



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Cheval Cécilia

Le 30 Octobre 2013

Titre :

Contribution d'une "Calmodulin-like protein" CML9, et d'un facteur de transcription de type GARP PRR2, à la mise en place des réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana*

ED SEVAB : Développement des plantes

Unité de recherche :

Laboratoire de Recherches en Sciences Végétales (LRSV) UMR5546/CNRS-UPS

Directeur(s) de Thèse :

Ranty Benoît, Chargé de Recherches CNRS, UMR 5546/CNRS-UPS, Castanet-Tolosan

Rapporteurs :

Chinchilla Delphine, Chercheur, Zurich-Basel Plant Science Center, Botanical Institute
Fagard Mathilde, DR INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA AgroParisTech

Autre(s) membre(s) du jury :

Montillet Jean-Luc, Chercheur CEA, UMR7265 CNRS/CEA/Aix-Marseille Université
Moreau Marc, DR CNRS, UMR5547/CNRS-UPS, Toulouse
Arlat Matthieu, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Fagard Mathilde et Mme Chinchilla Delphine pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et les autres membres du jury, Mr Montillet Jean-Luc et Mr Arlat Matthieu pour avoir bien voulu prendre part à ce jury.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse Ranty Benoît, pour m'avoir suivi au cours de ces années de thèse avec un encadrement rigoureux et de qualité.

Je remercie l'ensemble des membres de mon équipe d'accueil d'origine, en particulier les personnes permanentes dont Galaud Jean Philippe, Aldon Didier et Charpentreau Martine, Robe Eugénie, pour avoir participé aussi à cette formation de qualité avec chacun leurs spécificités complémentaires, et surtout leur soutien permanent et leur gentillesse.

Je remercie l'ensemble des membres de la nouvelle équipe Calcium, Mazars Christian, Brière Christian, Thuleau Patrice, Cotelte Valérie et Grat Sabine pour leurs conseils et soutien.

Parmi les personnes non permanentes, je remercie dans un premier temps, les personnes qui ont pu directement m'aider dans mes travaux de recherche, dont Leba Louis-Jérôme, Perochon Alexandre, Perez Manon, Jomat Lucile, Diouf Sarah, Blum Precilia. Merci aussi à Bensoussan Nicolas, Arnoux Xavier, Ghorbel Mouna, Aubert Yann, Dieterle Stefan pour leurs aides, sympathies et bonnes humeurs.

Un grand merci aux services communs du laboratoire et à la plateforme de microscopie et de biochimie, en particulier Catherine, Nicole, Michelle, Jean-louis, Patrick, Patricia, Alain et Sylvie.

Je n'oublie pas non plus, toute l'équipe enseignante du laboratoire pour m'avoir aidé à enseigner à l'université.

Un grand merci aussi aux personnes extérieures de mon laboratoire, autres doctorants pour leurs aides et sympathie.

Je remercie la petite équipe des coureurs du labo, Galaud Jean-Philippe, Albenne Cécile, Carbonne Francis, Sejalon Nathalie, Goué Nadia pour le plaisir des footing du midi, de la ronde du feu, du semi-marathon de Blagnac, du marathon de Toulouse ? J'espère !, qui m'ont permis de « reprendre mon souffle » pendant ces années de thèse.

Un grand merci à tous mes amis de Nouvelle- Calédonie qui ont toujours été là malgré la distance et toutes les personnes géniales que j'ai rencontré en métropole qui sont devenus des amis, Blanquette, Pricillia, Steeve, Marie, Manon, Audrey, Emeline, Diana, Sahar, Rafa, Rafi, Clémentine, Joan, Lolo, Alan, Amaury, Pierre, Benoit, Ronan, Tibo, Micha, Stéphanie, Isabelle(s), Nico et tous ceux que j'ai oublié pour m'avoir permis de résister à ces années de thèse.

Et enfin un très grand merci à toutes les personnes de ma famille, ceux qui sont là et ceux qui sont partis, en particulier mes parents, Michaëla et Roy, mes frères et soeurs, Isabelle, Véronique, Henry, Thierry et Greg, mes neveux et nièces adorés, Grégory, Anthony, Romain, Margot, Laura, Naomie qui m'ont toujours soutenu dans mes projets et m'ont permis de passer ces années de thèse avec une plus grande facilité malgré les 17288 km qui nous séparent.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA	Acide Abscissique
ACC	Acide 1 aminoCyclopropane-1-Carboxylique
ACO	ACC Oxydase
ACS	ACC Synthase
AOC	Allene Oxyde Cyclase
AOS	Allene Oxyde Synthase
AP2/ERF	<i>APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR</i>
ARFs	<i>Auxin Reponse Factors</i>
Aux/IAA	<i>Auxin/Indole Acetic Acid</i>
Avr	Facteur d'avirulence
BAK1	<i>Brassinosteroid Receptor1-Associated Kinase 1</i>
BRI1	<i>Brassinosteroid Insensitive 1</i>
BZIP	<i>Basic leucine ZIPper</i>
<i>CalS</i>	<i>Calloses Synthase</i>
CaM	<i>Calmodulin</i>
CBL	<i>Calcineurin B-Like</i>
CC	<i>Coiled-Coil</i>
CDPKs	<i>Ca²⁺-dependent Proteins Kinases</i>
CeBIP	<i>Chitin-Binding Protein</i>
CERK1	<i>Chitin Elicitor Receptor Kinase 1</i>
CIPKs	<i>CBL-Interacting Proteines Kinases</i>
CML	<i>Calmodulin-Like</i>
COI1	<i>CORONATINE INSENSITIVE 1</i>
CWDEs	<i>Cell-Wall Degrading Enzymes</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
<i>EDS1</i>	<i>Enhanced Disease Suceptibility</i>
EFR	<i>EF-Tu Receptor</i>
ET	Ethylène
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
flg22	Flagelline 22
FLS2	<i>Flagellin-Sensing 2</i>
GAs	Gibbéréllines
GBP	<i>Glucan-Binding Protein</i>
GSH	Gluthation
<i>GSL</i>	<i>Glucan Synthase-Like</i>
GSTF6	Gluthatione-S-transférase 6
HR	<i>Hypersensitive Response</i>
IAN	Indole-3-acetonitrile
IAOx	Indole-3-acetaldoxime
ITCs	Isothiocyanates
JA	Acide Jasmonique
JA-Ile	JA-isoleucine
JAZs	<i>JASMONATE ZIM transcription factors</i>

JMT	Carboxyl methyltransferase
K.O	<i>Knock-out</i>
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
MAMPS	<i>Microbial-associated molecular patterns</i>
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MAPKs	<i>Mitogen-Associated Proteins Kinases</i>
MeJA	Méthyl Jasmonate
NB-LRR	<i>Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat</i>
NDR1	<i>Non-race specific Disease Resistance</i>
NIMIN1	<i>NIM1-INTERACTING1</i>
NO	monoxyde d'azote
NOS	<i>Nitric Oxyde Synthase</i>
NPR1	<i>Non-expressor of PR1</i>
NR	Nitrate Réductase
PAD4	<i>Phytoalexin Deficient 4</i>
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCD	<i>Programmed Cell Death</i>
PCS1	phytochelatine synthase
PDF1.2	<i>PLANT DEFENSIN1.2</i>
PGIP	<i>Polygalacturonase-Inhibiting Protein</i>
PGNs	Peptidoglycanes
PR	<i>Pathogenesis-Related</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae pathovar tomato</i>
PTI	<i>PAMP-Triggerred Immunity</i>
R	Protéine de résistance
RLK	<i>Receptor-Like Kinase</i>
RLPs	<i>Receptor-Like Proteins</i>
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
SA	Acide Salicylique
SAG	SA glycosylé
SAGT	SA glucosyltransférase
SAM	S-adenosyl-méthionine
SAMeT	SA carboxyl méthyltransférase
SIPK	<i>Salicylic Acid-Induced Protein Kinase</i>
SNI1	<i>SUPPRESSOR of npr1 INDUCIBLE1</i>
SST3	Système de sécrétion de type III
T3Es	Effecteurs de type III
TIR	<i>Toll Interleukine Receptor</i>
TIR	<i>Toll Interleukin1R and Resistance</i>
TIR1	<i>Transport Inhibitor Resistant 1</i>
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>
TMV	Virus de la mosaïque du tabac

VSP2

WIPK

Wt

VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2

Wound-Induced Protein Kinase

Wild-type

Sommaire

page

<u>PARTIE I: INTRODUCTION</u>	1
CHAPITRE I: CONCEPTS DE PHYTOPATHOLOGIE	1
<i>Préambule: De la perception du pathogène à la résistance des plantes</i>	1
1. Les défenses des plantes: défenses préformées et défenses induites	2
1.1 Les défenses préformées: un «pare-feu» contre les pathogènes	3
1.2 Les défenses induites: un véritable dialogue moléculaire entre la plante et l'agent pathogène	3
1.2.1 Les mécanismes de perception des agents pathogènes	3
1.2.2 Les voies de signalisations déclenchées par la reconnaissance des agents pathogènes	7
1.2.3 Les réponses de défense	15
2. Stratégies de virulence des pathogènes	19
2.1 Les stratégies mises en place par les pathogènes pour contourner les défenses	19
2.2 Cas particulier de la sensibilité déclenchée par les effecteurs de type III (T3Es)	21
2.2.1 T3Es et virulence bactérienne	21
2.2.2 Voies de signalisation du végétal ciblées par des T3Es	22
CHAPITRE II: SIGNALISATION CALCIUM ET DEFENSE	25
Introduction: Importance du calcium et de la signalisation calcique au cours de stress biotiques	25
Manuscrit Cheval et al., 2013: Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity.	26
En conclusion...	33
CHAPITRE III: TRAVAUX ANTERIEURS ET OBJECTIFS DE THESE	34
1. CML9, une «Calmodulin-like protein» impliquée dans les réponses aux stress	34
1.1 CML9, une protéine apparentée à la calmoduline	34

1.2 Implication de CML9 dans les réponses aux stress abiotiques	34
2. PRR2, un partenaire nucléaire de CML9	35
2.1 Identification des protéines partenaires de CML9	35
2.2 PRR2, un partenaire nucléaire de CML9	36
3. Objectifs du projet de thèse	37
<u>PARTIE II: RESULTATS</u>	38
CHAPITRE I: CONTRIBUTION DE CML9 A L'IMMUNITE VEGETALE DANS UNE VOIE DE SIGNALISATION DEPENDANTE DE LA FLAGELLINE	38
Introduction: Contribution de CML9 dans les réponses aux pathogènes	38
Manuscrit Leba-Cheval et al: <i>CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway.</i>	39
En conclusion....	67
CHAPITRE II: CONTRIBUTION DE PRR2 A L'IMMUNITE VEGETALE	69
Introduction	69
I_PRR2, un facteur de transcription de type GARP impliqué dans les réponses aux pathogènes?	70
1. Analyse du profil d'expression du gène PRR2 au cours du développement et en réponse à des stress	71
1.1 Régulation du gène <i>PRR2</i> au cours du développement	71
1.2 L'expression du gène <i>PRR2</i> est finement régulée au cours du stress biotique	72
1.3 Le gène <i>PRR2</i> est induit dans une voie de signalisation dépendante du SA en réponse à <i>Pst</i> DC3000	73
2. Implication de PRR2 au cours du développement et en réponse au stress biotique	74
2.1 Outils génétiques utilisés	74
2.2 Croissance et développement des lignées <i>PRR2</i>	74
2.3 Contribution de PRR2 à la résistance aux pathogènes	75

2.3.1 Comportement des génotypes <i>PRR2</i> lors d'une inoculation racinaire par la bactérie <i>Ralstonia solanacearum</i>	75
2.3.2 Comportement des génotypes <i>PRR2</i> lors d'une inoculation foliaire par le pathogène <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>	75
2.3.3 Comportement des génotypes <i>PRR2</i> lors d'une infection par le pathogène <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000	76
II_PRR2 un régulateur positif de la défense impliqué dans la production de SA et la production de métabolites de défense en réponse à <i>P. syringae</i>	78
❖ <i>PRR2</i>: un régulateur des réponses de défense au cours de l'infection par <i>Pst</i> DC3000 ?	78
1. PRR2 est impliqué dans l'immunité post-invasive en réponse à <i>Pst</i> DC3000	78
1.1 Infection de plantules cultivées <i>in vitro</i> en milieu liquide	78
1.2 Infection de plantes par pulvérisation	79
2. La contribution de PRR2 à la résistance d'<i>Arabidopsis</i> à <i>P. syringae</i> est dépendante de l'injection d'effecteurs de type III	79
3. PRR2 est impliqué dans la production de SA en réponse à <i>Pst</i> DC3000	81
3.1 L'accumulation de SA est altérée en réponse à <i>Pst</i> DC3000 chez les lignées <i>PRR2</i>	81
3.2 La production du JA n'est pas perturbée en réponse à <i>Pst</i> DC3000 chez les lignées <i>PRR2</i>	81
3.3 La production d'ABA n'est pas perturbée en réponse à <i>Pst</i> DC3000 chez les lignées <i>PRR2</i>	82
4. PRR2 est impliqué dans la production de composés antimicrobiens en réponse à <i>Pst</i> DC3000	82
4.1 PRR2 est un régulateur positif de la production de camalexine en réponse à <i>Pst</i> DC3000	82
4.2 PRR2, un régulateur de la production de glucosinolates en réponse à <i>Pst</i> DC3000?	82
4.3 PRR2 est un régulateur de l'accumulation de papilles de callose en réponse à la flg22	83
❖ <i>PRR2</i>: un régulateur de l'expression de gènes de défense en réponse à <i>Pst</i> DC3000?	84
1. Est-ce que les lignées altérées dans l'expression de PRR2 présentent des altérations majeures de l'expression génique en réponse à <i>Pst</i> DC3000?	84

