one sharing the highest identity with the amino acid sequence corresponding to At1g75500. The amino acid alignment was generated using ClustalW (v2.0.5) running on the EMBL-EBI website (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) with a Dayhoff comparison matrix. The boxes were drawn using BOXSHADE v3.21 through the EMBnet server (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Identical residues conserved between the two sequences are in black boxes, and similar residues are in gray boxes.

Figure S2. WAT1:GFP fusion protein co-localizes with delta-TIP:RFP to the tonoplast in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells.

Nicotiana benthamiana leaf epidermal cells were co-infiltrated with Agrobacteria containing the WAT1:GFP (green) and the tonoplast marker delta-TIP:RFP (magenta) (Hunter et al., 2007). Chloroplast fluorescence is shown in blue. Cells were analyzed by confocal microscopy. The merged image shows that the WAT1:GFP fusion labels the same membrane as the TIP:RFP fusion, thus confirming WAT1:GFP tonoplast localization.

Empty arrows in (a),(b),(c) and (d) = transvacuolar strand membrane.

cw = cell wall, t = tonoplast, n = nucleus, ch = chloroplast. Scale bars = 5 μ m.

Figure S3. Phenotypic characteristics of the *wat1* and the complemented *wat1* mutant.

(a) Two-month old wild type, *wat1* mutant and complemented *wat1* mutant plants.

(b) to (d) Cross section of the basal part of 20-cm high stems of wild type **(b)**, *wat1* mutant **(c)** and complemented *wat1* mutant **(d)** stained with Wiesner reagent. Bar = 20 μ m.

Figure S4. Xylem and fiber cell diameter and wall thickness in wild type and *wat1-1* stems.

Cell diameter and wall thickness were measured using ImageJ v1.36 software (developed by the National Institutes of Health and available from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) on toluidine blue-stained cross sections of the basal part of 20-cm high stems. 150 interfascicular fiber cells and xylem vessels from 5 wild type and 5 mutant plants were measured.

(a) Secondary wall thickness of xylem vessels in wild type and *wat1-1* plants (mean \pm SD).

(b) Area of xylem vessels in wild type and *wat1-1* plants.

(c) Secondary wall thickness of interfascicular fiber cells in wild type and *wat1-1* plants (mean \pm SD).

(d) Area of interfascicular fiber cells in wild type and *wat1-1* plants.

Figure S5. Effect of the *wat1-1* mutation on the expression of Pro*FRA3*:GUS and Pro*FRA8*:GUS.

(a), (b) Pro*FRA3*:GUS line.

(a) and **(b)** Cross section of the bottom part of a 20-cm high stem in the wild type **(a)** and the *wat1-1* **(b)** background.

(c), (d) Pro*FRA8*:GUS line.

(c) and **(d)** Cross section of the bottom part of a 20-cm high stem in the wild type **(c)** and the *wat1-1* **(d)** background.

if, interfascicular fibers; x, xylem.

Figure S6. Acropetal and basipetal auxin transport in wild type and *wat1-1* stems.

Auxin transport assays were performed on 20-cm high stems, as described in Dai et al (2006), with slight modifications. Basically, one end of 2.5-cm long stem segments (either upside or downside down) was submerged in 30 μ l of buffer (5 mM MES, 1% sucrose, pH 5.5, 200 nM of [³H] IAA, 1.35 μ M IAA) at room temperature in the dark. After 24h, the 5-mm portion of the non submerged end was removed and placed in 4 ml of scintillation fluid in 6 ml scintillation vials for 24h in the dark. Radioactivity was then measured for 10 minutes on a Packard 1900TR liquid scintillation analyzer (Meriden, CT, USA). Data are mean +/- SD, n = 10 biological replicates.

(a) Acropetal and **(b)** basipetal IAA transport in wild type and *wat1-1* stems.

Table S1. Comparative transcriptomics of *wat1-1* stems and wild type for selected categories of genes discussed in the text.

CAZy = genes in the carbohydrate-active enzyme database (Cantarel et al., 2008). The cell wall non CAZy category was established manually in a literature-based manner.

Table S2. Changes in metabolite composition in *wat1-1* and *wat1-2* stems as compared to their respective wild types (Col and Ws).

Table S3. Changes in abundance of indolic compounds in *wat1-1* and *wat1-2* stems as compared to their respective wild types (Col and Ws) as determined by UV-absorption at 278 nm.

References

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. (2008) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**(Database issue), D233–D238.

Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mou, Z. and Li, J. (2006) Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *Plant Cell*, **18**, 308–320.


```

At1g75500      1  MADNTDNRRSLWGVPEKIQLHIAMLTILQFGYAGFHVVSRAALNMGISKLVFPVYRNITIAL
DV017571      1  -----EVQLHLAMLALQFGYAGFHVVSRAALNMGISKIVFPVYRNILAF

At1g75500     61  ILLLPFAYFLEKKERPAITLNFLIQFFFLALIGITANQGFYLLGLDNTSPTFASSMQNSV
DV017571     45  ILLLPFAYFLEKKERPPITLNFLIQFFLLAIVGITANQGFYLLGLDNTSPTFASAIQNSV

At1g75500    121  PAITFLMAAILRIEKVRINRRDGISKILGTALCVAGASVITLYKGPTIYTPASHLHAHLL
DV017571    105  PAITFLMAAILRIEKVRLDRKDGLAKVFGTLFCIAGASVITL-----

At1g75500    181  TTNSAVLAPLGNAAAPKNWTLGCIYLIGHCLSWGVLVFPVLSYPARLSVTSYTCFFG
DV017571    -----

At1g75500    241  IIQFLIIA AFCERDSQAWVFHSGWELFTILYAGIVASGIAFAVQIWCIDRGGPVFVAVYQ
DV017571    -----

At1g75500    301  PVQTLVVAIMASIALGEEFYLGGIIGAVLIIAGLYFVLYGKSEERKFAALEKAAIQSSAE
DV017571    -----

At1g75500    361  HGIERAPVSRNSIKSSITPLLHQSTDNV
DV017571    -----

```

Figure S1. Alignment at the amino acid level of the *Zinnia elegans* EST DV017571 and its *Arabidopsis* homolog At1g75500.

Z. elegans EST and the amino acid sequence corresponding to At1g75500 were obtained from GenBank (accession numbers DV017571 and NP_565111 respectively). *Z. elegans* EST was translated under its six frames using the Translate tool from the ExPASy website (<http://www.expasy.ch>). “3'5' Frame 1” was the one sharing the highest identity with the amino acid sequence corresponding to At1g75500. The amino acid alignment was generated using ClustalW (v2.0.5) running on the EMBL-EBI website (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) with a Dayhoff comparison matrix. The boxes were drawn using BOXSHADE v3.21 through the EMBnet server (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Identical residues conserved between the two sequences are in black boxes, and similar residues are in gray boxes.

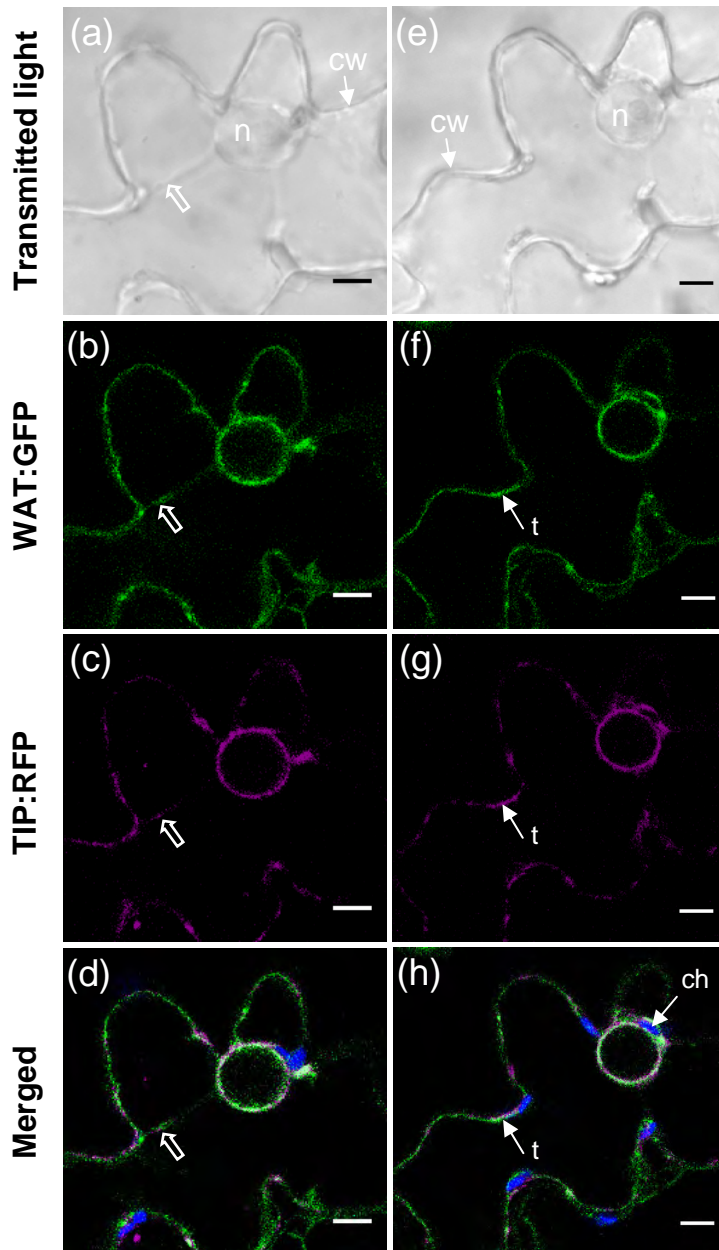


Figure S2. WAT1:GFP fusion protein co-localizes with delta-TIP:RFP to the tonoplast in *Nicotiana benthamiana* epidermal cells.

Nicotiana benthamiana leaf epidermal cells were co-infiltrated with *Agrobacterium* containing the WAT1:GFP (green) and the tonoplast marker delta-TIP:RFP (magenta) (Hunter et al., 2007). Chloroplast fluorescence is shown in blue. Cells were analyzed by confocal microscopy. The merged image shows that the WAT1:GFP fusion labels the same membrane as the TIP:RFP fusion, thus confirming WAT1:GFP tonoplast localization.

Empty arrows in (a),(b),(c) and (d) = transvacuolar strand membrane.

cw = cell wall, t = tonoplast, n = nucleus, ch = chloroplast. Scale bars = 5 μ m.



Figure S3. Phenotypic characteristics of the *wat1* and the complemented *wat1* mutant. **(a)** Two-month old wild type, *wat1* mutant and complemented *wat1* mutant plants. **(b) to (d)** Cross section of the basal part of 20-cm high stems of wild type (b), *wat1* mutant (c) and complemented *wat1* mutant (d) stained with Wiesner reagent. Bar = 20 μ m.