2. Est-ce que les lignées altérées dans l'expression de PRR2 présentent des altérations majeures de l'expression génique en réponse à la flg22? Approche transcriptomique	86
2.1 Les génotypes <i>PRR2</i> présentent des altérations de l'expression de gènes marqueurs de la voie flg22 en réponse à un traitement par ce PAMP	86
2.2 Analyse du transcriptome chez les lignées <i>PRR2</i> en réponse à la flg22	87
2.2.1. Analyse de l'expression génique par l'approche CATMA	87
2.2.2 PRR2 et expression des gènes impliqués dans des voies de défense en réponse à la flg22	87
2.2.2.1. PRR2, un régulateur de l'expression des gènes impliqués dans des voies de signalisation SA en réponse à la flg22?	89
2.2.2.2. PRR2, un régulateur des processus associés au stress oxydatif en réponse à la flg22?	90
2.2.2.3 PRR2, un régulateur positif de la voie des glucosinolates, de la camalexine et de la production de papilles de callose en réponse à la flg22?	91
III_Est-ce que PRR2 régule d'autres fonctions au cours de la croissance et du développement?	92
1. Analyse transcriptomique globale	92
2. PRR2 régule les fonctions chloroplastiques et les processus de sénescence au cours de la croissance et du développement	93
2.1 PRR2 régule positivement l'expression de gènes associés aux fonctions du chloroplaste	93
2.2 L'expression de gènes de stress est particulièrement affectée chez le surexprimeur <i>p35s::PRR2.2</i>	93
2.3 L'expression de gènes impliqués dans les processus de sénescence est fortement altérée chez le mutant <i>K.D. prr2.1</i>	94
3. Analyse <i>in silico</i> du promoteur des gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique globale	94
Discussion...	96
<u>PARTIE III: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	102

<u>PARTIE IV: MATERIEL ET METHODES</u>	112
I_Matériel biologique	112
II_Obtention et caractérisation des lignées transgéniques	114
III_Protocole d'infection des plantes par des pathogènes bactériens	115
IV_Méthodes d'analyse moléculaires	117
V_Méthodes d'analyse biochimiques	119
VI_Méthodes d'analyses statistiques	121
VI_Méthodes d'analyses <i>in silico</i>	121
<u>PARTIE V: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	122
<u>DONNEES SUPPLEMENTAIRES</u>	141

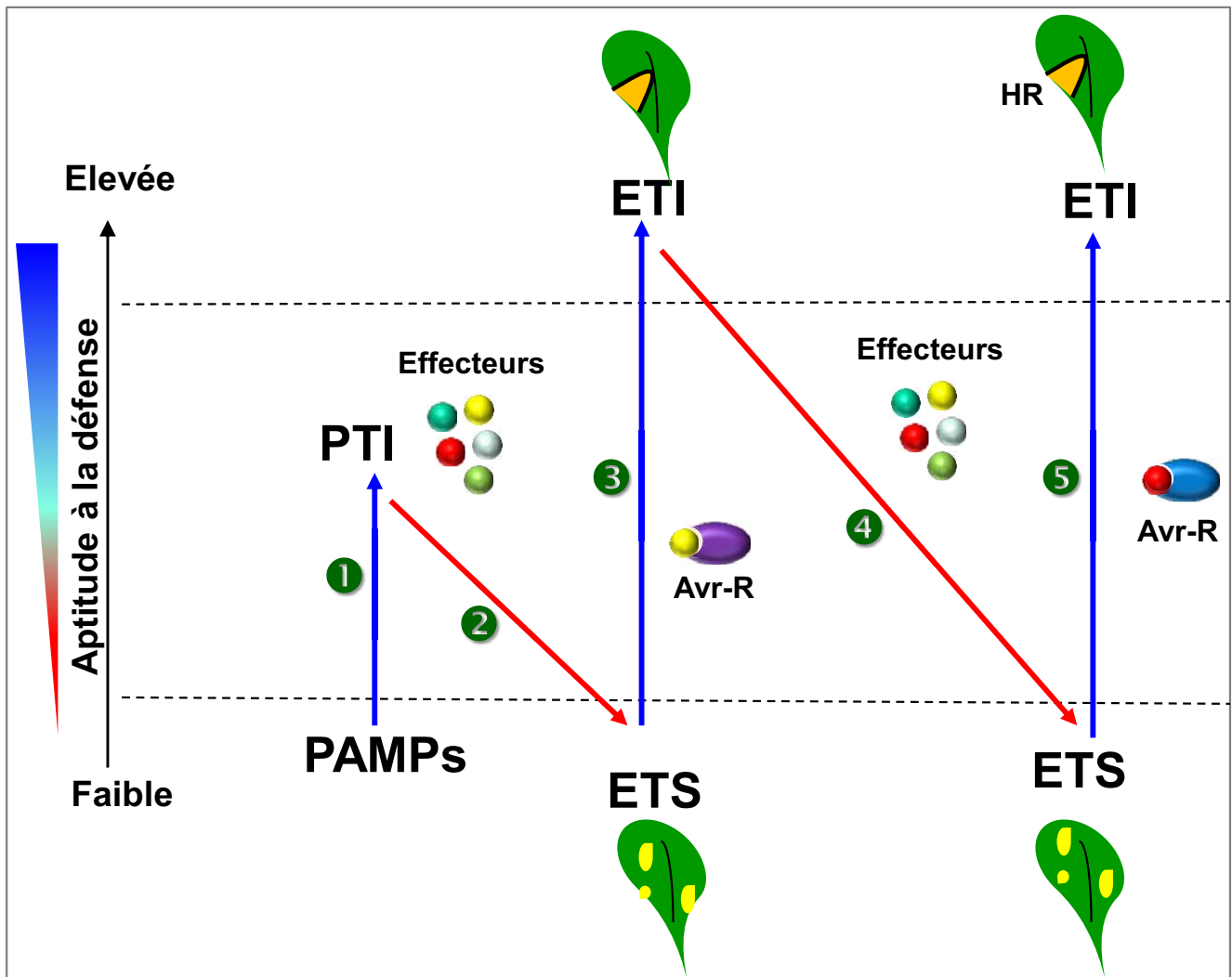


Figure 1.1.1: Le modèle d'immunité végétale dit en "zig-zag" (modifié d'après Jones et Dangl, 2006)

Dans une première phase ❶, les plantes détectent les PAMP microbiens via les récepteurs PRR et mettent en place la **résistance basale** (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*). Puis, dans une deuxième phase, dans le cas de pathogènes hôtes il y a sécrétion d'effecteurs qui vont interférer avec la résistance basale et favoriser le développement de l'agent pathogène, résultant en une sensibilité de la plante ❷ (ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*). Dans une troisième phase, un effecteur (en jaune) est reconnu par une **protéine R** qui déclenche la **résistance spécifique** ❸ (ETI, *Effector-Triggered Immunity*), souvent accompagnée d'une réaction hypersensible (HR). Dans la quatrième phase, les agents pathogènes ayant perdu l'effecteur jaune et éventuellement gagné d'autres effecteurs (en rouge) sont sélectionnés ❹. Chez la plante, la sélection va favoriser de nouveaux allèles de gènes R ❺, capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, résultant en la résistance spécifique et la HR.

PARTIE I: INTRODUCTION

CHAPITRE I: CONCEPTS DE PHYTOPATHOLOGIE

Préambule: de la perception du pathogène à la résistance des plantes

Du fait de leur immobilité, les plantes sont constamment exposées à des micro-organismes dont certains pathogènes. Dans la majorité des cas, la maladie reste un cas exceptionnel car au cours de l'évolution, les plantes ont développé des stratégies efficaces afin de résister aux agressions. Dès leur premier contact avec les plantes, les micro-organismes phytopathogènes sont confrontés aux barrières de **défense préformées** qui empêchent le pathogène de pénétrer les tissus de l'hôte. Lorsque les micro-organismes parviennent malgré tout jusqu'à l'apoplasme, la plante déclenche des **mécanismes de défense dits «activés»** ou induits qui résultent de la perception et de la reconnaissance de son agresseur (Jones and Dangl, 2006). L'issue de l'interaction entre une plante et un agent pathogène, c'est-à-dire la résistance ou la maladie, dépend de l'efficacité de ces défenses activées.

La résistance est déclenchée par la **perception de motifs présents chez les micro-organismes**, appelées MAMPS (*microbial-associated molecular patterns*) dans le cas de micro-organismes non pathogènes et PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) dans le cas des micro-organismes pathogènes. Les PAMPs sont des signaux moléculaires importants pour la survie des pathogènes et très conservés, dont la reconnaissance par les récepteurs PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de la plante suffit à déclencher les défenses de la plante appelées **PTI** (*PAMP-Triggered Immunity*, **figure I.I.1**). Les défenses préformées et les défenses activées par la reconnaissance des PAMPs font partie de **la résistance dite «non-hôte»** (**figure I.I.2**). Ce type de résistance est observée lorsque tous les individus d'une espèce de plante (ou cultivars), exhibent une résistance face à des micro-organismes non adaptés.

Bien que la résistance non hôte soit très efficace, chaque plante est sensible à un petit nombre d'agents pathogènes. En effet, certains ont développé différentes stratégies de virulence leur permettant de contourner les défenses. **L'injection d'effecteurs** dans les cellules végétales qui affaiblissent les défenses des plantes en fait partie. La plante met en place des défenses qui constituent la **résistance basale** afin de limiter la propagation des pathogènes. Ces derniers continuent cependant de proliférer et de contourner les défenses, ce processus est appelé **ETS** (*Effector-Triggered Susceptibility*, **figure I.I.1**) et conduit à la **maladie**.

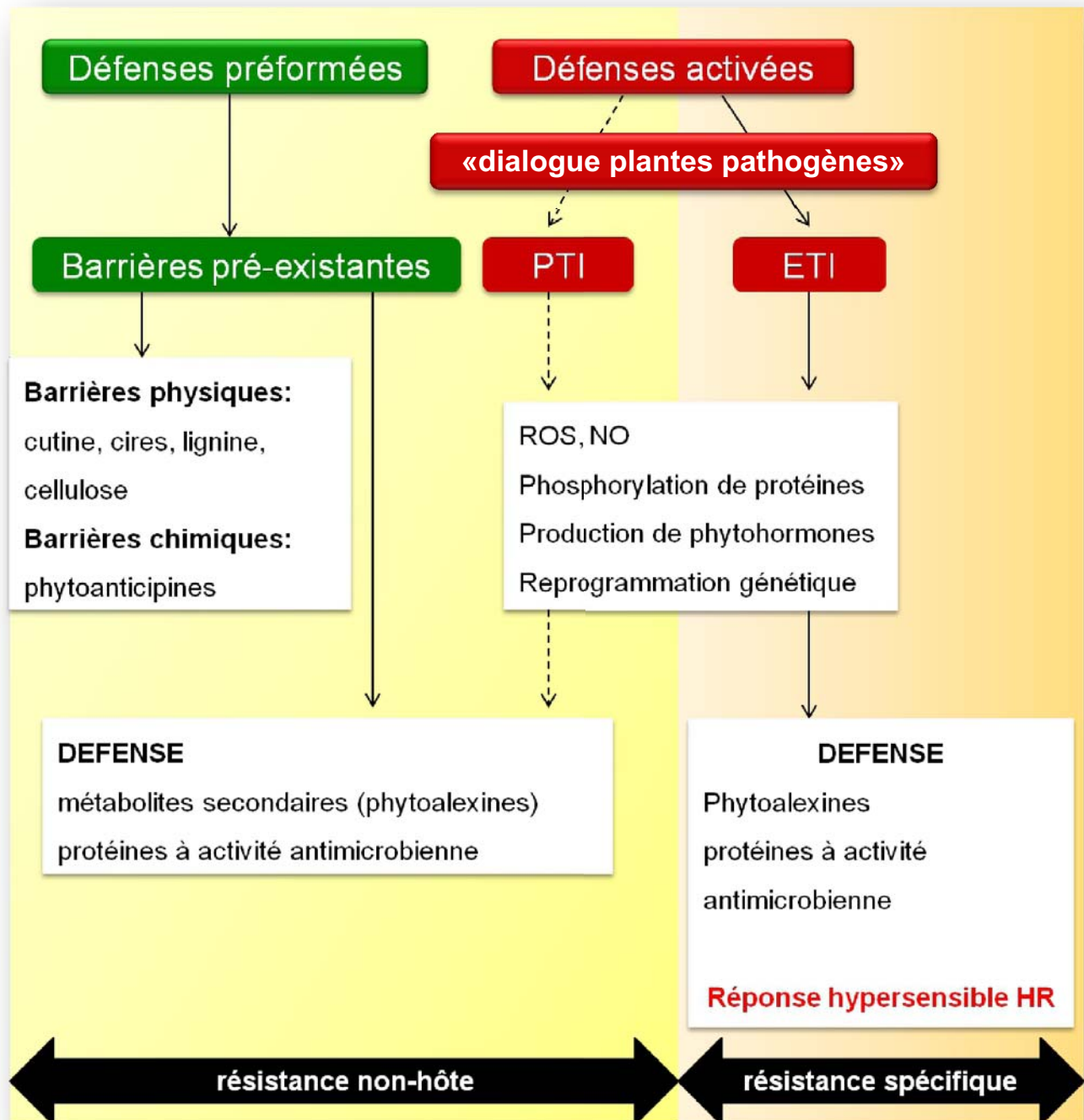


Figure 1.1.2: Représentation schématique des différentes barrières de défense impliquées au cours de la résistance non-hôte et de la résistance spécifique.

Lorsqu'un agent pathogène entre en contact avec la plante, il est confronté tout d'abord aux défenses préformées telles que les barrières physiques (cuticule, cires...) et chimiques (phytoanticipines, composés antimicrobiens...). Lorsque les micro-organismes surmontent ce premier niveau de défense, les plantes mettent en place un deuxième niveau de défenses activé par la reconnaissance des microbes *via* la PTI (*PAMP-triggered immunity*) et l'ETI (*Effector-triggered immunity*). La PTI se manifeste par l'activation d'une cascade de processus de signalisation (Production de ROS, de NO, phosphorylations...) qui aboutit à la mise en place des défenses. Les défenses préformées et les défenses associées à la PTI sont des formes de résistance non-hôte. L'ETI consiste en la reconnaissance spécifique des effecteurs du pathogène par la plante et résulte en la mise en place de réponses de défense plus durables et plus intenses comme la HR (réponse hypersensible), on parle de résistance spécifique.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé un système de **reconnaissance des effecteurs** qui conduit à la mise en place de défenses plus efficaces, ce processus est définie sous le terme d'ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (**figure I.I.1**). Ce type de **résistance spécifique** nécessite que la plante hôte possède la (ou les) **protéines de résistance** (R) capable(s) de reconnaître une souche donnée d'un agent pathogène qui porte l'effecteur correspondant, appelé dans ce cas **facteur d'avirulence** (Avr). L'ETI est cependant rapidement surpassée par l'évolution de nouveaux effecteurs qui échappent à la reconnaissance des protéines de résistance.

Dans ce chapitre seront illustrées la mise en place des défenses préformées et activées des plantes en réponse à la reconnaissance des micro-organismes pathogènes (**1**) et les différentes stratégies de contournement et de neutralisation des défenses développées par ces agents pathogènes (**2**).

1. Les défenses des plantes: défenses préformées et défenses «activées»

1.1 Les défenses préformées: un «pare-feu» contre les pathogènes

La grande majorité des réponses de défense sont subdivisées en deux catégories: **les défenses préformées** et les défenses activées suite à la reconnaissance d'un microorganisme pathogène ou non (**figure I.I.2**). Le premier niveau de défense des plantes est constitué par des **barrières physiques** et **chimiques préexistantes** qui ont pour fonction d'empêcher les micro-organismes de pénétrer les tissus de l'hôte. Différents éléments présents à la surface des feuilles au niveau épidermique comme les **cires**, la **cuticule** et les **trichomes** sont des barrières physiques qui empêchent les agents pathogènes fongiques et bactériens de s'introduire dans les tissus végétaux. La cuticule est composée essentiellement de cutine et de cires formant l'épicuticule. Cette structure constitue un obstacle infranchissable pour certaines bactéries phytopathogènes. Les **polymères structuraux de la paroi végétale** telle que la lignine et les fibres de cellulose assurent également une protection passive très efficace. Aussi, pour infecter les plantes, les micro-organismes n'ont d'autres choix que de s'introduire par les ouvertures naturelles comme les stomates et hydathodes, ou au niveau des zones de blessures comme par exemple les zones d'émergence des racines latérales. Une fois présents dans l'apoplasme, ils doivent faire face à des barrières «chimiques» telles que des **peptides/protéines antimicrobien(ne)s** à large spectre d'action et des **métabolites secondaires** qui viennent renforcer les défenses préformées. Les métabolites secondaires sont des composés de faible masse moléculaire et de nature chimique très variée spécifiques aux plantes. Ces métabolites sont de différentes natures: phénoliques, terpénoïdes et des isothiocyanates (Nürnberger and Lipka, 2005), ils peuvent être diffusibles ou volatiles, ils sont stockés dans des compartiments cellulaires spécifiques et dans des cellules spécialisées. Les saponines par exemple sont des métabolites secondaires produits constitutivement chez de nombreuses plantes et qui sont bien décrits dans la littérature pour leur activité antifongique (Mysore and Ryu, 2004).

Un grand nombre de plantes possède également des métabolites à activité antimicrobienne appelés **phytoanticipines**. Ces composés sont **toxiques** contre un grand nombre d'insectes

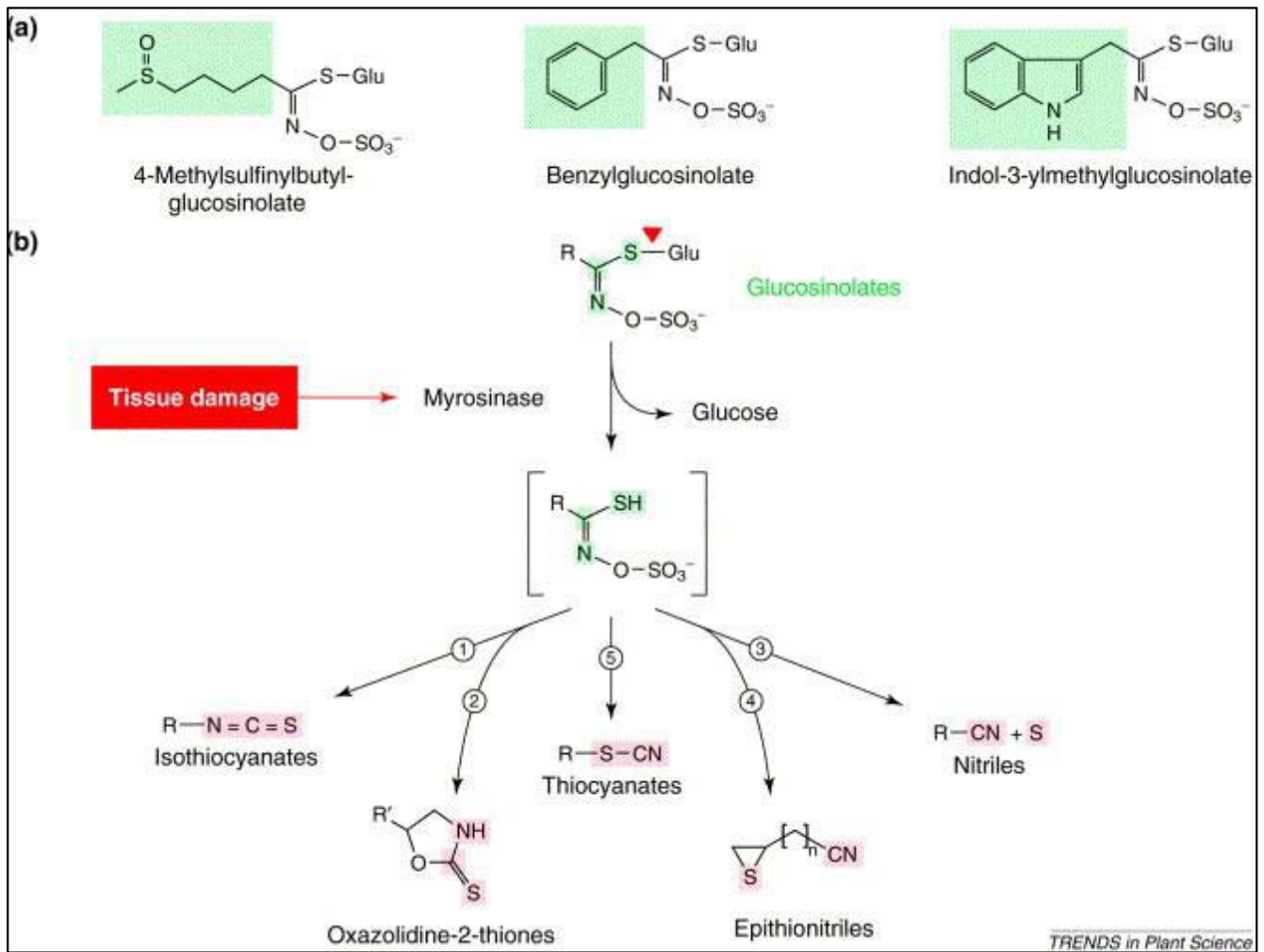


Figure 1.1.3: Le système glucosinolates-myrosinase (modifié d'après Wittstock, 2002)

(a) Exemples des structures aliphatique, aromatique et indolique des glucosinolates (en vert)

(b) Les glucosinolates sont hydrolysés par des myrosinases. Après hydrolyse, les glucosinolates forment une structure instable qui est réarrangée en différents composés (en rose): les isothiocyanates, les oxazolidine-2-thiones, les thiocyanates, les epithionitriles et les nitriles. (R: chaîne variable).

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

herbivores, de champignons et bactéries phytopathogènes (González-Lamothe et al., 2009). Ces composés sont produits avant que les plantes ne soient en contact avec un agent pathogène lorsque les tissus sont endommagés par exemple ou bien après interaction avec un micro-organisme mais seulement à partir de précurseurs déjà formés. Certains de ces métabolites sont présents en surface, d'autres sont séquestrés dans les vacuoles et organites et relâchés par l'action de myrosinases (β -glucosidases), après attaque par le pathogène. C'est le cas notamment des **glucosinolates**, dérivés d'acides aminés comme le tryptophane qui forment une classe majeure de phytoanticipines, présents chez les brassicacées dont *Arabidopsis* (Gonzalez-Lamothe et al., 2009, Morant et al., 2008). Ils sont généralement regroupés en fonction de leur structure en glucosinolates aliphatiques, aromatiques et indoliques. Dans des tissus non endommagés, les glucosinolates sont stockés dans des compartiments cellulaires et subcellulaires différents des myrosinases. L'hydrolyse des glucosinolates résulte en la production d'un composé glycosylé instable qui est **dégradé sous forme d'isothiocyanates (ITCs)**. Les ITCs ont une **activité antibiotique** et contribuent de ce fait aux défenses des plantes (**figure 1.1.3**, Wittstock and Gershenzon, 2002). De manière intéressante, les glucosinolates et les ITCs ne seraient pas seulement une barrière chimique préformée mais seraient également induits au cours des défenses activées par la reconnaissance du pathogène (Bednarek, 2012a). Ces défenses activées constituent l'issue de nombreux événements de signalisation nécessaires à l'activation des défenses basales. Les acteurs de ces voies de signalisations impliquées dans la mise en place de ces défenses sont décrits ci-après.

1.2 Les défenses activées: un véritable dialogue moléculaire entre plantes et pathogènes

La perception d'un agent pathogène par la plante est la première étape de la mise en place d'un véritable «**dialogue moléculaire**» entre la plante et un micro-organisme. La perception de l'agent pathogène réside plus particulièrement dans la **reconnaissance des PAMPs qui déclenchent la PTI**. Bien que ce processus soit très efficace puisqu'il permet de déclencher les réactions de défense en réponse à un grand nombre de pathogènes, ces derniers sont capables cependant de neutraliser les défenses basales *via* l'action d'effecteurs dans les cellules végétales. Cependant, les plantes disposent des **protéines de résistance qui reconnaissent ces effecteurs**. Cette reconnaissance a pour conséquence l'induction de réactions de **défense plus intenses et durables**. Dans cette partie introductive, il sera présenté tout d'abord comment les plantes sont capables de reconnaître les PAMPs et les effecteurs des agents pathogènes (**1.2.1**). Il sera évoqué par la suite les différentes voies de signalisation (**1.2.2**) et réponses de défense (**1.2.3**) activées au cours du dialogue entre la plante et un micro-organisme pathogène.