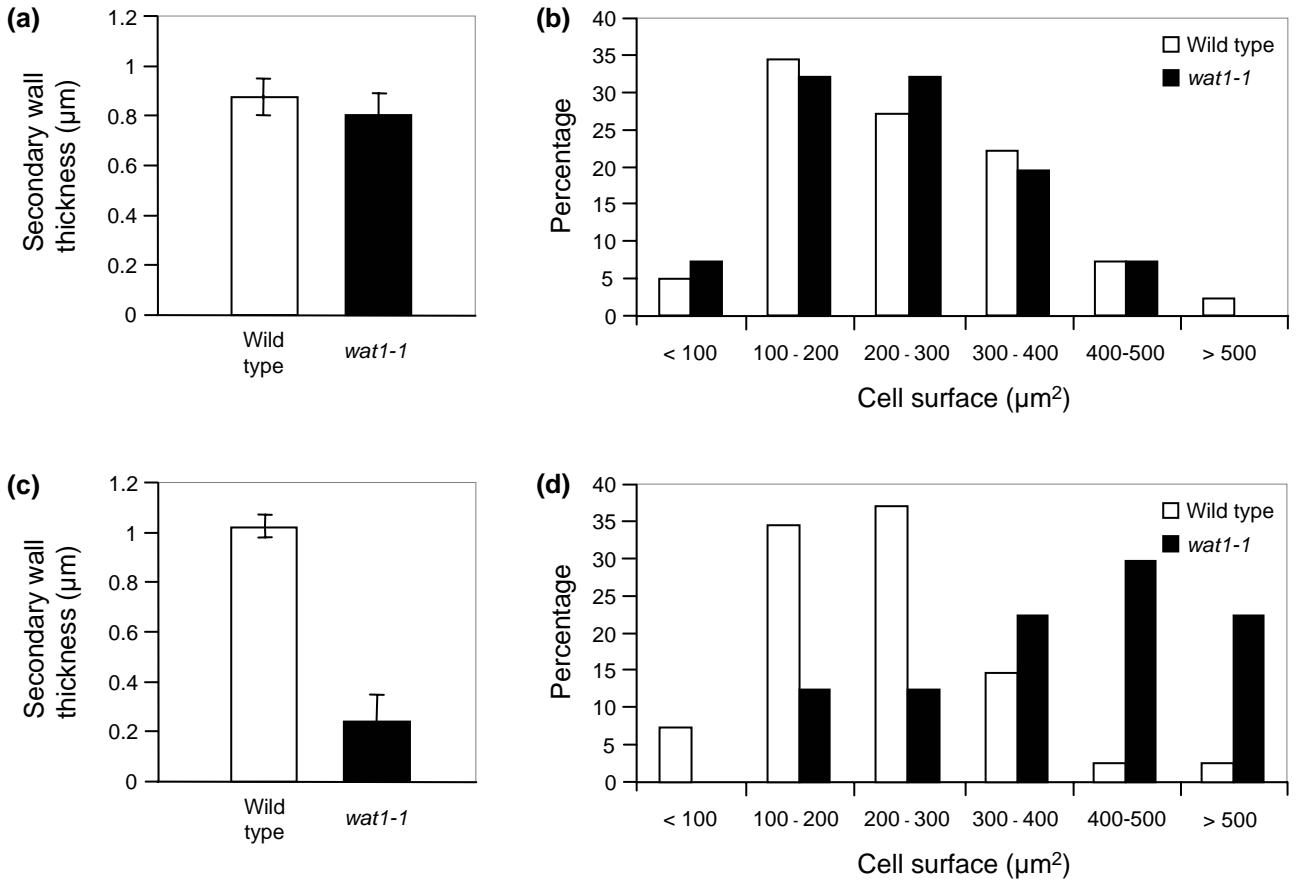


Figure S4. Xylem and fiber cell diameter and wall thickness in wild type and *wat1-1* stems.

Cell diameter and wall thickness were measured using ImageJ v1.36 software (developed by the National Institutes of Health and available from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) on toluidine blue-stained cross sections of the basal part of 20-cm high stems. 150 interfascicular fiber cells and xylem vessels from 5 wild type and 5 mutant plants were measured.

- (a)** Secondary wall thickness of xylem vessels in wild type and *wat1-1* plants (mean ± SD).
- (b)** Area of xylem vessels in wild type and *wat1-1* plants.
- (c)** Secondary wall thickness of interfascicular fiber cells in wild type and *wat1-1* plants (mean ± SD).
- (d)** Area of interfascicular fiber cells in wild type and *wat1-1* plants.

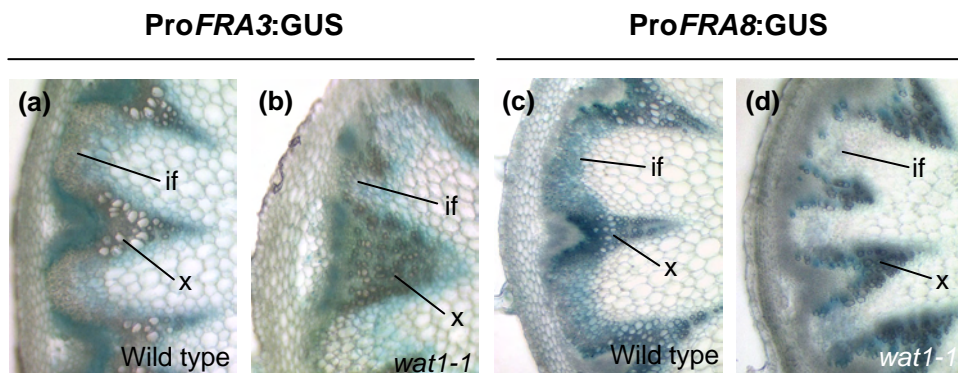


Figure S5. Effect of the *wat1-1* mutation on the expression of ProFRA3:GUS and ProFRA8:GUS.

(a), (b) ProFRA3:GUS line.

(a) and **(b)** Cross section of the bottom part of a 20-cm high stem in the wild type **(a)** and the *wat1-1* **(b)** background.

(c), (d) ProFRA8:GUS line.

(c) and **(d)** Cross section of the bottom part of a 20-cm high stem in the wild type **(c)** and the *wat1-1* **(d)** background.

if, interfascicular fibers; x, xylem.

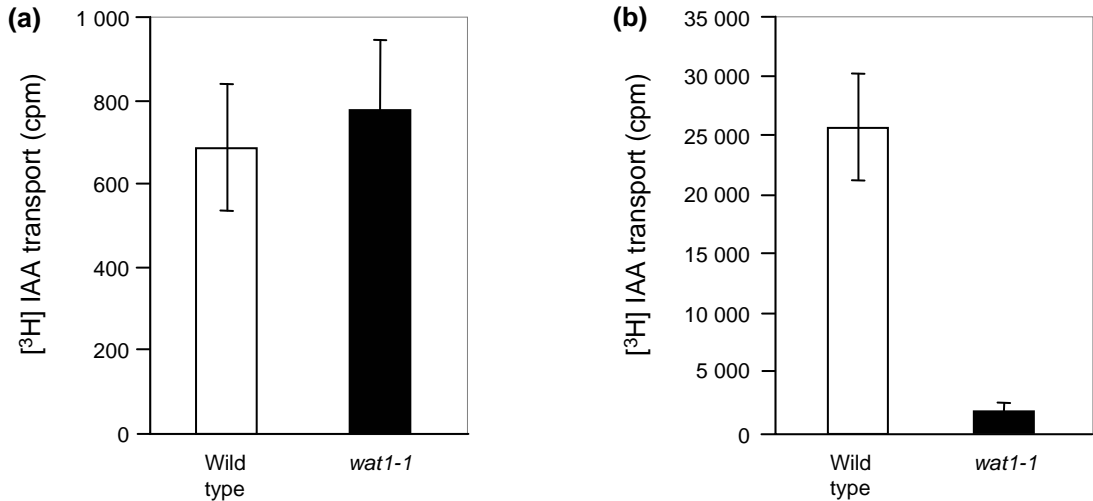


Figure S6. Acropetal and basipetal auxin transport in wild type and *wat1-1* stems.

Auxin transport assays were performed on 20-cm high stems, as described in Dai et al (2006), with slight modifications. Basically, one end of 2.5-cm long stem segments (either upside or downside down) was submerged in 30 μ l of buffer (5 mM MES, 1% sucrose, pH 5.5, 200 nM of [3H] IAA, 1.35 μ M IAA) at room temperature in the dark. After 24h, the 5-mm portion of the non submerged end was removed and placed in 4 ml of scintillation fluid in 6 ml scintillation vials for 24h in the dark. Radioactivity was then measured for 10 minutes on a Packard 1900TR liquid scintillation analyzer (Meriden, CT, USA). Data are mean \pm SD, n = 10 biological replicates.

(a) Acropetal and **(b)** basipetal IAA transport in wild type and *wat1-1* stems.

Table S1. Comparative transcriptomics of *wat1-1* stems and wild type for selected categories discussed in the text. CAZy = genes in the carbohydrate-active enzyme database (Cantarel et al., 2008). The cell wall non CAZy category was established manually in a literature-based manner.

Category	AGI gene ID	Annotated function	log2 ratio	P value
CAZy	AT3G18660	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	-4.62	0.00E+0
	AT1G04680	pectate lyase family protein	-4.45	0.00E+0
	AT4G24780	pectate lyase family protein	-3.84	0.00E+0
	AT2G37090	glycosyl transferase family 43 protein, IRREGULAR XYLEM 9 (IRX9)	-3.76	0.00E+0
	AT3G16920	glycoside hydrolase family 19 protein	-3.69	0.00E+0
	AT5G26000	glycosyl hydrolase family 1 protein	-3.65	0.00E+0
	AT1G19300	glycosyl transferase family 8 protein	-3.59	0.00E+0
	AT5G44030	cellulose synthase, catalytic subunit (CESA4), IRREGULAR XYLEM 5 (IRX5)	-3.54	0.00E+0
	AT1G67750	pectate lyase family protein	-2.85	0.00E+0
	AT1G80170	polygalacturonase, putative / pectinase, putative	-2.80	0.00E+0
	AT5G17420	cellulose synthase, catalytic subunit (CESA7), IRREGULAR XYLEM 3 (IRX3)	-2.74	0.00E+0
	AT1G05850	chitinase-like protein 1 (CTL1)	-2.49	0.00E+0
	AT1G64390	endo-1,4-beta-glucanase, putative / cellulase, putative	-2.28	0.00E+0
	AT1G19940	glycosyl hydrolase family 9 protein	-2.27	0.00E+0
	AT4G18780	cellulose synthase, catalytic subunit (CESA8), IRREGULAR XYLEM 1 (IRX1)	-2.22	0.00E+0
	AT1G53840	pectinesterase family protein	-2.09	0.00E+0
	AT1G26810	galactosyltransferase family protein	-2.05	0.00E+0
	AT2G36870	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative	-2.01	0.00E+0
	AT1G58370	glycosyl hydrolase family 10 protein / carbohydrate-binding domain-containing protein	-1.96	0.00E+0
	AT4G33330	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	-1.94	0.00E+0
	AT2G28110	glycoside transferase family 47 protein, FRAGILE FIBER 8 (FRA8)	-1.93	0.00E+0
	AT4G02290	glycosyl hydrolase family 9 protein	-1.79	0.00E+0
	AT5G03760	glycosyl transferase family 2 protein	-1.74	0.00E+0
	AT2G20680	glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family protein	-1.67	0.00E+0
	AT3G06770	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	-1.65	0.00E+0
	AT3G18080	glycosyl hydrolase family 1 protein	-1.60	0.00E+0
	AT1G05170	galactosyltransferase family protein	-1.54	0.00E+0
	AT5G63840	alpha-glucosidase, putative	-1.47	0.00E+0
	AT2G05790	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1.41	0.00E+0
	AT1G45130	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	-1.36	0.00E+0
	AT3G59010	pectinesterase family protein	-1.34	0.00E+0
	AT1G05310	pectinesterase family protein	-1.33	0.00E+0
	AT1G64760	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1.32	0.00E+0
	AT1G26450	beta-1,3-glucanase-related	-1.32	0.00E+0
	AT3G62720	galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein	-1.28	1.12E-11
	AT5G42720	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1.24	8.37E-11
	AT3G62110	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	-1.23	1.51E-10
	AT1G53290	galactosyltransferase family protein	-1.22	2.73E-10
	AT1G75680	glycosyl hydrolase family 9 protein	-1.22	3.51E-10
	AT4G39350	cellulose synthase, catalytic subunit (Ath-A)	-1.21	4.96E-10
	AT2G16790	shikimate kinase family protein	-1.20	9.20E-10
	AT1G32170	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative (XTR4)	-1.19	1.14E-9
	AT5G05170	cellulose synthase, catalytic subunit (Ath-B)	-1.17	3.20E-9
	AT4G03340	glycosyltransferase family 14 protein / core-2/l-branching enzyme family protein	-1.16	4.12E-9
	AT3G07320	glycosyl hydrolase family 17 protein	-1.16	4.62E-9
	AT4G14130	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative (XTR7)	-1.15	7.29E-9
	AT1G72990	glycosyl hydrolase family 35 protein	-1.14	1.06E-8
	AT3G60130	glycosyl hydrolase family 1 protein / beta-glucosidase, putative (YLS1)	-1.10	9.57E-8
	AT5G09760	pectinesterase family protein	-1.08	1.64E-7
	AT4G13710	pectate lyase family protein	-1.08	2.05E-7
AT3G42950	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	-1.06	4.25E-7	
AT5G49720	endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR) / cellulase (OR16pep)	-1.03	1.71E-6	