1.2.1 Les mécanismes de perception des agents pathogènes

❖ *Au cours de la PAMP-Triggered-Immunity (PTI)*

C'est la découverte des **TLRs (Toll Like Receptors)** chez les mammifères qui a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des PRRs dans l'immunité (Medzhitov and Janeway, 1997). Les TLRs appartiennent à une famille multigénique de protéines transmembranaires qui possèdent un

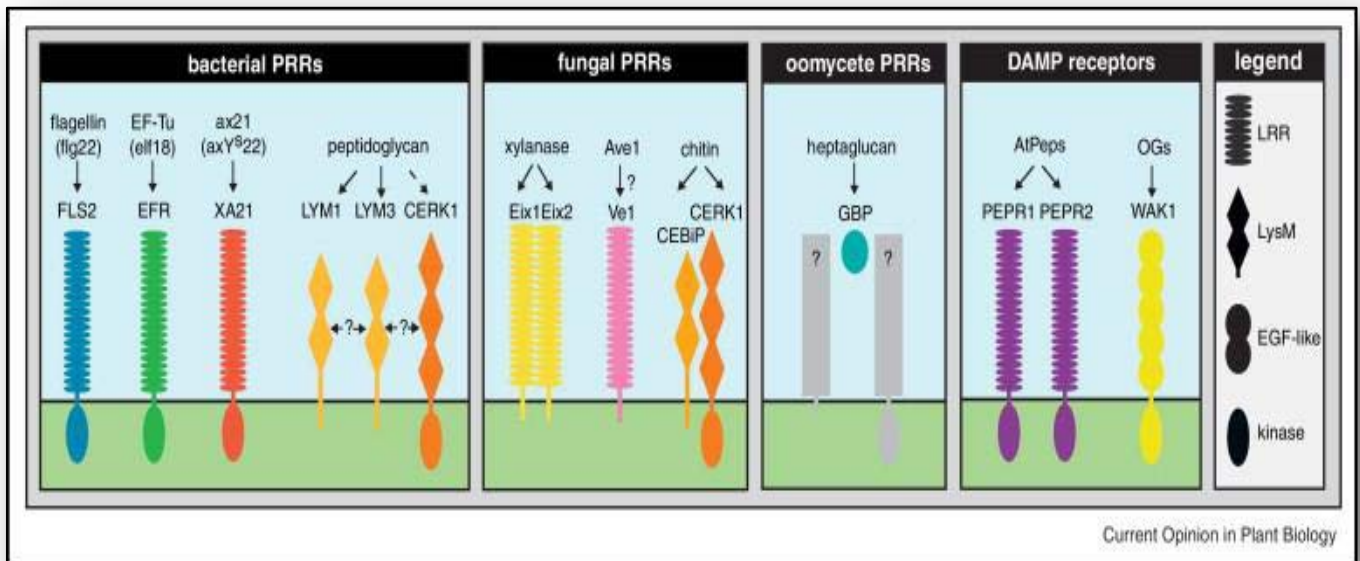


Figure 1.1.4: Reconnaissance des PAMPs par les PRRs (modifié d'après Monaghan and Zipfel, 2012)

FLS2 est un récepteur de type LRR-RLK qui reconnaît la flagelline des bactéries (dont le motif reconnu est flg22) chez *Arabidopsis*, la tomate, *Nicotiana benthamiana* et le riz. Chez les Brassicacées, EFR, un autre LRR-RLK reconnaît le facteur d'élongation Tu (dont l'épitope est elf18). Le peptide axY²² présent chez les bactéries du genre *Xanthomonas* serait reconnu par le LRR-RLK XA21 chez le riz. Les LysM-RLPs LYM1 and LYM3 sont les récepteurs du peptidoglycane des bactéries (PGN), qui lierait également le LysM-RLK CERK1 chez les champignons, la xylanase est reconnue par les LRR-RLPs Eix1 and Eix2 de la tomate. Ave1 serait un ligand putatif pour le LRR-RLP Ve1 chez la tomate. Chez le riz, le LysM-RLP CEBiP lie la chitine et interagit avec le LysM-RLK CERK1. Chez les légumineuses, une protéine extracellulaire de type «β-glucan-binding protein» (GBP) lierait l'heptaglucane de *Phytophthora*. Les LRR-RLKs PEPR1 and PEPR2 lie les peptides AtPeps relâchés par la paroi lorsque celle-ci est endommagée, et le RLK WAK1, est le récepteur aux oligogalacturonides (OGs) pariétaux.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

domaine TIR (*Toll Interleukine Receptor*) intracellulaire très conservé et un domaine LRR (*Leucine Rich Repeats*) extracellulaire très variable qui interagit directement ou indirectement avec les PAMPs (O'Neill, 2008).

Les plantes possèdent un système de perception des micro-organismes assez similaire à celui des animaux. A l'heure actuelle, un nombre très limité de PRRs ont été caractérisés chez les plantes (**figure I.1.4**). La plupart sont des **protéines transmembranaires de type RLK** (*Receptor-Like Kinases*) similaires aux TLRs retrouvés chez les animaux ou des **RLPs** (*Receptor-Like Proteins*). Ces PRRs sont capables de reconnaître une grande diversité de **PAMPs d'origine et de nature très variée: (glyco)protéines, lipides et oligosaccharides** (Monaghan and Zipfel, 2012).

Les **composés pariétaux et membranaires des champignons** comme les β -glucanes, les ergostérols ou la chitine fonctionnent comme des PAMPs capables d'induire des réactions de défense. Chez le riz, il a été montré que la chitine est perçue par des PRRs de type RLK CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*), nécessaire à l'élicitation des réactions de défense ainsi que par des protéines de haute affinité CeBIP (*Chitin-Binding Protein*) (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010), **figure I.1.4**). Chez la tomate, les récepteurs aux xylanases Eix1 et Eix2 de type RLP ont pu être identifiés (Ron and Avni, 2004). Chez les oomycètes, des molécules lipidiques telles que l'acide arachidonique, les β -hepta-glucanes sécrétés par la plupart des espèces de *Phytophthora*, provoquent des réponses de défense incluant une mort cellulaire localisée et une résistance systémique acquise chez le tabac (Yu, 1995). Bien que l'on connaisse des sites de haute affinité comme les GBP (*Glucan-Binding Protein*) pour les hepta-glucanes de *Phytophthora sojae* (Kaku et al., 2006) aucun récepteur d'oomycète n'a pu être identifié à ce jour (**figure I.1.4**).

Chez les bactéries, il existe de nombreux **PAMPs** comme les LPS (lipopolysaccharides) présents au niveau de la membrane externe des bactéries gram négatives et les PGNs (peptidoglycanes) des bactéries gram positives. Les peptidoglycanes sont perçus par des récepteurs de type RLPs possédant un motif LysM, comme LYM1 et LYM3, et seraient également capables de lier avec moins d'affinité le récepteur CERK1 à la chitine (Greeff et al., 2012). Des **protéines bactériennes cytoplasmiques** peuvent aussi induire des défenses végétales. Ainsi, le motif peptidique RNP-1 situé dans la partie N-terminale de protéines «*cold-shock*» chez les bactéries gram-positives et négatives provoquent une résistance chez les Solanacées (Felix and Boller, 2003). Ces protéines intracellulaires peuvent être également sécrétées, présentes au niveau membranaire ou libérées de bactéries mortes. En ce qui concerne les PAMPs de nature protéique, la protéine complète ou des motifs protéiques conservés suffisent à induire les réactions de défense. C'est le cas des deux PAMPs bactériens les plus étudiés: la flagelline et le facteur d'élongation EF-Tu. La **flagelline** est une protéine de structure du flagelle bactérien qui possède un peptide de 22 acides aminés dans sa partie terminale, dit flg22 très conservé et suffisant pour déclencher les réponses immunitaires (Felix et al., 1999). Bien que la flagelline soit présente chez un grand nombre de micro-organismes, elle n'est pas toujours reconnue par la plante. Le peptide elf18 correspond à la partie N-terminale du **facteur d'élongation de la traduction EF-Tu**, protéine bactérienne intracellulaire responsable de l'induction des défenses chez les Brassicacées (Kunze et al., 2004). Chez *Arabidopsis*, flg22 et elf18 sont respectivement reconnus par les RLK FLS2 (*Flagellin-Sensing 2*) et EFR (*EF-Tu Receptor*) (Chinchilla et al., 2006; Zipfel et al., 2006). D'autres systèmes de perception des PAMPs existent probablement et sont activement recherchés notamment parmi les très nombreux RLKs codées par le génome d'*Arabidopsis*. Il pourrait

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

aussi s'agir d'autres protéines sécrétées ou cytoplasmiques comme c'est le cas chez le soja avec le récepteur GBP de l'heptaglucone.

Les réponses de défense des plantes peuvent aussi être activées par des **composés végétaux**, d'origine pariétale libérés par l'action des pathogènes microbiens, des insectes ou des herbivores. Ces composés révélateurs d'un soi «attaqué» sont appelés **DAMPs** pour «*Damage-Associated Molecular Patterns*». C'est le cas des oligo-galacturonides libérés des parois végétales sous l'action des enzymes hydrolytiques fongiques et perçus par le récepteur de type RLK WAK1 (Brutus et al., 2010). D'autres composés pariétaux comme les peptides AtPeps d'*Arabidopsis* sont reconnus par les récepteurs de type LRR-RLKs PEPR1 and PEPR2 (Krol et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010).

L'identification des PRRs a permis de confirmer l'importance de la perception des PAMPs dans l'activation des défenses ou PTI. Des mutants *fls2* d'*Arabidopsis* par exemple sont plus sensibles à l'infection par *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000, Zipfel et al., 2004). Il existe différents niveaux de **spécificité de reconnaissance** des PAMPs. Certains PAMPs sont très conservés entre les règnes et pourraient être perçus par un même récepteur chez la plante. C'est le cas de Ave1, un peptide très conservé chez les champignons et chez certaines bactéries du genre *Xanthomonas* qui serait reconnu par le récepteur de type LRR-RLP Ve1. Il a été montré chez la tomate que Ve1 contribue à la résistance contre les champignons *Verticillium* et *Fusarium oxysporum*. La liaison directe entre Ave1 et Ve1 reste cependant à démontrer. Une espèce végétale donnée peut également présenter une sélectivité de reconnaissance de certains PAMPs et pas d'autres (de Jonge et al., 2012). Ainsi, *Arabidopsis* est capable de percevoir elf18 et flg22 mais pas Pep13, dérivé d'une protéine de *Phytophthora sojae* (Zipfel et al., 2006). D'autre part, la contribution d'un PRR donné dans l'immunité végétale varie selon le micro-organisme considéré. Chez *Arabidopsis*, FLS2 est important dans la défense contre *Pst* DC3000 (Zipfel et al., 2004) mais il n'influence pas la croissance de souches virulentes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Sun et al., 2006). Bien que la reconnaissance des PAMPs soit spécifique, les **voies de signalisations activées** en aval des mécanismes de perception **sont redondantes**. Ainsi, la perception d'un PAMP donné par son PRR conduit à une **résistance contre divers pathogènes**.

Ce niveau de défense contribue aussi bien à la réduction de la croissance de pathogènes virulents que de pathogènes avirulents (Katagiri et al., 2002). Il a récemment été montré que CERK1 contribue aussi à l'immunité contre les bactéries (Gimenez-Ibanez et al., 2009). De plus, Lacombe (2010) a récemment montré que l'expression d'*AtEFR* qui est spécifique des Brassicacées permet d'établir des réponses de défense à elf18 conférant une meilleure résistance de ces tomates transgéniques aux bactéries.

Ainsi, malgré le rôle critique qu'ils exercent au cours de l'immunité, l'état actuel des connaissances de la diversité et du mode de fonctionnement des PAMPs est encore à ses débuts. La plupart des études se sont focalisées sur un nombre restreint de PAMPs et une meilleure compréhension des mécanismes de perception des PAMPs permettrait de mieux appréhender l'impact de la PTI sur la résistance des plantes à la maladie.