	AT1G73370	sucrose synthase, putative / sucrose-UDP glucosyltransferase, putative	-0,98	1,41E-5
	AT5G22740	glycosyl transferase family 2 protein	-0,97	1,81E-5
	AT1G24070	glycosyl transferase family 2 protein	-0,96	2,62E-5
	AT2G43050	pectinesterase family protein	-0,96	2,67E-5
	AT3G29630	glycosyltransferase family protein	-0,93	8,29E-5
	AT1G30530	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0,93	1,13E-4
	AT2G37585	glycosyltransferase family 14 protein / core-2/l-branching enzyme family protein	-0,90	2,96E-4
	AT2G30150	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0,86	1,52E-3
	AT3G49880	glycosyl hydrolase family protein 43	-0,84	2,43E-3
	AT4G17770	glycosyl transferase family 20 protein / trehalose-phosphatase family protein	-0,77	2,81E-2
	AT1G26560	glycosyl hydrolase family 1 protein	0,94	5,73E-5
	AT5G24090	acidic endochitinase (CHIB1)	1,08	2,25E-7
	AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,12	2,84E-8
	AT3G15720	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	1,14	1,16E-8
	AT3G57260	glycosyl hydrolase family 17 protein	1,20	6,36E-10
	AT5G20950	glycosyl hydrolase family 3 protein	1,31	0,00E+0
	AT2G44490	glycosyl hydrolase family 1 protein	1,34	0,00E+0
	AT4G02280	sucrose synthase, putative / sucrose-UDP glucosyltransferase, putative	2,09	0,00E+0
	AT4G24040	glycosyl hydrolase family protein 37 / trehalase, putative	2,45	0,00E+0
Cell wall (non CAZy)	AT2G03090	expansin, putative (EXP15)	-4,24	0,00E+0
	AT5G60490	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA12)	-3,64	0,00E+0
	AT5G15630	phytochelatin synthetase family protein / COBRA cell expansion protein COBL4	-3,48	0,00E+0
	AT3G12440	extensin family protein	-3,26	0,00E+0
	AT4G28250	beta-expansin, putative (EXPB3)	-3,24	0,00E+0
	AT3G13520	arabinogalactan-protein (AGP12)	-2,51	0,00E+0
	AT2G14890	arabinogalactan-protein (AGP9)	-2,46	0,00E+0
	AT2G04780	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA7)	-2,41	0,00E+0
	AT1G26770	expansin, putative (EXP10)	-2,13	0,00E+0
	AT4G12730	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA2)	-1,87	0,00E+0
	AT2G28950	expansin, putative (EXP6)	-1,62	0,00E+0
	AT3G55500	expansin, putative (EXP16)	-1,56	0,00E+0
	AT2G45470	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA8)	-1,47	0,00E+0
	AT3G45960	expansin family protein (EXPL3)	-1,36	0,00E+0
	AT1G68725	arabinogalactan-protein, putative (AGP19)	-1,26	3,35E-11
	AT5G11740	arabinogalactan-protein (AGP15)	-1,19	1,22E-9
	AT1G18980	germin-like protein, putative	-1,16	6,06E-9
	AT1G04660	glycine-rich protein	-1,11	4,37E-8
	AT2G34670	proline-rich family protein	-0,99	7,64E-6
	AT5G60920	phytochelatin synthetase, putative / COBRA cell expansion protein COB, putative	-0,96	2,73E-5
	AT5G39190	germin-like protein (GER2)	-0,89	3,66E-4
	AT2G05380	glycine-rich protein (GRP3S)	0,79	1,47E-2
	AT2G05440	glycine-rich protein	0,99	8,02E-6
	AT5G58210	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	1,18	2,01E-9
	AT5G02260	expansin, putative (EXP9)	1,31	0,00E+0
	AT5G61660	glycine-rich protein	1,42	0,00E+0
	AT4G30450	glycine-rich protein	1,89	0,00E+0
	AT2G05540	glycine-rich protein	2,00	0,00E+0
Lignin/aromatic compound metabolism	AT2G38080	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-4,41	0,00E+0
	AT2G29130	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-4,32	0,00E+0
	AT1G75280	isoflavone reductase, putative	-4,15	0,00E+0
	AT5G05390	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-3,02	0,00E+0
	AT5G60020	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-3,02	0,00E+0
	AT4G26220	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	-2,50	0,00E+0
	AT5G54160	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-2,39	0,00E+0
	AT2G37040	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)	-2,39	0,00E+0
	AT5G03260	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-2,34	0,00E+0
	AT2G40890	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-2,29	0,00E+0
	AT3G19450	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD2)	-2,03	0,00E+0
	AT2G30490	trans-cinnamate 4-monooxygenase / cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) (CA4H) / cytochrome P450 73 (CYP73) (CYP73A5)	-1,71	0,00E+0
	AT1G58170	disease resistance-responsive protein-related / dirigent protein-related	-1,60	0,00E+0
	AT2G38390	peroxidase, putative	-1,34	0,00E+0
	AT5G01190	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-1,25	7,81E-11
	AT4G36220	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (F5H1)	-1,20	9,37E-10

	AT4G15093	catalytic LigB subunit of aromatic ring-opening dioxygenase family	-1,19	1,10E-9
	AT1G51680	4-coumarate-CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-1,10	8,41E-8
	AT5G64120	peroxidase, putative	-1,08	1,93E-7
	AT5G04230	phenylalanine ammonia-lyase 3 (PAL3)	-1,06	4,65E-7
	AT5G05270	chalcone-flavanone isomerase family protein	-1,03	1,92E-6
	AT3G21770	peroxidase 30 (PER30) (P30) (PRXR9)	-1,01	4,47E-6
	AT4G21960	peroxidase 42 (PER42) (P42) (PRXR1)	-1,00	5,49E-6
	AT1G20510	4-coumarate-CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-0,97	2,05E-6
	AT1G15950	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-0,95	3,73E-5
	AT5G58390	peroxidase, putative	-0,90	2,53E-4
	AT1G52750	hydrolase, alpha/beta fold family protein	-0,86	1,43E-3
	AT3G61990	O-methyltransferase family 3 protein	1,02	2,81E-6
	AT5G24530	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	1,06	4,08E-7
	AT2G22980	serine carboxypeptidase S10 family protein	1,30	5,58E-12
	AT2G37130	peroxidase 21 (PER21) (P21) (PRXR5)	1,97	0,00E+0
Nodulin21 family	AT1G75500	nodulin MtN21 family protein	-4,15	0,00E+0
	AT3G45870	integral membrane family protein / nodulin MtN21-related	-3,06	0,00E+0
	AT2G37460	nodulin MtN21 family protein	-1,85	0,00E+0
	AT1G44800	nodulin MtN21 family protein	-1,76	0,00E+0
	AT4G08300	nodulin MtN21 family protein	-1,55	0,00E+0
	AT1G01070	nodulin MtN21 family protein	-1,15	6,68E-9
	AT4G01450	nodulin MtN21 family protein	-0,91	1,92E-4
Auxin related	AT3G25290	auxin-responsive family protein	-3,04	0,00E+0
	AT2G21050	amino acid permease, putative	-2,78	0,00E+0
	AT3G15540	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 19 (IAA19)	-2,41	0,00E+0
	AT2G04850	auxin-responsive protein-related	-2,24	0,00E+0
	AT4G29080	auxin-responsive AUX/IAA family protein	-2,00	0,00E+0
	AT5G65670	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	-1,82	0,00E+0
	AT4G32810	dioxygenase-related	-1,79	0,00E+0
	AT2G38120	amino acid permease, putative (AUX1)	-1,47	0,00E+0
	AT5G53590	auxin-responsive family protein	-1,46	0,00E+0
	AT4G28640	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 11 (IAA11)	-1,38	0,00E+0
	AT4G12980	auxin-responsive protein, putative	-1,27	2,79E-11
	AT1G75590	auxin-responsive family protein	-1,20	7,58E-10
	AT5G47530	auxin-responsive protein, putative	-1,14	1,52E-8
	AT4G14550	auxin-responsive AUX/IAA family protein	-1,04	1,17E-6
	AT3G23050	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 7 (IAA7)	-0,90	2,82E-4
	AT2G45210	auxin-responsive protein-related	0,80	1,04E-2
	AT2G46690	auxin-responsive family protein	1,04	1,20E-6
	AT5G25890	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	1,44	0,00E+0
	AT4G03400	auxin-responsive GH3 family protein	1,83	0,00E+0
	AT3G44300	nitrilase 2 (NIT2)	2,87	0,00E+0
Transcription factors	AT1G63910	myb family transcription factor (MYB103)	-3,56	0,00E+0
	AT1G62990	homeodomain transcription factor (KNAT7)	-2,99	0,00E+0
	AT4G23550	WRKY family transcription factor	-2,95	0,00E+0
	AT5G54490	calcium-binding EF-hand protein, putative	-2,70	0,00E+0
	AT1G32770	secondary wall-associated NAC domain protein 1 (SND1)	-2,57	0,00E+0
	AT3G51325	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-2,57	0,00E+0
	AT1G79180	myb family transcription factor (MYB63)	-2,55	0,00E+0
	AT5G07690	myb family transcription factor (MYB29)	-2,15	0,00E+0
	AT4G28500	secondary wall-associated NAC domain protein 2 (SND2)	-2,07	0,00E+0
	AT5G54680	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1,89	0,00E+0
	AT1G68360	zinc finger protein-related	-1,87	0,00E+0
	AT3G55980	zinc finger (CCCH-type) family protein	-1,84	0,00E+0
	AT5G45290	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1,82	0,00E+0
	AT3G46620	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1,77	0,00E+0
	AT5G26660	myb family transcription factor (MYB4) (MYB86)	-1,76	0,00E+0
	AT3G50060	myb family transcription factor	-1,70	0,00E+0
	AT4G26580	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1,70	0,00E+0
	AT1G66230	myb family transcription factor (MYB20)	-1,62	0,00E+0
	AT3G61910	NAC secondary wall thickening promoting factor2 (NST2)	-1,55	0,00E+0
	AT2G44745	WRKY family transcription factor	-1,52	0,00E+0
	AT5G12870	myb family transcription factor (MYB46)	-1,48	0,00E+0
	AT2G44840	ethylene-responsive element-binding protein, putative	-1,47	0,00E+0
	AT1G72220	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1,45	0,00E+0
	AT5G47370	homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2) / HD-ZIP protein 2	-1,43	0,00E+0

AT5G47230	ethylene-responsive element-binding factor 5 (ERF5)	-1.42	0.00E+0	
AT3G43430	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1.36	0.00E+0	
AT1G69780	homeobox-leucine zipper protein 13 (HB-13) / HD-ZIP transcription factor 13	-1.35	0.00E+0	
AT4G40060	homeobox-leucine zipper protein 16 (HB-16) / HD-ZIP transcription factor 16	-1.32	0.00E+0	
AT1G20823	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1.30	5.58E-12	
AT4G36540	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1.30	5.58E-12	
AT1G09540	myb family transcription factor (MYB61)	-1.29	1.12E-11	
AT1G68810	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1.25	6.13E-11	
AT5G41400	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1.20	6.58E-10	
AT5G25190	ethylene-responsive element-binding protein, putative	-1.19	1.00E-9	
AT5G55970	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1.12	2.69E-8	
AT1G17950	myb family transcription factor (MYB52)	-1.09	1.33E-7	
AT3G25710	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	-1.08	1.88E-7	
AT1G75390	bZIP transcription factor family protein	-1.08	2.03E-7	
AT4G24540	MADS-box family protein	-1.05	7.10E-7	
AT4G22680	myb family transcription factor (MYB85)	-1.05	7.49E-7	
AT5G65310	homeobox-leucine zipper protein 5 (HB-5) / HD-ZIP transcription factor 5	-1.04	1.31E-6	
AT4G25230	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-1.02	3.03E-6	
AT4G38620	myb family transcription factor (MYB4)	-1.00	5.36E-6	
AT1G67030	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZFP6)	-0.99	9.71E-6	
AT1G12260	no apical meristem (NAM) family protein	-0.96	3.25E-6	
AT3G16280	AP2 domain-containing transcription factor TINY, putative	-0.95	4.79E-6	
AT5G05790	myb family transcription factor	-0.94	5.76E-6	
AT5G20885	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-0.91	2.12E-4	
AT1G69580	myb family transcription factor	-0.88	6.11E-4	
AT1G04990	zinc finger (CCCH-type) family protein	-0.87	9.76E-4	
AT3G15680	zinc finger (Ran-binding) family protein	-0.85	2.16E-3	
AT2G18160	bZIP transcription factor family protein	-0.83	3.63E-3	
AT2G46770	NAC secondary wall thickening promoting factor1 (NST1)	-0.82	4.51E-3	
AT1G62700	no apical meristem (NAM) family protein	-0.81	7.69E-3	
AT2G20650	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-0.79	1.54E-2	
AT1G72360	ethylene-responsive element-binding protein, putative	0.83	3.84E-3	
AT1G03770	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.85	1.77E-3	
AT2G31370	bZIP transcription factor (POSF21)	0.88	6.30E-4	
AT1G68520	zinc finger (B-box type) family protein	0.91	2.06E-4	
AT3G11280	myb family transcription factor	0.92	1.25E-4	
AT1G06180	myb family transcription factor	0.93	8.48E-5	
AT4G02220	zinc finger (MYND type) family protein / programmed cell death 2 C-terminal domain-containing protein	0.99	1.00E-5	
AT3G14230	AP2 domain-containing protein RAP2.2 (RAP2.2)	1.00	5.00E-6	
AT3G25890	AP2 domain-containing transcription factor, putative	1.01	3.31E-6	
AT3G18773	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	1.02	2.24E-6	
AT4G00940	Dof-type zinc finger domain-containing protein	1.10	8.65E-6	
AT1G43160	AP2 domain-containing protein RAP2.6 (RAP2.6)	1.11	6.31E-6	
AT5G41410	homeodomain protein (BEL1)	1.13	1.77E-6	
AT5G57520	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZFP2)	1.14	1.41E-6	
AT1G01010	no apical meristem (NAM) family protein	1.15	8.15E-9	
AT5G08139	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	1.17	3.10E-9	
AT5G67480	TAZ zinc finger family protein / BTB/POZ domain-containing protein	1.19	1.33E-9	
AT3G51960	bZIP family transcription factor	1.23	2.06E-10	
AT5G37260	myb family transcription factor	1.24	1.00E-10	
AT2G30250	WRKY family transcription factor	1.39	0.00E+0	
AT3G50260	AP2 domain-containing transcription factor, putative	1.42	0.00E+0	
AT1G48000	myb family transcription factor	1.49	0.00E+0	
AT1G72830	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) family protein	1.50	0.00E+0	
AT3G46130	myb family transcription factor (MYB48)	1.58	0.00E+0	
AT1G50420	scarecrow-like transcription factor 3 (SCL3)	1.61	0.00E+0	
AT5G61590	AP2 domain-containing transcription factor family protein	1.75	0.00E+0	
AT3G01970	WRKY family transcription factor	1.76	0.00E+0	
AT5G13080	WRKY family transcription factor	1.83	0.00E+0	
AT1G36060	AP2 domain-containing transcription factor, putative	1.88	0.00E+0	
AT5G59780	myb family transcription factor (MYB59)	2.24	0.00E+0	
AT2G46680	homeobox-leucine zipper protein 7 (HB-7) / HD-ZIP transcription factor 7	2.30	0.00E+0	
AT1G69600	zinc finger homeobox family protein / ZF-HD homeobox family protein	2.42	0.00E+0	
AT3G04070	no apical meristem (NAM) family protein	2.78	0.00E+0	
AT5G13330	AP2 domain-containing transcription factor family protein	2.87	0.00E+0	
AT1G52890	no apical meristem (NAM) family protein	3.48	0.00E+0	
Miscellaneous	AT5G23860	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	-3.56	0.00E+0
	AT5G12250	tubulin beta-6 chain (TUB6)	-2.67	0.00E+0
	AT1G04820	tubulin alpha-2/alpha-4 chain (TUA4)	-2.04	0.00E+0
	AT1G47670	amino acid transporter family protein	-1.32	0.00E+0