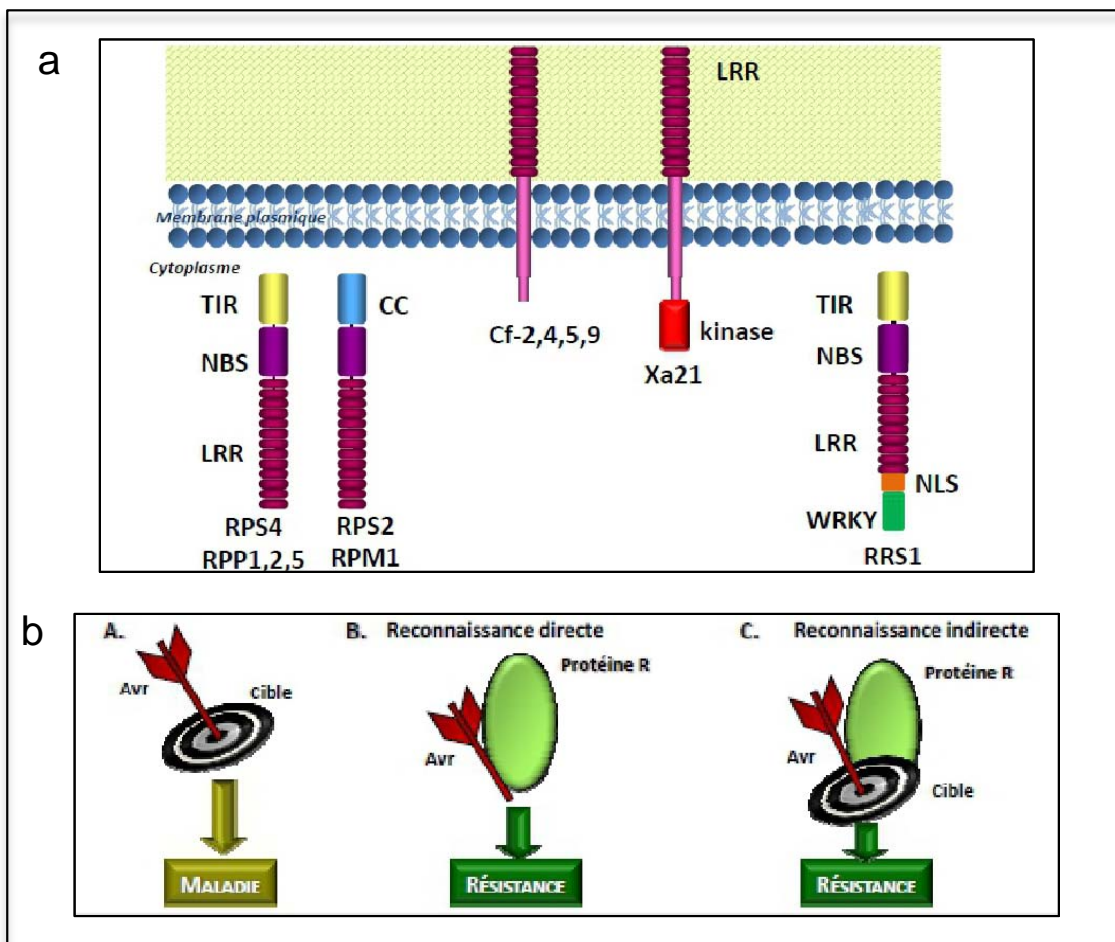


Figure 1.1.5.: La résistance spécifique chez les plantes

a. Représentation schématique de la structure des protéines R, participant à la résistance. (modifié d'après Hammond-Kosack et Parker, 2003)

La plupart des protéines de résistance sont cytosoliques et présentent un domaine LRR associé à un domaine NBS (*Nucléotide Binding Site*), site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. L'ensemble des protéines à NBS-LRR peut être subdivisé en deux sous-groupes selon la structure de leur domaine N-terminal : soit un domaine *Coiled-Coil* (CC) soit un domaine TIR (*Toll-Interleukine 1 Receptor*). Ces deux classes comprennent la plupart des protéines de résistance connues. Certaines sont transmembranaires avec le domaine LRR situé à l'extérieur de la cellule. C'est le cas des protéines Cf conférant la résistance à *Cladosporium fulvum* chez la tomate. D'autres domaines additionnels peuvent être observés, en particulier des domaines classiques de transduction du signal comme le domaine kinase intracellulaire de Xa21 (conférant la résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chez le Riz) ou le cas de RRS1 qui présente un site d'adressage nucléaire et un domaine WRKY (confère la résistance à *Ralstonia solanacearum* chez *Arabidopsis*).

Abréviations: RPP: *Resistance to Peronospora parasitica*, RPS: *Resistance to Pseudomonas syringae*, RPM1 : *Resistance to Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, Cf: *Resistance to Cladosporium Fulvum*, Xa21: *Resistance to Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, TIR : *Toll-Interleukine 1 Receptor*, CC : *Coiled-Coil*, LRR: *Leucine Rich Repeat*, NLS: *Nuclear Localisation Site*, WRKY: *site de liaison à l'ADN*.

b. Schématisation des systèmes de reconnaissance R/Avr.

A. Interaction compatible. Des facteurs de virulence (Avr) de la bactérie cible des protéines végétales. Les modifications qu'ils entraînent peuvent leur permettre d'échapper aux mécanismes de défense. La plante est alors sensible et la maladie peut se développer.

B & C. Interactions incompatibles. Soit la protéine R interagit directement avec le facteur d'avirulence (cas rare) (**B**), soit elle "surveille" la cible végétale. Dans ce cas, la protéine R détecte l'interaction du facteur bactérien et de sa cible végétale (**C**), et enclenche alors l'activation rapide des mécanismes de défense. La plante est résistante. On peut parler dans ce dernier cas de modèle de garde.

❖ Au cours de l' Effector-Triggered Immunity (ETI)

Les bactéries sont capables d'injecter des effecteurs par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III à l'intérieur de cellules végétales. Ces effecteurs ont pour fonction principale d'assurer l'infection par le pathogène en supprimant les défenses de la plante. Comme cela est décrit dans le «modèle en zig-zag» de Jones and Dangl, (2006, [figure I.1.1](#)), les plantes ont développé des systèmes de reconnaissance de ces effecteurs très sophistiqués pour contrer l'infection. Au cours de l'évolution, il s'est établie une véritable course moléculaire entre les pathogènes et la plante hôte puisque l'apparition d'un effecteur du pathogène appelé dans ce cas **facteur d'avirulence (Avr)** conduit à l'évolution par la plante hôte d'une **protéine de résistance (R)** capable de reconnaître cet effecteur. Cette interaction facteur d'avirulence/protéine de résistance a été définie sous le terme de «**résistance gène pour gène**» par Flor en 1971. Le modèle génétique développé par Flor décrit que la résistance spécifique s'établit dès que la plante possède le gène R correspondant au gène Avr porté par l'agent pathogène. Dans ce cas, la résistance se manifeste par une **mort cellulaire localisée** au site d'infection, dite **HR (Hypersensitive Response)** et par l'inhibition de la croissance du pathogène. Dans toute autre situation, la plante s'avère être sensible et cette sensibilité se traduit par le développement de la maladie.

Jusqu'à maintenant, les protéines de résistance décrites dans la littérature sont des **NB-LRR proteins (Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat)** qui détectent les effecteurs et conduisent à l'induction de très fortes réponses de défense. Chez *Arabidopsis*, près de 150 protéines sont prédites pour être des NB-LRR. L'**interaction** entre les effecteurs et les protéines NB-LRR peut être soit **directe**, soit **indirecte** par l'intermédiaire de protéines accessoires qui forment un complexe avec les protéines NB-LRR. Les protéines NB-LRR forment **2 groupes** qui se distinguent par la présence en position N-terminale d'un motif appelé **CC (Coiled-Coil)** ou d'un motif **TIR (Toll Interleukin1R and Resistance)**. Parmi les protéines de type CC-NB-LRR, celles qui confèrent la résistance à *P. syringae* sont bien décrites dans la littérature ([figure I.1.5](#)). La protéine Prf de la tomate est nécessaire pour la reconnaissance des effecteurs AvrPto et AvrPtoB. Chez *Arabidopsis*, la protéine RPM1 reconnaît les effecteurs AvrRPM1 et AvrB et la protéine RPS2 reconnaît AvrRpt2. Concernant les TIR-NB-LRR, la protéine de résistance RPS4 qui reconnaît l'effecteur AvrRps4 est le modèle le plus connu chez *Arabidopsis*. Malgré les nombreux travaux réalisés dans ce domaine ces dernières années, les processus moléculaires qui permettent aux protéines NB-LRR d'être activées après reconnaissance de l'effecteur sont encore méconnus. Cependant, les mécanismes de reconnaissance indirecte des effecteurs par la plante hôte commencent à être élucidés (Van der Biezen and Jones, 1998; Dangl and Jones, 2001). Un des mécanismes de reconnaissance indirecte développé par les plantes consiste à incorporer dans un complexe NB-LRR une protéine qui sert de «proie» en mimant les caractéristiques de l'effecteur cible. Ce phénomène a été présenté sous forme d'un modèle appelé «**modèle de garde**» ([figure I.1.5](#)). Pour illustrer ce modèle on peut citer l'exemple de la protéine de résistance RPS5 d'*A. thaliana* et le produit d'avirulence AvrPphB de *P. syringae*. En effet cet effecteur AvrPphB interagit avec la protéine PBS1 et entraîne sa dégradation, ce qui a pour effet de provoquer son autophosphorylation. La protéine RPS5 se lie alors à ce fragment protéique phosphorylé et déclenche les mécanismes de résistance (Mudgett, 2005).

Une autre classe de gènes R codent pour des **protéines LRRs extracellulaires ou eLRRs**. Cette classe se subdivise en 3 groupes selon leur structure: les **RLPs (Receptor-Like Proteins)**, les **RLKs** qui

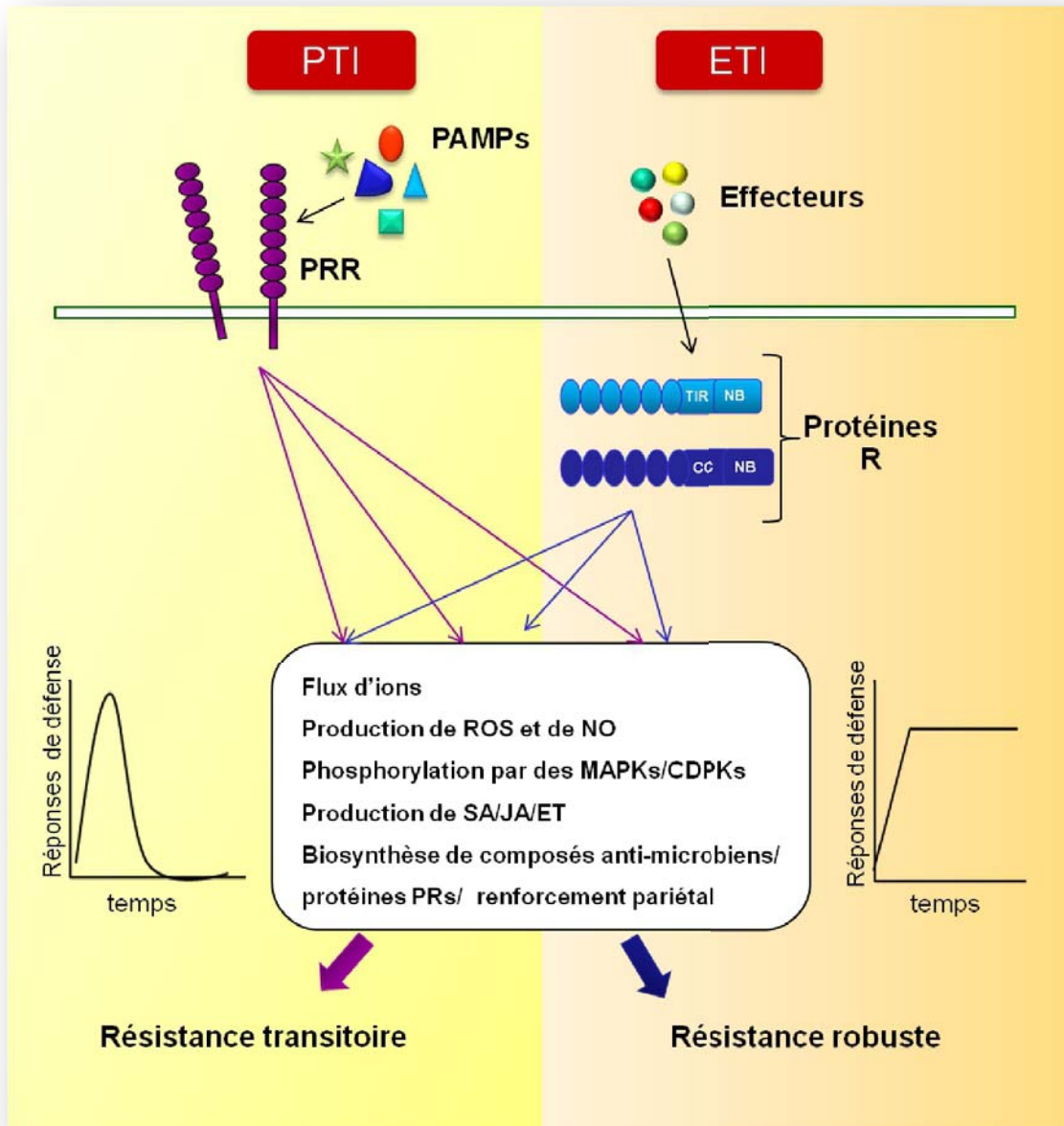


Figure 1.1.6: Les voies de signalisation déclenchées par la reconnaissance d'un agent pathogène sont utilisées différemment au cours de la PTI et de l'ETI (modifié d'après Tsuda, 2010).

La reconnaissance des PAMPs par les PRRs au cours de la PTI et des effecteurs par les protéines R au cours de l'ETI déclenche des cascades de signalisation complexes. Bien que les voies de signalisation utilisées au cours de la PTI et de l'ETI puissent être communes, l'efficacité des réponses de défense et la résistance qui résulte de l'activation de ces voies est différente. Les réponses de défense induites au cours de la PTI sont transitoires alors qu'elles sont durables au cours de l'ETI. Il existerait des relations synergiques entre les différentes voies de signalisation empruntées au cours de la PTI et des relations compensatoires au cours de l'ETI. Ces relations croisées expliqueraient la vulnérabilité de la résistance induite au cours de la PTI et la robustesse de la résistance induite au cours de l'ETI.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

possèdent un domaine kinase cytoplasmique et les **PGIP** (*Polygalacturonase-Inhibiting Protein*). Parmi les RLPs les mieux caractérisés, les gènes *Cf* de la tomate confèrent la résistance à l'infection par le pathogène biotrophe de la tomate *Cladosporium fulvum*. Des analyses biochimiques des protéines secrétées par ce pathogène au cours de sa croissance dans les feuilles de tomate ont conduit à l'identification des facteurs d'avirulence Avr2, Avr4 et Avr9 reconnus par les gènes de résistance correspondants *Cf-2*, *Cf-4* et *Cf-9*. Il existe également des protéines de résistance qui n'appartiennent à aucune de ces classes et qui présentent un motif particulier. C'est le cas de la protéine RRS1-R qui reconnaît des effecteurs de *Ralstonia solanacearum*. Cette protéine possède non seulement la structure des TIR-NB-LRR mais également un motif de localisation nucléaire et un domaine d'activation transcriptionnel de type WRKY (Deslandes et al., 2003).

1.2.2 Les voies de signalisations déclenchées par la reconnaissance des agents pathogènes

La reconnaissance des PAMPs et des effecteurs des agents phytopathogènes mène à l'activation de cascades de signalisation complexes, responsables de nombreux changements moléculaires et physiologiques. Plusieurs travaux ont mis en évidence qu'il existerait des acteurs «communs» aux voies de signalisation associées à la PTI ou ETI bien que les réponses de défenses induites dans ce dernier cas sont beaucoup plus robustes. Il a été suggéré que ces événements de signalisation communs agissent de manière synergique au cours de la PTI alors qu'ils agissent de manière compensatoire au cours de l'ETI (**figure I.1.6**, Tsuda and Katagiri, 2010). Parmi les premiers événements figurent des **modifications de la perméabilité de la membrane plasmique** détectées dès les cinq premières minutes de l'interaction avec un agent pathogène. Ces modifications se manifestent par des flux d'ions et par des variations de la concentration en calcium intracellulaire. Les flux d'ions agissent en amont d'autres événements cellulaires, en particulier une **production de monoxyde d'azote (NO)** et d'**Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)** ainsi que l'activation d'une **cascade de phosphorylation** impliquant des protéines de type MAPKs (*Mitogen-Associated Proteins Kinases*) et CDPKs (*Ca²⁺-dependent Proteins Kinases*). L'implication de la signalisation calcique dans les défenses constitue une partie de mes travaux de thèse et sera abordée de manière plus détaillée dans la **PARTIE II**. Par ailleurs, les **composés hormonaux** tels que l'**acide salicylique (SA)**, l'**acide jasmonique (JA)** et l'**éthylène (ET)** constituent des éléments clefs de signalisation et induisent des réponses de défenses. C'est la coordination de l'ensemble de ces éléments de signalisation qui orchestre les événements plus tardifs qui conduisent aux réponses de défense. Ces événements plus tardifs consistent en l'activation de facteurs de transcription qui entraînent une **reprogrammation génétique** et des modifications physiologiques de la plante en réponse au pathogène. Les défenses se traduisent généralement par la biosynthèse de **composés antimicrobiens**, de **protéines PR** (*Pathogenesis-Related*) et par un **renforcement de la paroi**. Tous ces mécanismes enclenchés permettent ainsi aux plantes de résister efficacement contre un agent pathogène.

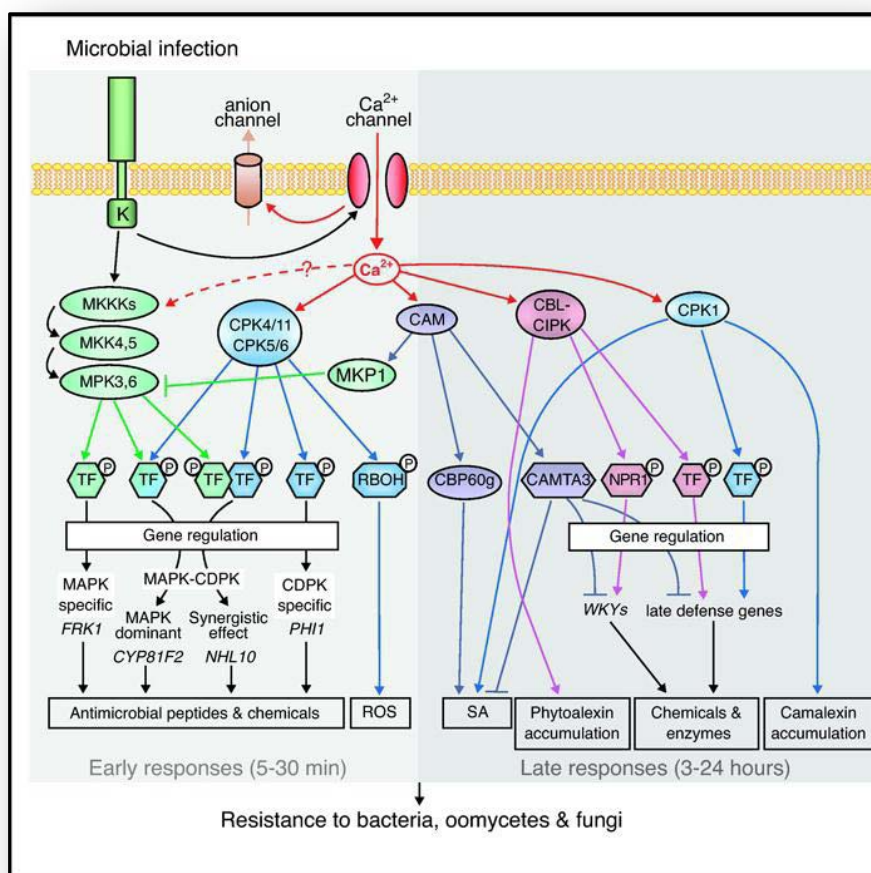


Figure I.I.7: Contribution des CDPKs et MAPKs aux voies de signalisation déclenchées lors d'interactions plantes – pathogènes. (Modifié d'après Tena, 2011)

La perception de microorganismes provoque un rapide influx de calcium, régulant des efflux d'anions, la production de ROS et l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse de composés antimicrobiens. Les CDPKs interviennent dans ces réponses en régulant probablement des régulateurs de la transcription. La régulation génique des réponses tardives (entre l'heure et le jour) inclut la production de SA, de phytoalexines, de camalexine et d'autres composés de défense. Toutes ces réponses sont modulées positivement ou négativement par les CaM1, CBL-CIPKs et CDPK1. La plupart des substrats de ces protéines kinases sont inconnus à l'exception de NPR1, une protéine clé de la signalisation SA dépendante qui est phosphorylée par CIPK11. Ce complexe et la régulation calcique contribue à la résistance chez les plantes aux bactéries, oomycètes et champignons.

❖ La phosphorylation et déphosphorylation de protéines

Les cascades de signalisation qui conduisent à la résistance impliquent de nombreux événements associés à des modifications post-traductionnelles et en particulier l'état de phosphorylation de certaines protéines associées à des processus de régulation (figure I.1.7). En plus de récepteurs spécifiques, d'autres protéines peuvent être impliquées indirectement dans la reconnaissance des PAMPs et joueraient un rôle d'**adaptateur de signalisation** comme **BAK1** (*Brassinosteroid Receptor1-Associated Kinase 1*; Zipfel, 2009). BAK1 a été découvert comme partenaire de BRI1 par génétique et double hybride (Nam and Li, 2002). Il joue un rôle majeur dans la **signalisation hormonale** impliquant les brassinostéroïdes au cours du développement (Nam and Li, 2002). Le rôle de BAK1 dans l'immunité est d'activer les PRRs et permettre la transmission du signal extracellulaire dans le cytoplasme où il active les voies de défenses ce qui a pour conséquence finale de promouvoir la résistance. Il a été découvert que BAK1 forme un complexe avec le récepteur FLS2 de manière flg22 dépendante et qu'un traitement flg22 induit une phosphorylation rapide de BAK1 et de FLS2 (Schulze et al., 2010). Ainsi, en interagissant avec différents récepteurs aux PAMPs, BAK1 pourrait servir d'acteur commun qui activerait les mécanismes de **défense basale**. Il a été démontré par exemple que la production de ROS et l'expression de gènes de défense sont particulièrement altérés chez des mutants *bak1* d'*Arabidopsis* ou de *N.benthamiana* en réponse à une grande variété de PAMPs (Heese et al., 2007). Cependant, le mécanisme qui permet à BAK1 de promouvoir la résistance des plantes est encore méconnu. BAK1 pourrait activer notamment la voie des MAPKs puisque l'activité de la MPK6, normalement induite en réponse à la flg22 est compromise chez des mutants *bak1* d'*Arabidopsis* ou de *N.benthamiana* (Heese et al., 2007). Par ailleurs, un autre récepteur kinase cytoplasmique BIK1, qui interagit physiquement avec BAK1 et FLS2 pourrait être un acteur additionnel dans la résistance induite par BAK1. De manière intéressante, BAK1 n'est pas seulement impliqué dans la résistance contre des micro-organismes pathogènes mais également dans la mise en place des défenses en réponse à des insectes herbivores (Yang et al., 2011). BAK1 est rapporté comme étant un régulateur positif des défenses associées à l'accumulation de JA en réponse à un insecte herbivore (*Manduca sexta*) de *Nicotiana attenuata* (Yang et al., 2011). **BAK1 serait donc un véritable adaptateur de signalisation, capable de déclencher des réponses communes de différents stress de nature biotique.**

Parmi les protéines kinases impliquées dans les cascades de signalisation associées aux défenses figurent les **MAPKs** (Mitogen-Activated Protein Kinases, figure I.1.7). Ces protéines participent à des **cascades de phosphorylations** retrouvées aussi bien chez les insectes, les mammifères que chez les plantes (Nürnberg et al., 2004). Ces cascades impliquent généralement trois types de protéines kinases: les MAPK kinase kinases (**MAPKKK**), les MAPK kinases (**MAPKK**) et les MAPK. En réponse à un stimulus, une MAPKKK active par phosphorylation une MAPKK, qui à son tour phosphoryle une MAPK qui devenue active, transmet à son tour le signal. L'activation transitoire de cette cascade de MAPKs est l'une des réponses observées dès la première minute qui suit le traitement par des PAMPs (Asai et al., 2002; Tena et al., 2011). La plupart des recherches réalisées sur les MAPKs d'*Arabidopsis* se focalisent sur 3 des membres de cette famille multigénique: MPK3/6 et MPK4 qui ont des fonctions partiellement redondantes. Après traitement par la flg22, MAPKKK (MEKK1) phosphoryle MKK4 et MKK5 (MAPKK), responsables de l'activation de MPK3/6 (Ren et al., 2008). Plus récemment, il a été démontré que la perte de fonction d'une autre MAPK, MPK11 est responsable d'une sensibilité exacerbée à la flg22 (Bethke et al., 2012).

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

Les MAPKS participent à l'**activation de réponses de défense** incluant l'expression de gènes *PR* et au contrôle du métabolisme secondaire, ainsi que l'induction de la HR. Par exemple, MPK4, MPK3 et MPK6 régulent l'expression du gène *PAD3* qui code une enzyme impliquée dans la synthèse des phytoalexines en réponse à *P. syringae* et en réponse à *B. cinerea* (Qiu et al., 2008; Ren et al., 2008). De plus l'expression de formes constitutivement actives de MAPKK4/5 stimule MPK3/6 qui régulent l'expression de gènes marqueurs de la voie flagelline. Des mutants pertes de fonction *mekk1 mpk4* qui sont très fortement affectés dans leur développement, produisent également plus de SA et montrent une expression forte des gènes *PRs* (Suarez-Rodriguez et al., 2007). **Peu de cibles sont connues**; parmi celles-ci, ACS2 et ACS6 enzymes clef de la biosynthèse de l'éthylène sont des substrats directs de la MPK6 d'*Arabidopsis* (Liu and Zhang, 2004). Des facteurs de transcription de type WRKY sont également induits en réponse à une souche virulente de *P. syringae* via MKS1 (*MAP Kinase 4 Substrate 1*), une cible directe de la MAPK4 (Andreasson et al., 2005 ; Pitzschke et al., 2009). D'autres MAPKS sont activées chez le tabac en réponse au virus de la mosaïque du tabac (TMV), WIPK (*Wound-Induced Protein Kinase*) et SIPK (*Salicylic Acid-Induced Protein Kinase*). Le rôle précis de ces MAPKS dans les réponses de défense n'a pas encore été élucidé mais des approches pharmacologiques suggèrent toutefois que SIPK et WIPK pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de gènes de défense et de la mort cellulaire déclenchée par la cryptogéine chez le tabac (Zhang and Klessig, 2001).