AT5G09220	amino acid permease 2 (AAP2)	-1,16	4,29E-9
AT1G49240	actin 8 (ACT8)	-1,14	1,12E-8
AT1G31820	amino acid permease family protein	1,07	3,86E-7
AT1G08230	amino acid transporter family protein	1,73	0,00E+0
AT5G49630	amino acid permease 6 (AAP6)	2,12	0,00E+0
AT1G77380	amino acid carrier, putative / amino acid permease, putative	2,67	0,00E+0

Table S2. Changes in metabolite composition in *wat1-1* and *wat1-2* stems as compared to their respective wild types (Col and Ws).

Method	RT ^a	m/z ^b	Metabolite ^c	Peak area (arbitrary units, average \pm SD) ^d			
				Col	<i>wat1-1</i>	Ws	<i>wat1-2</i>
LC-MS	3.90	164	Phenylalanine	53.8 \pm 14.0	110.3 \pm 50.2*	74.3 \pm 31.3	178.7 \pm 90.5
	5.27	203	Tryptophan	350.4 \pm 162.0	73.1 \pm 73.3*	243.3 \pm 80.6	188.2 \pm 47.1
	9.30	385	Sinapoyl glucose	34.0 \pm 15.3	50.2 \pm 34.4	71.3 \pm 19.4	186.4 \pm 60.1*
	10.17	367	Glc-Glc-Rha-Kaempferol	247.0 \pm 70.0	937.1 \pm 142.8**	255.8 \pm 95.5	875.8 \pm 55.9**
	11.20	609	Glc-Rha-Quercitin	11.0 \pm 15.1	130.7 \pm 54.9*	2.5 \pm 1.8	173.6 \pm 96.4
	11.50	301	Quercitin	15.8 \pm 13.4	51.6 \pm 10.0*	1.6 \pm 0.7	19.7 \pm 6.0**
	11.88	176	Sinapyl alcohol	26.6 \pm 8.4	1.5 \pm 0.9**	32.1 \pm 12.5	1.9 \pm 1.5*
	12.68	431	Glc-Rha-Kaempferol	154.6 \pm 42.7	929.3 \pm 269.2**	163.4 \pm 76.0	1667.1 \pm 588.3**
	13.10	623	Glc-Rha-Isorhamnetin	6.0 \pm 5.6	90.1 \pm 47.8*	3.4 \pm 2.4	115.9 \pm 65.9
	13.70	579	G(8-5)G glucoside	20.6 \pm 8.4	44.1 \pm 13.9*	76.9 \pm 38.7	113.6 \pm 72.6
	13.95	581	Reduced G(8-5)G glucoside	18.0 \pm 6.3	35.7 \pm 9.2*	45.3 \pm 12.1	92.9 \pm 42.8
	14.38	285	Rha-Rha-Kaempferol	399.6 \pm 139.3	5947.9 \pm 2102.3**	511.5 \pm 271.6	12411.9 \pm 2349.3**
	18.27	555	Trilignol 1	22.2 \pm 9.0	6.6 \pm 3.5*	18.1 \pm 8.2	8.0 \pm 5.6
	18.43	387	S(8-5)G	34.5 \pm 10.5	1.5 \pm 0.9**	55.3 \pm 20.6	7.7 \pm 13.0*
	18.62	555	Trilignol 2	14.6 \pm 6.3	3.6 \pm 2.9*	13.1 \pm 4.6	3.4 \pm 3.5*
	18.65	553	G(t8-O-4)G(8-5)G	11.8 \pm 5.2	2.3 \pm 1.8*	20.1 \pm 5.7	7.5 \pm 6.4*
	18.70	339	G(8-5)G	24.3 \pm 12.3	1.5 \pm 0.9*	40.5 \pm 17.0	8.0 \pm 9.8*
	20.65	584	G(8-O-4)S(8-5)G	11.5 \pm 5.7	1.5 \pm 0.9*	25.0 \pm 15.2	3.7 \pm 4.0
	GC-MS	17.62	73	Threonine	38393.2 \pm 9973.4	12865.8 \pm 7356.4*	46545.5 \pm 28764.5
18.49		189	Glyceric acid	344.5 \pm 151.8	228.9 \pm 120.1	758.6 \pm 87.3	131.8 \pm 147.3**
29.8		255	Shikimic acid	732.3 \pm 260.1	93.9 \pm 64.4*	856.2 \pm 158.8	133.6 \pm 49.7**
35.26		354	Sinapyl alcohol	309.3 \pm 23.6	35.4 \pm 24.6**	263.5 \pm 114.4	84.9 \pm 72.3
45.87		204	Maltose	1246.6 \pm 87.8	159.1 \pm 202.2**	588.5 \pm 442.7	535.2 \pm 152.1
49.11		204	Galactinol	24802.4 \pm 2527.7	10183.2 \pm 1990.7**	17014.1 \pm 1643.7	6327.7 \pm 763.4**

^a Retention time (in min).

^b Mass-to-charge ratio.

^c For nomenclature of lignan and mono/oligolignols, G and S are used for guaiacyl and syringyl units, to name the units from coupling reactions of coniferyl and sinapyl alcohol. The interunit bond formed during the radical coupling reaction is specified in parentheses (Morreel et al., 2004, for the complete reference see the article). G(8-5)G glucoside is also known as dehydrodiconiferylalcohol glucoside (DCG).

^d Marked with * and **, if values for mutants found significantly different from the wild type with p-values < 0.05 and < 0.005 respectively.

Table S3. Abundance of indolic compounds in *wat1-1* and *wat1-2* stems as compared to their respective wild types (Col and Ws), based on the UV-absorption chromatogram at 278 nm.

RT ^a	m/z ^b	Identity	Peak area in arbitrary units (average \pm SD) ^d			
			Col	<i>wat1-1</i>	Ws	<i>wat1-2</i>
4.3	unknown	unknown	1902 \pm 287	2874 \pm 339*	1297 \pm 54	2334 \pm 403*
5.2	203	Tryptophan	436 \pm 109	68 \pm 47**	257 \pm 55	175 \pm 31*
8.3	245	Acetyl tryptophan	n.d.	n.d.	n.d.	295 \pm 119
9.4	unknown	unknown	767 \pm 189	378 \pm 122*	276 \pm 74	446 \pm 91*
12.0	394	Tryptophan-191 ^c	n.d.	200 \pm 46	n.d.	n.d.

^a Retention time (in min).

^b Mass-to-charge ratio.

^c During MS in the negative mode, tryptophan-191 is fragmented into a charged fragment with m/z=203, that is likely to be tryptophan, and a neutral loss of m=191.

^d Marked with * and **, if values for mutants found significantly different from the wild type with p-values < 0.05 and < 0.005 respectively. n.d. = not detected (below detection threshold).

Light-regulated compensation of *wat1* (*walls are thin1*) growth and secondary cell wall phenotypes is auxin-independent

Nicolas Denancé,^{1,†} Philippe Ranocha,^{1,†} Yves Martinez,¹ Björn Sundberg² and Deborah Goffner^{1,*}

¹Université de Toulouse; UPS; CNRS UMR 5546; Surfaces Cellulaires et Signalisation chez les Végétaux; Castanet-Tolosan, France; ²Umeå Plant Science Center; Department of Forest Genetics and Plant Physiology; Swedish University of Agricultural Sciences; Umeå, Sweden

[†]These authors contributed equally to this work.

We previously reported the characterization of *walls are thin1* (*wat1*), an *Arabidopsis* mutant that exhibits two developmental phenotypes in stems: (1) a severe decrease in fiber secondary cell wall thickness and (2) a reduction in stem height.¹ Auxin concentration and transport were also significantly reduced in the stem base of *wat1* plants. In the original study, these characteristics were observed in plants grown under short day conditions (9 h light/15 h dark). Herein, we provide evidence for partial phenotypic complementation of both *wat1* developmental phenotypes when grown under a continuous light regime. Interestingly, when auxin concentration and basipetal transport were measured in these plants, neither was restored to wild type levels. These results suggest that free auxin concentration is not responsible for the partial light-regulated complementation of *wat1*-mediated phenotypes.

By coupling genomic approaches in *Zinnia elegans* with reverse genetics in *Arabidopsis*, we recently identified *WAT1*, an *Arabidopsis* gene with homology to *MtN21*, *Medicago truncatula Nodulin 21*.² *WAT1* is the first functionally characterized member of the Plant Metabolite Exporter family.^{1,3} One of the most obvious phenotypes of *wat1* was a drastic reduction in stem height when grown in short day conditions.¹ In this report, we show that this phenotype is greatly attenuated when *wat1* is grown in continuous light (Fig. 1A and B). Under these conditions,

wat1 stems are only slightly shorter than the wild type at maturity (Fig. 1A and B) whereas *wat1* never grew beyond 20 cm in height when grown under short day conditions.¹

In short day conditions, *wat1* also exhibited a severe reduction in secondary wall thickness in fibers.¹ To determine if this phenotype was also restored in continuous light, transverse stem sections stained with phloroglucinol were observed (Fig. 1C). Under these conditions, xylary and interfascicular fibers of *wat1* stained red, indicating the presence of lignified cell walls. Immunolocalisation experiments were then performed with an LM10 anti-xylan antibody.⁴ These results demonstrated the presence of xylan in interfascicular fiber walls, further confirming the deposition of secondary cell walls (Fig. 1D). Although xylan-containing secondary walls in fibers were somewhat thinner in *wat1* than the wild type under continuous light, they were thicker than short day-grown *wat1* fibers.¹ The partial, light-regulated complementation of growth and cell wall phenotypes strongly suggests that *WAT1*-mediated growth inhibition and secondary cell wall formation are dependent on environmental conditions.