Une grande variété de PAMPs induit des variations de Ca^{2+} qui sont à l'origine de réponses de défenses. Les protéines capables de lier, décoder et de relayer le message Ca^{2+} induisent des cascades de phosphorylation ou des interactions protéines/protéines qui font l'objet de nombreuses études (**figure I.I.7**). Les dernières avancées portant sur la caractérisation de ces senseurs de calcium ont montré que certaines **CDPKs**, **CBL/CIPKs** (*Calcineurin B-Like/CBL-Interacting Proteines Kinases*), les CaMs (*Calmodulins*) et CMLs (*Calmodulin-like proteins*) sont impliquées dans divers aspects de l'immunité. Ma thèse portant en partie sur l'étude d'une CML dans la mise en place des réactions de défense, le rôle des CaMs et CMLs sera développé de manière détaillée dans la **PARTIE II**, et je présenterai ici uniquement l'implication des senseurs de calcium qui induisent des cascades de phosphorylations au cours de l'immunité.

Spécifique des plantes (et de quelques protistes), la famille des **CDPKs** (ou CPKs) est en grande partie responsable des réponses faisant intervenir des **activités kinases** dépendantes du calcium chez ces organismes. Chez *Arabidopsis*, trente-quatre gènes de CDPKs ont été annotés (*AtCPK1-AtCPK34*) et codent des protéines composées d'un domaine variable en N-terminal, d'un domaine serine/thréonine kinase très conservé qui porte l'activité catalytique, d'un domaine inhibiteur, qui en se liant au site catalytique, inhibe l'activité kinase et d'un «*CaM-Like Domain*» en C-terminal constitué de quatre motifs «*EF-hand*» responsables de la liaison au Ca^{2+} (Cheng et al., 2002; Klimecka and Muszyńska, 2007). Les CDPKs contribuent à la **sensibilité/résistance à différents agents pathogènes**. En effet, ces protéines interviennent très précocement (dans les 5-30min) en **réponse aux PAMPs** en régulant la production de ROS et l'expression génique (Kobayashi et al., 2006; Tena et al., 2011). Entre 4 et 12h après infection, elles contribuent également à la **régulation des processus de signalisation** (accumulation de phytohormones) et dans les **réponses de défense** (production de phytoalexines, expression des gènes *PR*; Coca and San Segundo, 2010). Les CDPKs interviennent aussi au cours des interactions plantes/herbivores. Chez *Arabidopsis*, un criblage a été réalisé sur 19 mutants *cpks* exposés à la présence d'un insecte herbivore *Spodoptera littoralis*. Certains de ces mutants présentent une altération de l'expression de gènes marqueurs de défense après contact

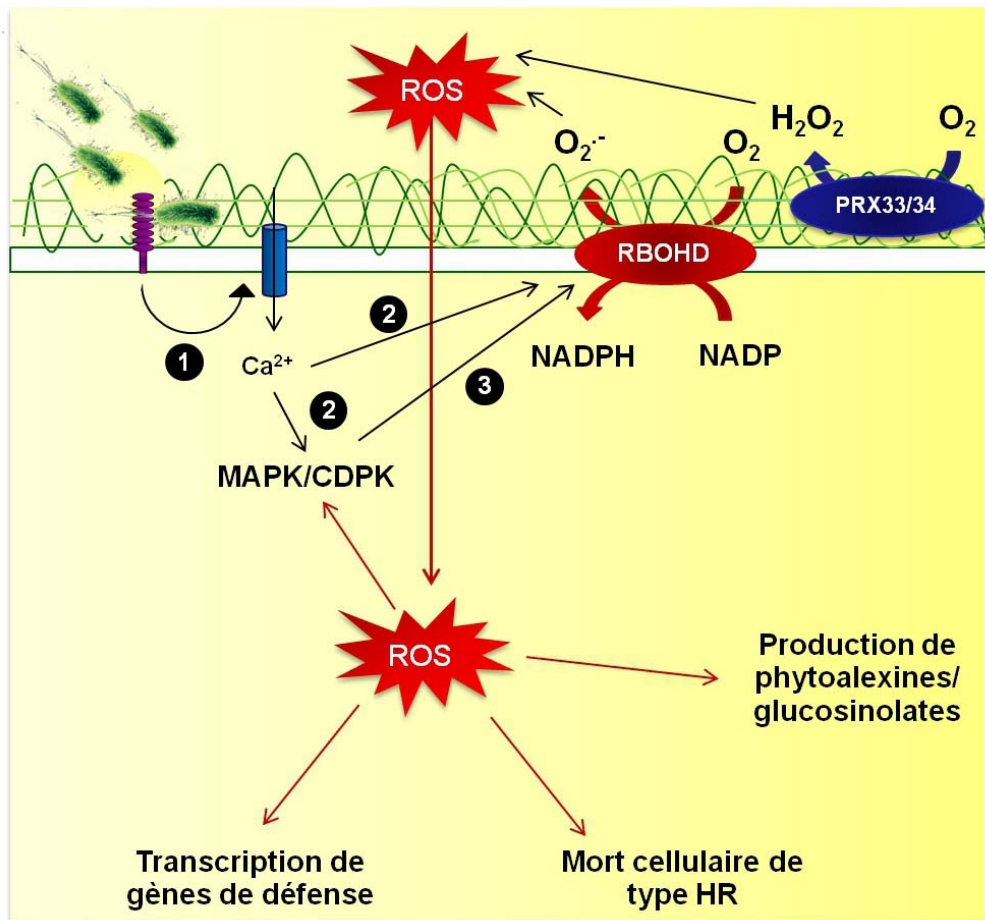


Figure I.I.8: Sources et rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au cours des interactions plantes/pathogènes.

La reconnaissance d'un agent pathogène conduit à une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule ① qui permet d'une part de promouvoir la liaison d'ions Ca^{2+} aux motifs EF-hands présents sur RBOH ② et d'autre part de stimuler l'activité de CDPKs et MAPKs ② qui peuvent phosphoryler RBOH ③. Ceci a pour conséquence de stimuler l'activité de cette enzyme. L'activation de ces mécanismes a pour conséquence la production de ROS. D'autres enzymes présentes au niveau de la paroi comme les peroxidases 33/34 (PRX 33/34) vont également permettre une production de H_2O_2 en réponse aux pathogènes. Les ROS vont diffuser dans le cytosol et activer les voies des MAPKs/CDPKs ainsi que plusieurs réponses de défense comme l'expression de gènes marqueurs de défense, la production de phytoalexines et de glucosinolates et conduire à une mort cellulaire de type HR pour limiter la propagation du pathogène.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

avec l'insecte (Kanchiswamy et al., 2010) suggérant que les CDPKs pourraient jouer un rôle dans les réponses à de multiples bio-agresseurs.

Comme les CDPKs, les **CBLs** sont des senseurs de calcium à motifs *EF-hands* **spécifiques du règne végétal**. Ils régulent une famille de protéines kinases spécifiques des plantes, les **CIPKs** (*CBL-Interacting Protein Kinases*). Les CIPKs interagissent *via* leur région C-terminale avec les CBLs provoquant ainsi le déploiement de la partie effectrice de la CIPK, et l'activation de la kinase. L'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana* prédit environ 10 CBLs et 25 à 30 CIPKs et donc le nombre de combinaisons et de fonctions possibles pour ce couple de protéines est potentiellement important (Battistich and Kudla, 2009). Le rôle et le mode de fonctionnement des CBLs/CIPKs dans l'immunité sont encore très peu décrits. Les travaux réalisés démontrent cependant que les CIPKs sont impliquées dans la mise en place des défenses **en réponse à des PAMPs et à des bactéries phytopathogènes**. OsCIPK14/15 seraient responsables de l'expression de gènes PR, de la biosynthèse de phytoalexines et de la mise en place de la mort cellulaire chez des cultures cellulaires de riz soumises à un traitement par des PAMPs de champignons (Kurusu et al., 2010). De plus, CIPK11 serait responsable de la phosphorylation de NPR1, un activateur clé de la voie de signalisation SA après infection par un pathogène bactérien (Xie et al., 2010).

L'ensemble de ces données nous indique que **les cascades de phosphorylations déclenchées par les CDPKs/CIPKs et MAPKs sont essentielles au bon fonctionnement des défenses** au cours du stress biotique, et ce aussi bien lors de la PTI que de l'ETI. Bien que le mode de fonctionnement de ces protéines soit encore peu décrit, elles doivent agir de manière synergique ou non pour pouvoir déclencher les réponses de défenses, c'est le cas notamment des MAPKs et des CDPKs (Boudsocq et al., 2010).

❖ Implication des espèces activées de l'oxygène dans les défenses

Parmi les premiers signes de l'activation des réactions de défense déclenchées par la reconnaissance d'un agent pathogène, on observe une production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) communément appelée «**burst oxydatif**» (**figure I.1.8**). Les cellules végétales produisent des ROS de différentes natures comprenant notamment des **radicaux superoxydes** (O_2^-) et **hydroxyl** (OH), du **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) et du **monoxyde d'azote** (NO). L'accumulation rapide et localisée de H_2O_2 est l'une des premières réponses à l'infection par des micro-organismes. Dans le cas d'infection par des **bactéries phytopathogènes**, une **production biphasique de ROS** est souvent observée. L'analyse de ces données montre que le premier pic, observé serait associé à la reconnaissance des PAMPs alors que le deuxième pic qui apparaît plusieurs heures après l'infection serait associé à la HR mise en place au cours de l'ETI (Allan and Fluhr, 1997; Mittler et al., 2004). L'application exogène de PAMPs provoque également une production d' H_2O_2 rapide et transitoire dans les minutes suivant leur application (Mittler et al., 2004). Comme tous les radicaux libres, les ROS sont **toxiques** et agissent sur la structure des protéines, sur l'ADN et sur les lipides membranaires pour réduire la photosynthèse et accélérer les processus de sénescence et de mort cellulaire, créant ainsi un environnement hostile qui limite la propagation du pathogène dans les tissus de l'hôte.

En plus de cet effet antimicrobien, les ROS sont des éléments de signalisation impliqués dans la mise en place de la **résistance des plantes**. Ces molécules sont en effet requises pour l'activation des MAPKs, l'induction de **l'expression de gènes** marqueurs de défense, la **production de métabolites**

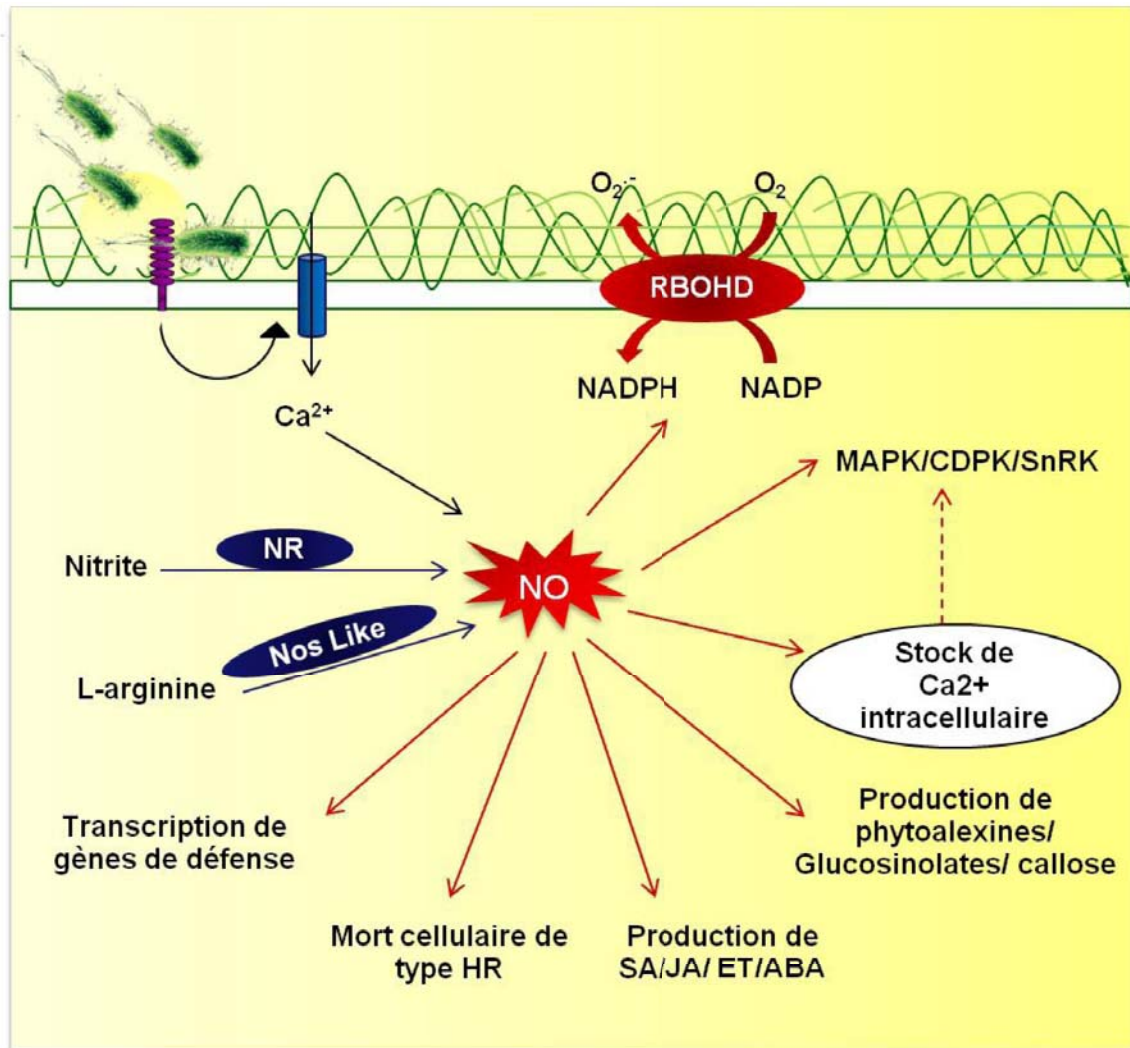


Figure 1.1.9: Biosynthèse et signalisation du monoxyde d'azote (NO) au cours des interactions plantes/pathogènes (modifié d'après Wimalasekera, 2011).