A major role in integrating plant growth in response to environmental cues has been attributed to auxin.⁵ We originally measured both auxin concentration and basipetal transport in *wat1* stems grown under short day conditions. A significantly lower auxin concentration accompanied by a decrease

Key words: arabidopsis, secondary cell wall, auxin, light, fiber

Submitted: 07/22/10

Accepted: 07/22/10

Previously published online:

www.landesbioscience.com/journals/psb/article/13103

DOI: 10.4161/psb.5.10.13103

*Correspondence to: Deborah Goffner;
Email: goffner@scsv.ups-tlse.fr

Addendum to: Ranocha Ph, Denancé N, Vanholme R, Freyrier A, Martinez Y, Hoffmann L, et al. Walls are thin 1 (WAT1), an *Arabidopsis* homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. Plant J 2010; 63:469-483; PMID: 20497379; DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04256.

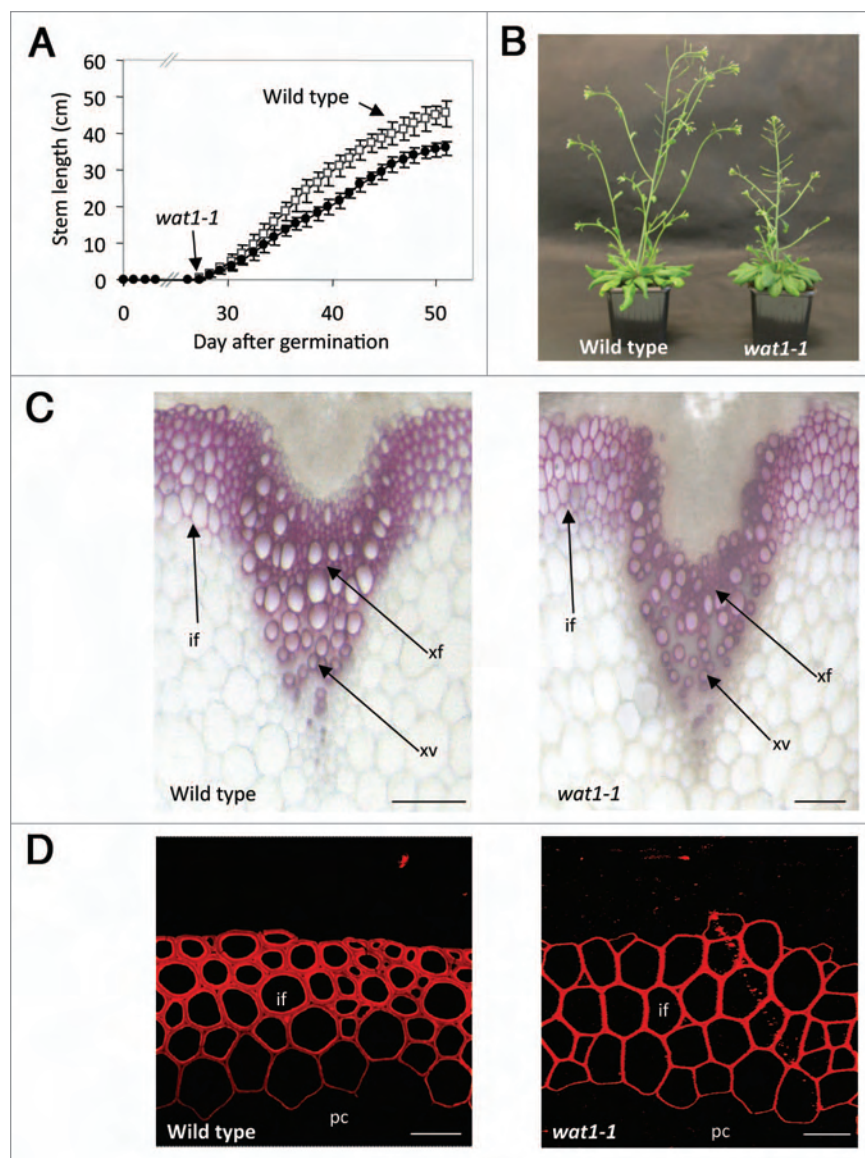


Figure 1. Phenotype of *wat1-1* grown under continuous light. Plants were grown in Jiffy peat pellets in culture chambers under continuous light (120 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, 22°C, 65% relative humidity). (A) Growth of wild-type and *wat1-1* mutant plants. Stem height was measured daily on 10 individuals in two independent experiments. (B) Wild type and *wat1-1* mutant plants at maturity. (C) Phloroglucinol-stained cross sections of the bottom part of 35-cm high stems. Bar = 20 μm . If, interfascicular fibers; xf, xylary fibers; xv, xylem vessels. Cross sections of fresh Arabidopsis stems (100–150 μm) were prepared with a vibratome (model VT 1000S, Leica). Phloroglucinol-HCl staining reactions were performed as described.¹⁵ (D) Immunodetection of xylan with LM10 antibody on resin-embedded wild type and *wat1-1* 35-cm high stem cross sections. Close-up on interfascicular region. LM10 signal is represented in red. if, interfascicular fibers; pc, parenchyma cells. Bar = 4 μm .

in basipetal transport was observed at the base of the *wat1* stem as compared to wild type.¹ To determine if the light regime could also complement auxin levels, free IAA concentration was measured in the basal portions of *wat1* and wild type 20 cm-high stems grown under continuous light. Interestingly, auxin levels

in *wat1* were still significantly lower than the wild type, thereby uncoupling the observed light-dependent developmental phenotypes and auxin content (Fig. 2A). Moreover, auxin transport was significantly decreased in *wat1* stems regardless of the light regime, reinforcing the dissociation between the individual role

of light and auxin on *wat1* development (Fig. 2B).¹

We have shown herein that the formation of secondary walls is dependent on environmental conditions and that the role of WAT1 is especially critical when light is limiting. The *WAT1/MtN21* gene family in Arabidopsis has 46 members and one simple explanation of the light-dependent compensation phenotype could be the compensation by another gene family member under continuous light conditions. Microarray data indicate that in addition to *WAT1*, eight other family members are highly expressed in xylem and/or induced in Arabidopsis tracheary elements cultures.^{6,7} Interestingly, the expression of many of these genes was shown to be induced by light stimuli.^{7,8} Determining the growth parameters and wall formation in response to light of double mutants (*wat1* with each of the other light-induced family members) would enable us to confirm or refute this hypothesis.

Even if a critical role for auxin in the light-dependent compensation of secondary wall synthesis in *wat1* cannot be made herein, other conditional light-dependent phenotypes have been reported in relation to auxin. For example, in the auxin influx carrier *aux/lax1/lax2/lax3* quadruple mutant, a defect in phyllotaxy of the vegetative meristem was only observed when plants were grown under short day conditions.⁹ Two recent studies also point to the fact that the IPA-dependent auxin biosynthetic pathway plays a critical role in the rapid induction of auxin levels involved in the shade avoidance response in Arabidopsis.^{10,11} Although auxin concentration in itself cannot explain the compensation phenotype in *wat1* under continuous light, one cannot exclude that auxin perception and/or signaling may be altered under these conditions. For example, light by itself appears to regulate a subset of the rapid auxin response *Aux/IAA*, *SAUR* and *GH3* genes.^{12,13} Another hypothesis to explain the light compensation data might involve other signals such as sugars that are neo-synthesized under high light conditions and that may activate downstream cell wall signaling pathways. In keeping with this idea, the lignin biosynthetic pathway itself has been

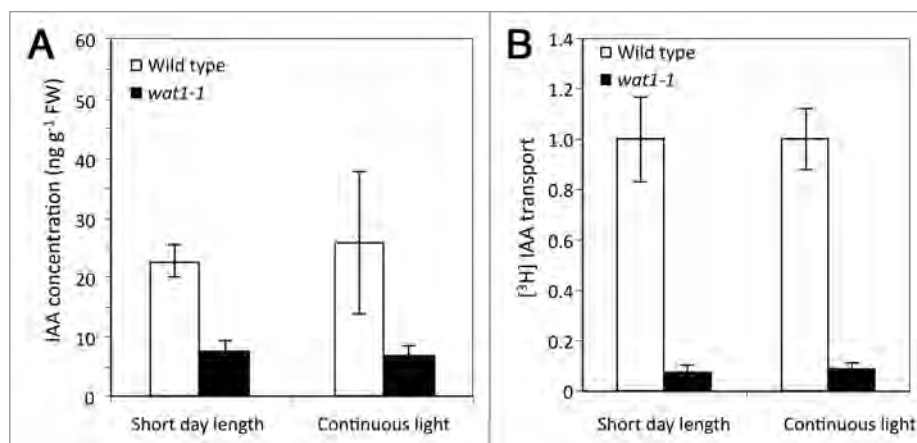


Figure 2. Effect of the *wat1* mutation on free IAA concentration and basipetal auxin transport, grown in short days (9 h light, 200 $\mu\text{mol photons/m/s}$, 22°C, 65% relative humidity) or continuous light (120 $\mu\text{mol photons/m/s}$, 22°C, 65% relative humidity). (A) Free IAA concentration in wild type and *wat1-1*, measured in basal portions of 20 cm stems grown in short days or continuous light. Mean \pm SD, $n = 5$ biological replicates. (B) Basipetal IAA transport in wild type and *wat1-1* stems, measured in basal portions of 20 cm stems grown in short days or continuous light. Results are presented as ratio of IAA transport (cpm), with an arbitrary value of 1 attributed to the wild type. Data are mean \pm SD, $n = 5$ biological replicates. Auxin transport assays were performed as described,¹⁶ with slight modifications.¹

shown to be transcriptionally modulated by three environmental and/or metabolic factors: light, the circadian clock and hexose availability.¹⁴ In this study of *wat1*, we have clearly demonstrated the plasticity of secondary wall formation in response to environmental cues. This finding should be taken into account in lignocellulosic biomass design for the future.

Acknowledgements

The authors would like to thank Kjell Olofsson for technical assistance and Karin Ljung for help with IAA analysis (both Umeå Plant Science Centre, Sweden). We would like to acknowledge Génoplante for financial support. We also thank The Plant Journal and its publisher, John Wiley and Sons, for permission in reusing previously published data (used for comparison's sake with the original data presented herein) in this article.¹

References

- Ranocha Ph, Denancé N, Vanholme R, Freydier A, Martinez Y, Hoffmann L, et al. *Walls are thin1 (WAT1)*, an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula NODULIN21*, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *The Plant Journal* 2010; 63:469-483.
- Gamas P, de Carvalho-Niebel F, Lescure N, Cullimore J. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 1996; 9:233-42.
- Jack DL, Yang NM, Saier MH Jr. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* 2001; 268:3620-39.
- McCartney L, Marcus SE, Knox JP. Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:543-6.
- Jaillais Y, Chory J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:642-5.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, et al. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development* 2005; 19:1855-60.
- Zimmermann P, Hirsh-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol* 2004; 136:2621-32.
- Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. Potent Induction of *Arabidopsis thaliana* Flowering by Elevated Growth Temperature. *PLoS Genet* 2006; 2:106.
- Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennet M, Mandel T, et al. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes & Development* 2008; 22:810-23.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, et al. TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell* 2008; 133:177-91.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, et al. Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell* 2008; 133:164-76.
- Abel S, Nguyen MD, Chow W, Theologis A. ASC4, a Primary Indoleacetic Acid-responsive Gene Encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase in *Arabidopsis thaliana*: structural characterization, expression in *Escherichia coli* and expression characteristics in response to auxin. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270:19093-9.
- Tanaka S-I, Mochizuki N, Nagatani A. Expression of the *AtGH3a* Gene, an Arabidopsis Homologue of the Soybean *GH3* Gene, is Regulated by Phytochrome B. *Plant Cell Physiol* 2002; 43:281-9.
- Rogers LA, Dubos C, Cullis IF, Surman C, Poole M, Willment J, et al. Light, the circadian clock and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* 2005; 56:1651-63.
- Atanassova R, Favet N, Martz F, Chabbert B, Tollier MT, Monties B, et al. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J* 1995; 8:465-77.
- Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, et al. Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006; 18:308-20.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., and Martin, G.B.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 601-611.
- Abreu, M.E., and Munné-Bosch, S.** (2009). Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1261-1271.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., and Staehelin, A.** (2010). *Plant cell walls: from chemistry to biology*. New York: Garland Science.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S.** (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J* **19**, 2304-2314.
- Alfano, J.R., and Collmer, A.** (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* **179**, 5655-5662.
- Alfano, J.R., and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 385-414.
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J.R., and Guo, H.** (2010). Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **22**, 2384-2401.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H.T., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.-A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O., and Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* **24**, 2579-2589.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vaillau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14620-14625.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J.C., Denarie, J., and Truchet, G.** (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357-1374.

- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., and Williamson, R.E.** (1998). Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in Arabidopsis. *Science* **279**, 717-720.
- Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and Boucher, C.A.** (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J* **13**, 543–553.
- Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., and Zeier, J.** (2009). Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 954-971.
- Bart, R.S., Chern, M., Vega-Sánchez, M.E., Canlas, P., and Ronald, P.C.** (2010). Rice Snl6, a Cinnamoyl-CoA Reductase-Like Gene Family Member, Is Required for NH1-Mediated Immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS Genet* **6**, e1001123.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubisky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., and Schulze-Lefert, P.** (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* **323**, 101-106.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P.J.G.M., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an Arabidopsis Cysteine Protease Required for RRS1-R-Mediated Resistance, Is Relocalized to the Nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 Effector. *Plant Cell* **20**, 2252-2264.
- Bhuiyan, N.H., Selvaraj, G., Wei, Y., and King, J.** (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany* **60**, 509-521.
- Birker, D., Heidrich, K., Takahara, H., Narusaka, M., Deslandes, L., Narusaka, Y., Reymond, M., Parker, J.E., and O'Connell, R.** (2009). A locus conferring resistance to *Colletotrichum higginsianum* is shared by four geographically distinct Arabidopsis accessions. *The Plant Journal* **60**, 602-613.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W., and Benfey, P.N.** (2003). A Gene Expression Map of the Arabidopsis Root. *Science* **302**, 1956-1960.

- Blanvillain, S.** (2007). Etude des récepteurs TonB-dépendants et d'un nouvel effecteur de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E., and Arlat, M.** (2007). Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE* **2**, e224.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 519-546.
- Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Onckelen, H.V., Montagu, M.V., and Inze, D.** (1995). superroot, a Recessive Mutation in Arabidopsis, Confers Auxin Overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405-1419.
- Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.-C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J., and Van Gijsegem, F.** (1996). Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* **20**, 681-683.
- 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.
- Boucher, C., Barberis, P.A., Trigalet, A.P., and Demery, D.A.** (1985). Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2449-2457.
- Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D., and Balague, C.** (2007). Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant vad1. *Plant Physiol* **145**, 465-477.
- Boudjeko, T., Andème-Onzighi, C., Vicré, M., Balangé, A.-P., Ndoumou, D.O., and Driouich, A.** (2006). Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta* **223**, 271-282.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X.** (1997). The cpr5 Mutant of Arabidopsis Expresses Both NPR1-Dependent and NPR1-Independent Resistance. *Plant Cell* **9**, 1573-1584.

- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A., Klessig, D.F., and Dong, X.** (1994). A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.-Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U., and Benfey, P.N.** (2007). A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science* **318**, 801-806.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (1999). prhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **31**, 237-251.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 109-119.
- Brito, N.I., Espino, J.J., and González, C.** (2006). The Endo-B-1,4-Xylanase Xyn11A Is Required for Virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 25-32.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjørn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.-A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., and Mundy, J.** (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**, 532-546.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 183-205.
- Burton, R.A., Gidley, M.J., and Fincher, G.B.** (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat Chem Biol* **6**, 724-732.
- Buttner, D., Nennstiel, D., Klusener, B., and Bonas, U.** (2002). Functional Analysis of HrpF, a Putative Type III Translocon Protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* **184**, 2389-2398.
- Camilleri, C., and Jouanin, L.** (1991). The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* **4**, 155-162.
- Carviel, J.L., Al-Daoud, F., Neumann, M., Mohammad, A., Provart, N.J., Moeder, W., Yoshioka, K., and Cameron, R.K.** (2009). Forward and reverse genetics to identify

- genes involved in the age-related resistance response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **10**, 621-634.
- Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabolina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., and Keegstra, K.** (2008). Disrupting Two *Arabidopsis thaliana* Xylosyltransferase Genes Results in Plants Deficient in Xyloglucan, a Major Primary Cell Wall Component. *Plant Cell* **20**, 1519-1537.
- Chavez Montes, R.A., Ranocha, P., Martinez, Y., Minic, Z., Jouanin, L., Marquis, M., Saulnier, L., Fulton, L.M., Cobbett, C.S., Bitton, F., Renou, J.-P., Jauneau, A., and Goffner, D.** (2008). Cell Wall Modifications in *Arabidopsis* Plants with Altered {alpha}-L-Arabinofuranosidase Activity. *Plant Physiol.* **147**, 63-77.
- Chellemi, D.O., Andersen, P.C., Brodbeck, B., Dankers, W., and Rhoads, F.M.** (1998). Correlation of chemical profiles of xylem fluid of tomato resistance to bacterial wilt. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, 225-232.
- Chen, C.-N., Chen, C.-J., Liao, C.-T., and Lee, C.-Y.** (2009). A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiology* **9**, 89.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J.** (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**, 803-814.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., and Dong, X.** (2000). Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-Induced Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **12**, 2175-2190.

- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M.** (2009). Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science* **323**, 95-101.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-743.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J.L., and Epple, P.** (2010). Arabidopsis Type I Metacaspases Control Cell Death. *Science* **330**, 1393-1397.
- Consonni, C., Bednarek, P., Humphry, M., Francocci, F., Ferrari, S., Harzen, A., Ver Loren van Themaat, E., and Panstruga, R.** (2010). Tryptophan-Derived Metabolites Are Required for Antifungal Defense in the Arabidopsis mlo2 Mutant. *Plant Physiol.* **152**, 1544-1561.
- Cornelis, G.R., and Van Gijsegem, F.d.r.** (2000). ASSEMBLY AND FUNCTION OF TYPE III SECRETORY SYSTEMS. *Annual Review of Microbiology* **54**, 735-774.
- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S., Rouze, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W., and Trick, M.** (2003). CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res* **31**, 156-158.
- Cunnac, S., Boucher, C., and Genin, S.** (2004a). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **186**, 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2004b). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**, 115-128.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- da Silva, A.C.** (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459-463.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Davis, D., and Dimond, A.E.** (1953). Inducing disease resistance with plant growth-regulators. *Phytopathology* **43**, 137-140.

- de Wit, P.** (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **64**, 2726-2732.
- Dean, J.V., Shah, R.P., and Mohammed, L.A.** (2003). Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean cell suspension cultures. *Physiologia Plantarum* **118**, 328-336.
- Dean, J.V., Mohammed, L.A., and Fitzpatrick, T.** (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**, 287-296.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.B., Nomura, K., and He, S.Y.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 9927-9932.
- Delarue, M., Prinsen, E., Va, H., Onckelen, Caboche, M., and Bellini, C.** (1998). Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *The Plant Journal* **14**, 603-611.
- Denancé, N., Ranocha, P., Martínez, Y., Sundberg, B., and Goffner, D.** (2010). Light-regulated compensation of *wat1* (walls are thin1) growth and secondary cell wall phenotypes is auxin-independent. *Plant Signal Behav* **5**, 1302-1304.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S.p., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8024-8029.
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M., and Marco, Y.** (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 659-667.
- Desveaux, D., Singer, A.U., Wu, A.-J., McNulty, B.C., Musselwhite, L., Nimchuk, Z., Sondek, J., and Dangl, J.L.** (2007). Type III Effector Activation via Nucleotide Binding, Phosphorylation, and Host Target Interaction. *PLoS Pathog* **3**, e48.

- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jürgens, G., and Estelle, M.** (2005). Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Developmental Cell* **9**, 109-119.
- Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X., and Wang, S.** (2008). Activation of the Indole-3-Acetic Acid Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell Online* **20**, 228-240.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8888-8893.
- Dong, X.** (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 547-552.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.-A.s., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S.** (1997). Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 646-655.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N., and Poovaiah, B.W.** (2009). Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* **457**, 1154-1158.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J.Ā., Shishkova, S., Celenza, J., and BenkovĀ; E.** (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8790-8794.
- Ellendorff, U., Fradin, E.F., de Jonge, R., and Thomma, B.P.** (2009). RNA silencing is required for Arabidopsis defence against *Verticillium* wilt disease. *J Exp Bot* **60**, 591-602.
- Elliott, M.C., and Stowe, B.B.** (1971). Distribution and Variation of Indole Glucosinolates in Woad (*Isatis tinctoria* L.). *Plant Physiology* **48**, 498-503.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2001). The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025-1033.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., and Turner, J.G.** (2002a). Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe*

- cichoracearum, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1025-1030.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., and Turner, J.G.** (2002b). The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**, 1557-1566.
- Fagard, M., Desnos, T., Desprez, T., Goubet, F., Refregier, G., Mouille, G., McCann, M., Rayon, C., Vernhettes, S., and Hofte, H.** (2000). PROCUSTE1 Encodes a Cellulose Synthase Required for Normal Cell Elongation Specifically in Roots and Dark-Grown Hypocotyls of Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2409-2424.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3292-3297.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**, 307-316.
- 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.
- Feussner, I., and Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E.** (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. *Plant Cell* **17**, 2601-2613.
- Fiehn, O., Kristal, B., van Ommen, B., Sumner, L.W., Sansone, S.A., Taylor, C., Hardy, N., and Kaddurah-Daouk, R.** (2006). Establishing reporting standards for metabolomic and metabonomic studies: a call for participation. *OMICS* **10**, 158-163.
- Flor, H.H.** (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P., and Mauch-Mani, B.** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced

- resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **54**, 81-92.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**, 344-350.
- Foyer, C.H., and Noctor, G.** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Fradin, E.F., and Thomma, B.P.H.J.** (2006). Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* **7**, 71-86.
- Franke, I., Resch, A., Dassler, T., Maier, T., and Bock, A.** (2003). YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine. *J Bacteriol* **185**, 1161-1166.
- Frye, C.A., Tang, D., and Innes, R.W.** (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 373-378.
- Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Tacconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A., and Brunaud, V.** (2008). CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* **36**, D986-990.
- Gallego-Giraldo, L., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Tang, Y., and Dixon, R.A.** (2011). Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *New Phytol* **10.1111/j.1469-8137.2010.03621.x**.
- Galon, Y., Nave, R., Boyce, J.M., Nachmias, D., Knight, M.R., and Fromm, H.** (2008). Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in Arabidopsis. *FEBS Letters* **582**, 943-948.
- Gamas, P., Niebel Fde, C., Lescure, N., and Cullimore, J.** (1996). Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 233-242.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrè, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., and Metraux, J.-P.** (2008). Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**, 1279-1287.
- Gaspar, Y.M., Nam, J., Schultz, C.J., Lee, L.-Y., Gilson, P.R., Gelvin, S.B., and Bacic, A.** (2004). Characterization of the Arabidopsis Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein

- AtAGP17 Mutant (rat1) That Results in a Decreased Efficiency of Agrobacterium Transformation. *Plant Physiology* **135**, 2162-2171.
- Genin, S.** (2010). Research review: Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* **187**, 920-928.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C., and Boucher, C.A.** (1992). Evidence that the hrpB gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* **6**, 3065-3076.
- Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.P., Muller, C., Weisshaar, B., and Flugge, U.I.** (2007). The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **50**, 886-901.
- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K.C., Putterill, J., Palme, K., Estelle, M., and Chory, J.** (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **15**, 1985-1997.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., and Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J* **34**, 217-228.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**, 277-284.
- Gonzalez, E.T., and Allen, C.** (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* Operon Required for Polygalacturonate Degradation and Uptake of Galacturonic Acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 536-544.
- Grant, J.J., and Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**, 21-29.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., and Estelle, M.** (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **13**, 1678-1691.
- Grubb, C.D., and Abel, S.** (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* **11**, 89-100.

- Guo, H., and Ecker, J.R.** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-677.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and Biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 303-333.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., and Vibe Scheller, H.** (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol* **153**, 384-395.
- Hayward, A.C.** (1991). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 65-87.
- He, P.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK Arabidopsis innate immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12217-12222.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A.** (2007). Impairment of Cellulose Synthases Required for Arabidopsis Secondary Cell Wall Formation Enhances Disease Resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R.P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., de Longevialle, A.F., Farmer, E.E., Grant, M., Kuiper, M.T., Lehrach, H., Leon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouze, P., Sandberg, G., Segura, M.D., Serizet, C., Tabrett, A., Taconnat, L., Thareau, V., Van Hummelen, P., Vercruyssen, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P.J., Wirta, V., Wittink, F.R., Zabeau, M., and Small, I.** (2004). Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* **14**, 2176-2189.

- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D.X., Balagué, C., and Marco, Y.** (2002). Delayed Symptom Development in *ein2-1*, an Arabidopsis Ethylene-Insensitive Mutant, in Response to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **92**, 1142-1148.
- His, I., Driouich, A., Nicol, F., Jauneau, A., and Hofte, H.** (2001). Altered pectin composition in primary cell walls of *korrigan*, a dwarf mutant of Arabidopsis deficient in a membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase. *Planta* **212**, 348-358.
- Hu, J., Barlet, X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D.X., Somssich, I., and Marco, Y.** (2008). Transcriptional Responses of Arabidopsis thaliana during Wilt Disease Caused by the Soil-Borne Phytopathogenic Bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* **3**, e2589.
- Huang, Q., and Allen, C.** (1997). An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **179**, 7369-7378.
- Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J.** (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of Arabidopsis thaliana leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 537-543.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., and Shirasu, K.** (2006). MEKK1 Is Required for MPK4 Activation and Regulates Tissue-specific and Temperature-dependent Cell Death in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 36969-36976.
- Jack, D.L., Yang, N.M., and Saier, M.H., Jr.** (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* **268**, 3620-3639.
- Jakob, K., Kniskern, J.M., and Bergelson, J.** (2007). The Role of Pectate Lyase and the Jasmonic Acid Defense Response in *Pseudomonas viridiflava* Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 146-158.
- Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., and Pont-Lezica, R.** (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* **8**, 893-908.
- Janse, J.D.** (1996). Potato brown rot in western Europe history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bull. OEPP* **26**, 679-695.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**, 3901-3907.

- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**, 4004-4014.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J.** (1999). Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13583-13588.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- 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.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y.** (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 1-35.
- Kazan, K., and Manners, J.M.** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**, 373-382.
- Kepinski, S., and Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Kim, H.S.** (2005a). The Pseudomonas syringae effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 6496-6501.
- Kim, M.G.** (2005b). Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**, 749-759.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E.** (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301-307.
- Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J.J., and Fukuda, H.** (2011). CLE Peptides can Negatively Regulate Protoxylem Vessel Formation via Cytokinin Signaling. *Plant and Cell Physiology* **52**, 37-48.
- Korolev, N., Rav David, D., and Elad, Y.** (2008). The role of phytohormones in basal resistance and Trichoderma-induced systemic resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. *BioControl* **53**, 667-683.

- Krasikov, V., Dekker, H.L., Rep, M., and Takken, F.L.W.** (2011). The tomato xylem sap protein XSP10 is required for full susceptibility to *Fusarium* wilt disease. *Journal of Experimental Botany* **62**, 963-973.
- Kunze, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- Kus, J.V., Zaton, K., Sarkar, R., and Cameron, R.K.** (2002). Age-Related Resistance in *Arabidopsis* Is a Developmentally Regulated Defense Response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **14**, 479-490.
- Lagaert, S., Beliën, T., and Volckaert, G.** (2009). Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 1064-1073.
- Lambert, C.D.** (2002). Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, Use, and Transfer of Biological; Agents and Toxins; Interim and Final Rule. *Federal Register* **67**, 76907-76938.
- Lapik, Y.R., and Kaufman, L.S.** (2003). The *Arabidopsis* Cupin Domain Protein AtPirin1 Interacts with the G Protein $\hat{I}\pm$ -Subunit GPA1 and Regulates Seed Germination and Early Seedling Development. *The Plant Cell Online* **15**, 1578-1590.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., and Kunkel, B.N.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 Gene Is Required for Suppression of Salicylic Acid-Dependent Defenses During Infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 789-800.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., and Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 863-870.
- Lee, S.-W., Han, S.-W., Sriyanum, 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.
- Li, J., and Last, R.L.** (1996). The *Arabidopsis thaliana* *trp5* Mutant Has a Feedback-Resistant Anthranilate Synthase and Elevated Soluble Tryptophan. *Plant Physiol.* **110**, 51-59.
- Ligat, L., Lauber, E., Albenne, C., Clemente, H.S., Valot, B., Zivy, M., Pont-Lezica, R., Arlat, M., and Jamet, E.** (2011). Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins. *Proteomics* (**in press**).

- Lin, Z., Zhong, S., and Grierson, D.** (2009). Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* **60**, 3311-3336.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2005). Pyramiding Unmarked Deletions in *Ralstonia solanacearum* Shows That Secreted Proteins in Addition to Plant Cell-Wall-Degrading Enzymes Contribute to Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1296-1305.
- Livshits, V.A., Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V., and Vitushkina, M.V.** (2003). Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **154**, 123-135.
- Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L., and Molina, A.** (2005). ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* **43**, 165-180.
- Llorente, F., Muskett, P., Sanchez-Vallet, A., Lopez, G., Ramos, B., Sanchez-Rodriguez, C., Jordi, L., Parker, J., and Molina, A.** (2008). Repression of the Auxin Response Pathway Increases *Arabidopsis* Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Molecular Plant* **1**, 496-509.
- Loake, G., and Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 466-472.
- Lokerse, A.S., and Weijers, D.** (2009). Auxin enters the matrix: assembly of response machineries for specific outputs. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 520-526.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Love, A.J., Laval, V., Geri, C., Laird, J., Tomos, A.D., Hooks, M.A., and Milner, J.J.** (2007). Components of *Arabidopsis* Defense- and Ethylene-Signaling Pathways Regulate Susceptibility to Cauliflower mosaic virus by Restricting Long-Distance Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 659-670.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L., and Small, I.** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103.

- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743-754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
- Maillet, F., Poinso, V., Andre, O., Puech-Pages, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E.A., Driguez, H., Becard, G., and Denarie, J.** (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58-63.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., and Arlat, M.** (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* **27**, 437-453.
- McCartney, L., Marcus, S.E., and Knox, J.P.** (2005). Monoclonal Antibodies to Plant Cell Wall Xylans and Arabinoxylans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **53**, 543-546.
- Meyer, D., Lauber, E., Roby, D., Arlat, M., and Kroj, T.** (2005). Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology* **6**, 327-333.
- Meyer, D., Cunnac, S., Gueneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., Boucher, C., and Arlat, M.** (2006). PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *J Bacteriol* **188**, 4903-4917.
- 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. *Plant Cell* **22**, 973-990.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19613-19618.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

- Mysore, K.S., and Ryu, C.-M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science **9**, 97-104.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y.** (2008). Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence. Molecular Plant-Microbe Interactions **21**, 1165-1174.
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., and Narusaka, Y.** (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. The Plant Journal **60**, 218-226.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D.G.** (2004). The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. Plant Physiol. **135**, 1113-1128.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.G.** (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. Science **312**, 436-439.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Métraux, J.-P.** (2002). EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid-Dependent Signaling for Disease Resistance in Arabidopsis, Is a Member of the MATE Transporter Family. The Plant Cell Online **14**, 275-286.
- 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.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., and Bonas, U.** (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Molecular Microbiology **41**, 1271-1281.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. Science **313**, 220-223.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T.** (2000). Interacting Signal Pathways Control Defense Gene Expression in Arabidopsis in Response to Cell Wall-Degrading Enzymes from Erwinia carotovora. Molecular Plant-Microbe Interactions **13**, 430-438.
- Nurnberger, T., and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular Plant Pathology **6**, 335-345.

- O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., Esquerre-Tugaye, M.T., and Dumas, B.** (2004). A novel *Arabidopsis*-*Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 272-282.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S., and Boucher, C.** (2005). Genome-Wide Analysis of Gene Expression in *Ralstonia solanacearum* Reveals That the *hrpB* Gene Acts as a Regulatory Switch Controlling Multiple Virulence Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 938-949.
- Oeser, B., Heidrich, P.M., Müller, U., Tudzynski, P., and Tenberge, K.B.** (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology* **36**, 176-186.
- Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., and Paplomatas, E.J.** (2010). Ethylene perception via *ETR1* is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol* **11**, 191-202.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F.** (2007). Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* **318**, 113-116.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J.** (1996). Characterization of *eds1*, a Mutation in *Arabidopsis* Suppressing Resistance to *Peronospora parasitica* Specified by Several Different RPP Genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.
- Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D., Swennes, A.G., McGill, J.A., Popper, Z., Bootten, T., Albert, A., Davis, R.H., Chennareddy, C., Dong, R., O'Shea, B., Rossi, R., Leoff, C., Freshour, G., Narra, R., O'Neil, M., York, W.S., and Hahn, M.G.** (2010). A Comprehensive Toolkit of Plant Cell Wall Glycan-Directed Monoclonal Antibodies. *Plant Physiol.* **153**, 514-525.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Pesquet, E., Ranocha, P., Legay, S., Digonnet, C., Barbier, O., Pichon, M., and Goffner, D.** (2005). Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol* **139**, 1821-1839.
- Pfaffl, M.W.** (2004). Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3 . In: Bustin SA, ed. A-Z of quantitative PCR. International University Line (IUL), 87 – 112.

- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F.** (2004). Flagellin Is Not a Major Defense Elicitor in *Ralstonia solanacearum* Cells or Extracts Applied to *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 696-706.
- Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K., and Jones, J.D.G.** (1998). Rapid, Cf-9- and Avr9-Dependent Production of Active Oxygen Species in Tobacco Suspension Cultures. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1155-1166.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308-316.
- Plener, L., Manfredi, P., Valls, M., and Genin, S.** (2010). PrhG, a Transcriptional Regulator Responding to Growth Conditions, Is Involved in the Control of the Type III Secretion System Regulon in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **192**, 1011-1019.
- Pollmann, S., Duchting, P., and Weiler, E.W.** (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* **70**, 523-531.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., and Genschik, P.** (2003). EIN3-Dependent Regulation of Plant Ethylene Hormone Signaling by Two *Arabidopsis* F Box Proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679-689.
- Poueymiro, M., and Genin, S.** (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 44-52.
- Qiao, H., Chang, K.N., Yazaki, J., and Ecker, J.R.** (2009). Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **23**, 512-521.
- Qiu, J.-L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J., and Petersen, M.** (2008). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* **27**, 2214-2221.
- Quentin, M., Allasia, V., Pegard, A., Allais, F., Ducrot, P.-H., Favery, B., Levis, C., Martinet, S., Masur, C., Ponchet, M., Roby, D., Schlaich, N.L., Jouanin, L., and Keller, H.** (2009). Imbalanced Lignin Biosynthesis Promotes the Sexual Reproduction of Homothallic Oomycete Pathogens. *PLoS Pathog* **5**, e1000264.

- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne, R.H., and Moorman, A.F.M.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66.
- Ranocha, P., Denancé, N., Vanholme, R., Freydier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., Kohler, L., Pouzet, C., Renou, J.P., Sundberg, B., Boerjan, W., and Goffner, D.** (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of Medicago truncatula NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant J* **63**, 469-483.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., and Prior, P.** (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**, 379.
- Roby, D., Toppan, A., and Esquerre-Tugaye, M.T.** (1985). Cell surfaces in plant-microorganism interactions : v. Elicitors of fungal and of plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein in plants. *Plant Physiol* **77**, 700-704.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He, S.Y.** (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3459-3464.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M., and Ecker, J.R.** (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**, 1393-1409.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., and Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M.** (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* **12**, 198-207.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert,**

- C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Sampedro, J., Pardo, B., Gianzo, C., Guitian, E., Revilla, G., and Zarra, I. (2010). Lack of α -Xylosidase Activity in *Arabidopsis* Alters Xyloglucan Composition and Results in Growth Defects. *Plant Physiol.* **154**, 1105-1115.
- Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., and Molina, A. (2010). Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi. *The Plant Journal* **63**, 115-127.
- Sato, Y., Demura, T., Yamawaki, K., Inoue, Y., Sato, S., Sugiyama, M., and Fukuda, H. (2006). Isolation and Characterization of a Novel Peroxidase Gene ZPO-C Whose Expression and Function are Closely Associated with Lignification during Tracheary Element Differentiation. *Plant and Cell Physiology* **47**, 493-503.
- Schell, M.A., Roberts, D.P., and Denny, T.P. (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* **170**, 4501-4508.
- Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 263-289.
- Sequeira, L., and Kelman, A. (1962). Accumulation of growth substances in plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 439-448.
- Sequeira, L., and Williams, P.H. (1964). Synthesis of indoleacetic acid by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **54**, 1240-1246.
- Shibata, Y., Kawakita, K., and Takemoto, D. (2010). Age-Related Resistance of *Nicotiana benthamiana* Against Hemibiotrophic Pathogen *Phytophthora infestans* Requires Both Ethylene- and Salicylic Acid-Mediated Signaling Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1130-1142.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**, 3703-3714.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2117-2127.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6837-6840.

- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, Casey C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal* **15**, 747-754.
- Stepanova, A.N., and Alonso, J.M.** (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 548-555.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., and Krysan, P.J.** (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology* **143**, 661-669.
- Sugio, A., Yang, B., and White, F.F.** (2005). Characterization of the hrpF Pathogenicity Peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 546-554.
- Takai, R., Kaneda, T., Isogai, A., Takayama, S., and Che, F.-S.** (2007). A New Method of Defense Response Analysis Using a Transient Expression System in Rice Protoplasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 590-593.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Aina, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., and Ohta, H.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 1268-1283.
- Tans-Kersten, J., Guan, Y., and Allen, C.** (1998). *Ralstonia solanacearum* Pectin Methyltransferase Is Required for Growth on Methylated Pectin but Not for Bacterial Wilt Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4918-4923.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell Online* **15**, 317-330.
- Theodoulou, F.L., Job, K., Slocumbe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, I.A.** (2005). Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol* **137**, 835-840.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.

- Toppan, A., Roby, D., and Esquerre-Tugaye, M.T.** (1982). Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions : III. In Vivo Effect of Ethylene on Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Accumulation in the Cell Wall of Diseased Plants. *Plant Physiol* **70**, 82-86.
- Torres, M.A.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* **138**, 414-429.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 517-522.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* **141**, 373-378.
- Tronchet, M., Balagué, C., Kroj, T., Jouanin, L., and Roby, D.** (2010). Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology* **11**, 83-92.
- Truman, W.M., Bennett, M.H., Turnbull, C.G., and Grant, M.R.** Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol* **152**, 1562-1573.
- Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.J., Vaillau, F., Gentzbittel, L., and Jardinaud, M.F.** (2009). Dissection of bacterial Wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiol* **150**, 1713-1722.
- Turner, S., Gallois, P., and Brown, D.** (2007). Tracheary element differentiation. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 407-433.
- Ueda, H., Yamaguchi, Y., and Sano, H.** (2006). Direct Interaction between the Tobacco Mosaic Virus Helicase Domain and the ATP-bound Resistance Protein, N Factor during the Hypersensitive Response in Tobacco Plants. *Plant Molecular Biology* **61**, 31-45.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M.** (2000). Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-like Proteins, One of which Plays a Key Role in MALT Lymphoma. *Molecular cell* **6**, 961-967.

- Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L., and 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.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A.s., Reignault, P., Levis, C., and Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* Pectin Methylesterase Gene *Bcpme1* Reduces Virulence on Several Host Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 360-367.
- Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., and Médigue, C. (2006). MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research* **34**, 53-65.
- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C. (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog* **2**, e82.
- van den Burg, H.A., and Takken, F.L.W. (2009). Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science* **14**, 286-294.
- Van der Biezen, E.A., and Jones, J.D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.-C., Marendia, M., and Boucher, C. (2000). *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Molecular Microbiology* **36**, 249-260.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, 0034.0031-0034.0011.
- Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A. (1995). Microscopic Studies of Intercellular Infection and Protoxylem Invasion of Tomato Roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 241-251.
- Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.A., Hirt, H., and Mengiste, T. (2006). The Membrane-Anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 Plays Distinct Roles in Arabidopsis Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens. *The Plant Cell Online* **18**, 257-273.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F., and Park, S.-W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 436-442.

- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 177-206.
- Vogel, J., and Somerville, S.** (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1897-1902.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C., and Somerville, S.C.** (2002). PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2095-2106.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X.** (2007). Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* **17**, 1784-1790.
- Wang, K.L., Yoshida, H., Lurin, C., and Ecker, J.R.** (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**, 945-950.
- Ward, J.L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S.J., Baker, J.M., Hawkins, N.D., Vermeer, C.P., Lu, C., Lin, W., Truman, W.M., Beale, M.H., Draper, J., Mansfield, J.W., and Grant, M.** (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal* **63**, 443-457.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann Bot* **100**, 681-697.
- Watanabe, N., and Lam, E.** (2011). *Arabidopsis* Metacaspase 2d Is a Positive Mediator of Cell Death Induced during Biotic and Abiotic Stresses. *The Plant Journal* (**in press**).
- Weber, E., and Koebnik, R.** (2005). Domain Structure of HrpE, the Hrp Pilus Subunit of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **187**, 6175-6186.
- Wei, G., and Shirsat, A.H.** (2006). Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness. *Mol Plant Pathol* **7**, 579-592.
- Weng, J.K., Li, X., Stout, J., and Chapple, C.** (2008). Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7887-7892.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Willats, W.G.T., Marcus, S.E., and Knox, J.P.** (1998). Generation of a monoclonal antibody specific to (1 \rightarrow 5)-[α]-arabinan. *Carbohydrate Research* **308**, 149-152.
- Willats, W.G.T., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.-J., Benen, J., Christensen, T.M.I.E., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D., and Knox, J.P.**

- (2000). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* **327**, 309-320.
- Wydra, K., and Beri, H.** (2006). Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**, 41-50.
- Wydra, K., and Beri, H.** (2007). Immunohistochemical changes in methyl-ester distribution of homogalacturonan and side chain composition of rhamnogalacturonan I as possible components of basal resistance in tomato inoculated with *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **70**, 13-24.
- Xie, X.-Z., Xue, Y.-J., Zhou, J.-J., Zhang, B., Chang, H., and Takano, M.** (2011). Phytochromes Regulate SA and JA Signaling Pathways in Rice and Are Required for Developmentally Controlled Resistance to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant* (**in press**).
- Xu, R.Q., Blanvillain, S., Feng, J.X., Jiang, B.L., Li, X.Z., Wei, H.Y., Kroj, T., Lauber, E., Roby, D., Chen, B., He, Y.Q., Lu, G.T., Tang, D.J., Vasse, J., Arlat, M., and Tang, J.L.** (2008). AvrAC(Xcc8004), a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *J Bacteriol* **190**, 343-355.
- Yadeta, K., Hanemian, M., Hiemstra, J., Pereira, A., Marco, Y., and Thomma, B.P.H.J.** (2011). The *Arabidopsis thaliana* DNA binding protein AHL19 mediates *Verticillium* wilt resistance. (submitted).
- Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, N.T., Dinor, A., Pines, O., and Prusky, D.** (2001). *Colletotrichum gloeosporioides* pelB Is an Important Virulence Factor in Avocado Fruit-Fungus Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 988-995.
- Yang, T., and Poovaiah, B.W.** (2002). A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem* **277**, 45049-45058.
- Zabotina, O.A., Van De Ven, W.T.G., Freshour, G., Drakakaki, G., Cavalier, D., Mouille, G., Hahn, M.G., Keegstra, K., and Raikhel, N.V.** (2008). *Arabidopsis* XXT5 gene encodes a putative α -1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *The Plant Journal* **56**, 101-115.

- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., and Zhou, J.-M. (2007). A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **1**, 175-185.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7433-7438.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 49-64.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* **16**, 3100-3112.
- Zhong, R., Taylor, J.J., and Ye, Z.H. (1997). Disruption of Interfascicular Fiber Differentiation in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell* **9**, 2159-2170.
- Zhong, R., Burk, D.H., Morrison, W.H., 3rd, and Ye, Z.H. (2004). FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell* **16**, 3242-3259.
- Zhong, R., Pena, M.J., Zhou, G.-K., Nairn, C.J., Wood-Jones, A., Richardson, E.A., Morrison, W.H., III, Darvill, A.G., York, W.S., and Ye, Z.-H. (2005). Arabidopsis Fragile Fiber8, Which Encodes a Putative Glucuronyltransferase, Is Essential for Normal Secondary Wall Synthesis. *Plant Cell* **17**, 3390-3408.
- Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J. (1998). PAD4 Functions Upstream from Salicylic Acid to Control Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1021-1030.
- Zhu, Y., Nam, J., Carpita, N.C., Matthyse, A.G., and Gelvin, S.B. (2003a). Agrobacterium-mediated root transformation is inhibited by mutation of an Arabidopsis cellulose synthase-like gene. *Plant Physiol* **133**, 1000-1010.
- Zhu, Y., Nam, J., Humara, J.M., Mysore, K.S., Lee, L.Y., Cao, H., Valentine, L., Li, J., Kaiser, A.D., Kopecky, A.L., Hwang, H.H., Bhattacharjee, S., Rao, P.K., Tzfira, T., Rajagopal, J., Yi, H., Veena, Yadav, B.S., Crane, Y.M., Lin, K., Larcher, Y., Gelvin, M.J., Knue, M., Ramos, C., Zhao, X., Davis, S.J., Kim, S.I., Ranjith-Kumar, C.T., Choi, Y.J., Hallan, V.K., Chattopadhyay, S., Sui, X., Ziemienowicz,

- A., Matthysse, A.G., Citovsky, V., Hohn, B., and Gelvin, S.B.** (2003b). Identification of Arabidopsis rat mutants. *Plant Physiol* **132**, 494-505.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.
- 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.
- Zolobowska, L., and Van Gijsegem, F.** (2006). Induction of lateral root structure formation on petunia roots: A novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in Hrp mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 597-606.

AUTEUR : Nicolas DENANCE

TITRE : Rôle de la paroi végétale dans l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Ralstonia solanacearum* : criblage de mutants "paroi" et caractérisation fine de la résistance accrue du mutant *walls are thin 1 (wat1)*

DIRECTEURS DE THESE : Deborah Goffner et Laurent Hoffmann

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Vendredi 10 juin 2011, Salle de Conférences Marc Ridet, Campus INRA – Auzeville

De part sa localisation à l'interface entre la cellule et son environnement, la paroi végétale joue un rôle clé lors des interactions avec des agents pathogènes. Au cours de ma thèse, l'importance de la paroi végétale lors de l'infection d'*Arabidopsis* par la bactérie *Ralstonia solanacearum* a été étudiée. Pour cela, une analyse immunocytologique couplée à une approche bioinformatique a permis d'identifier les modifications pariétales induites en réponse à l'infection et de les corrélérer à l'arsenal enzymatique existant chez la bactérie. En parallèle, le crible de mutants "paroi" d'*Arabidopsis* testés pour leur sensibilité à différents agents pathogènes a contribué à ouvrir de nouvelles pistes pour mieux comprendre le rôle de la paroi dans les réponses de défense puisque 28 mutants ont une sensibilité modifiée. L'essentiel de mes recherches a porté sur la caractérisation de *wat1 (walls are thin 1)*, un mutant d'*Arabidopsis* présentant une résistance accrue à *R. solanacearum*. Par des approches génétique, transcriptomique et métabolomique, nous avons pu définir que *wat1* présente une immunité vasculaire et que les mécanismes de résistance impliqueraient une perturbation dans le « crosstalk » entre les métabolismes de l'auxine, des glucosinolates indoliques et de l'acide salicylique au niveau du système racinaire plutôt que des modifications pariétales stricto sensu.

MOTS-CLES : *Arabidopsis*, paroi végétale, *wat1*, *Ralstonia solanacearum*, auxine, acide salicylique, glucosinolates indoliques, immunité vasculaire

DISCIPLINE : Biosciences Végétales

LABORATOIRE : Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV), UMR5546 CNRS/UPS, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville - BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan CEDEX

AUTHOR: Nicolas DENANCÉ

TITLE: Role of the plant cell wall in the *Arabidopsis thaliana* - *Ralstonia solanacearum* interaction: screening of cell wall mutants and detailed characterization of the enhanced resistance of the *walls are thin 1* (*wat1*) mutant

PHD SUPERVISORS: Deborah Goffner and Laurent Hoffmann

PLACE AND DATE OF THE PHD DEFENSE: Friday, June 10th, 2011, Salle de Conférences Marc Ridet, Campus INRA – Auzeville

Due to its location at the interface between the cell and its environment, the plant cell wall plays a key role in interactions with pathogens. During this project, the importance of plant cell walls during infection of *Arabidopsis* by the bacterium *Ralstonia solanacearum* has been studied. First, an immunocytological analysis coupled with a bioinformatic approach allowed us to identify cell wall modifications in response to infection and to correlate them to the cell wall-degrading enzymatic arsenal present in the bacteria. In parallel, the screening of cell wall mutants of *Arabidopsis* for susceptibility to different pathogens led to the identification of twenty eight mutants with altered sensitivity and, as a result, will open new avenues for understanding the role of the wall in defense responses. Much of my PhD research has focused on the characterization of *wat1* (*walls are thin 1*), an *Arabidopsis* mutant with increased resistance to *R. solanacearum*. Through combined genetic, transcriptomic, and metabolomic approaches, we show that *wat1* exhibits vascular immunity, most likely resulting from altered crosstalk between auxin, indole glucosinolate and salicylic acid metabolism in roots rather than in cell wall modifications per se.

KEY WORDS: *Arabidopsis*, plant cell wall, *wat1*, *Ralstonia solanacearum*, auxin, salicylic acid, indole glucosinolate, vascular immunity

DISCIPLINE: Plant Science

LABORATORY: Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV), UMR5546 CNRS/UPS, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville - BP 42617, 31326 Castanet-Tolosan CEDEX