En réponse à un agent pathogène, le NO peut être synthétisé à partir de nitrite par la nitrate reductase (NR) et à partir de la L-arginine par une nitrite oxide synthase like enzyme (*Nos-like*). L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par la reconnaissance d'un agent pathogène est responsable également d'une augmentation de la production de NO. Le NO à son tour induit une augmentation de la concentration en calcium à l'intérieur de la cellule en activant les canaux calciques intracellulaires. La production de NO associé à ce relargage du calcium dans le cytosol régule l'activité de CDPKs, de MAPKs et de certaines SnRK2 (sucrose non-fermenting –related protein kinase 2). Dans ces conditions le NO module plusieurs réponses cellulaires comme l'expression de gènes de défense, la production de phytohormones, la production de métabolites secondaires, l'activité NADPH oxydase et la mort cellulaire de type HR.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

secondaires (phytoalexines et glucosinolates), la **mort cellulaire** et pour l'établissement de la **résistance systémique acquise** (Kotchoni and Gachomo, 2006; O'Brien et al., 2012). Des approches génétiques ont révélé depuis plusieurs années la contribution majeure des **NADPH oxydases** (nommées RBOHs chez les plantes) et des **peroxydases de type III** dans la production de ROS associée à la résistance des plantes. En effet, les gènes *RbohD* et *RbohF* codant pour la NADPH oxydase sont indispensables à l'accumulation de ROS et à la résistance lors d'interactions incompatibles entre *A. thaliana* et *Hyaloperonospora arabidopsidis* ou avec la souche avirulente de *P. syringae* pv. *tomato* (Torres et al., 2006; Daudi et al., 2012). Il a été démontré que les CDPKs pourraient jouer un rôle en régulant les NADPH oxydases par phosphorylation (Kobayashi et al., 2007). D'autres travaux ont également montré qu'une mutation de la «*French Bean peroxidase 1*» (FBP1) chez *P. vulgaris* provoque une diminution de la production d'H₂O₂ en réponse à des extraits de champignons et entraîne une sensibilité exacerbée à différents agents pathogènes (Bindschedler et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, des mutants pour des peroxydases de classe III *Atprx33* *Atprx34* traités par des PAMPs, présentent une diminution de la production de ROS. Celle-ci s'accompagne également d'une sensibilité exacerbée à *P. syringae*, d'une diminution de l'accumulation de glucosinolates et d'une dérégulation de l'expression de gènes de défense (Daudi et al., 2012).

Des travaux ont révélé que le **NO** joue un rôle particulier parmi les ROS dans la régulation de différentes **réponses de résistance** et notamment dans la mise en place de la **HR** (figure I.1.9). Une production significative de NO en réponse à un traitement par des **PAMPs** et en réponse à certains pathogènes peut être mesurée (Lamotte et al., 2004; Melotto et al., 2006). Au cours de la PTI, le NO serait indispensable au maintien de l'état redox de la cellule. Il contribuerait à l'activation de **gènes de défense** et à la formation de dépôts de **callose** (Sun and Li, 2012). En réponse à un agent pathogène avirulent, le NO est considéré comme un second messenger qui stimule les réponses de défense de type HR. En effet, des cellules de soja infectées par *P. syringae* présentent une augmentation de la concentration en NO concomitante avec la mise en place de la HR (Sun and Li, 2012, figure I.1.9). **Deux voies de production** du NO ont été identifiées chez les plantes, la première proviendrait de la réduction des nitrites *via* la **nitrate réductase** (NR) (Lamotte et al., 2004), la deuxième proviendrait de l'action d'enzymes à activité **NOS** (*Nitric Oxide Synthase*) à partir de L-arginine. Guo, (2003) a identifié une enzyme *NOS-like*, *AtNOS1/NOA1*, chez *Arabidopsis* impliquée dans la régulation de la production de NO en réponse à l'acide abscissique (Guo et al., 2003; Zemojtel et al., 2006). L'importance du NO dans l'activation des mécanismes de résistance a été démontrée en utilisant des plantes déficientes pour la production de NO. Ainsi, des plantes mutées dans le gène *AtNOS1* sont dix à cent fois plus sensibles que les plantes sauvages à la bactérie virulente *Pst* DC3000 (Zeidler et al., 2004). **Ces différents résultats illustrent l'importance du NO dans les mécanismes de signalisation durant la PTI et l'ETI.**

Ces expériences ont également permis de mettre en évidence que le **NO agit de manière coordonnée** et/ou exerce un **rôle régulateur** sur l'activité d'autres composants des voies de signalisation comme la NADPH oxydase, les protéines kinases (MAPKs, CDPKs), les hormones et la signalisation Ca²⁺ (Wimalasekera et al., 2011).

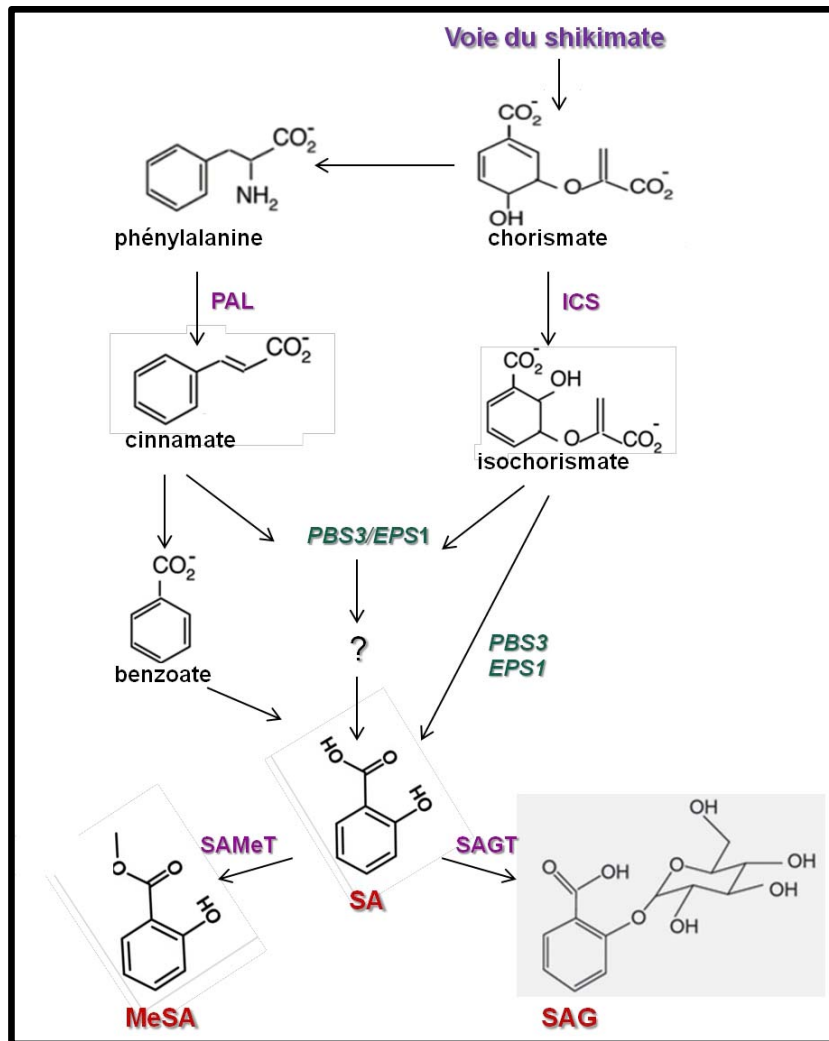


Figure I.I.10 : Voies de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) chez les plantes. (Modifié d'après Chen, 2009)

Le SA est synthétisé par deux voies possibles chez les plantes à partir de la voie du shikimate ou bien à partir de la phénylalanine. Des expériences de traceurs métaboliques ont démontré que les plantes synthétisent du SA principalement à partir du cinamate produit par la PAL alors que des études génétiques ont mis en évidence que la majorité de la production de SA s'effectue *via* la voie de l'isochorismate. L'utilisation de mutants de gènes codant pour la PAL et ICS a réconcilié ces deux hypothèses et prouvé que les deux voies sont importantes pour l'accumulation du SA. Il est supposé aujourd'hui que ces deux voies de biosynthèse sont intégrées dans un même processus de biosynthèse ou de régulation encore méconnu (signifié par ? sur la figure), qui conduirait à la production de SA. Récemment les gènes *PBS3* et *EPS1* codant pour des enzymes catalytiques ont été caractérisés comme étant des acteurs majeurs de la production de SA en réponse à un agent pathogène. Une fois produit, le SA est converti en méthylsalicylate (MeSA) et sous forme de SA glycosylé (SAG), deux intermédiaires qui permettent le transport du SA dans la plante entière et conduisent à la réponse systémique acquise (SAR).

❖ Implication des phytohormones dans la coordination des réactions de défense

Les phytohormones sont des composés essentiels à la régulation de processus biologiques variés comme la croissance et le développement mais également les mécanismes de défense des plantes lors du stress biotique. La **coordination des réactions de défenses par l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET)** est désormais bien établie. L'identification et la caractérisation de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la biosynthèse, la perception et la signalisation hormonale ont grandement contribué à la compréhension du rôle de chacune de ces hormones dans les réponses aux pathogènes. Il est ainsi clairement établi que la balance hormonale active des **réponses de défense spécifiques** et adaptées contre un pathogène donné (Thomma et al., 2001). Ainsi, pendant longtemps, le SA était décrit comme l'hormone clé des défenses contre des pathogènes biotrophes, et le JA et l'ET de la défense contre des pathogènes nécrotrophes. Des **relations antagonistes** entre les voies **SA et JA/ET** ont été rapportées ainsi qu'une action **synergique** du **JA et de l'ET**. Des travaux illustrent désormais que bien loin d'être aussi simples, les relations croisées qui existent entre ces hormones sont très complexes et très finement régulées au cours du stress biotique (Pieterse et al., 2012). Bien que leurs contributions soient moins abondamment décrites au cours du stress biotique, d'autres hormones telles que **l'acide abscissique (ABA), l'auxine, l'acide gibbérellique (GA), les cytokinines (CK) les brassinostéroïdes (BR)** sont également impliquées dans les mécanismes de **défense**. Quelques aspects majeurs des voies de biosynthèse et signalisation du SA, JA et de l'ET ainsi que leur implication dans la défense sont décrits dans cette partie.

_ L'acide salicylique (SA): un composé hormonal clé dans l'activation des mécanismes de défense

Les voies de signalisation dépendantes du SA sont activées dans les défenses contre les pathogènes biotrophes agissant dans la mise en place de la **résistance basale** mais aussi dans l'exécution de la **HR** et le développement de la **résistance systémique acquise (SAR)** (Nawrath and Métraux, 1999). Le SA est un **composé phénolique** produit à partir de deux précurseurs majeurs : la phénylalanine et l'isochorismate (**figure I.1.10**). Dans le premier cas, la **biosynthèse du SA** se fait dans le cytosol *via* la **voie des phénylpropanoïdes** à partir de la phénylalanine. Dans le deuxième cas, le SA est synthétisé dans le chloroplaste par la **voie de l'isochorismate**. Pour pouvoir être actif, une grande partie du SA synthétisé chez les plantes est par la suite **glycosylé** (SAG) par une SA glucosyltransférase (SAGT) ou bien il doit être converti en un composé **volatil** méthylé (**MeSA**) par une SA carboxyl méthyltransférase (SAMeT) (Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011; Bernoux et al., 2011). Parmi les acteurs clefs de la signalisation du SA identifiés par des approches génétiques, les gènes *Enhanced Disease Susceptibility* (**EDS1**) et *Phytoalexin Deficient 4* (**PAD4**) codent des protéines homologues à des lipases et sont impliqués au cours de la PTI. Ces deux protéines seraient également impliquées au cours de l'ETI, quand celle-ci est initiée par des protéines de résistance de type TIR-NBS-LRR. Enfin, la protéine **NDR1** (*Non-race specific Disease Resistance*) interviendrait aussi dans la transduction hormonale activée par des protéines de résistance de type CC-NB-LRR au cours de l'ETI (Bernoux et al., 2011).

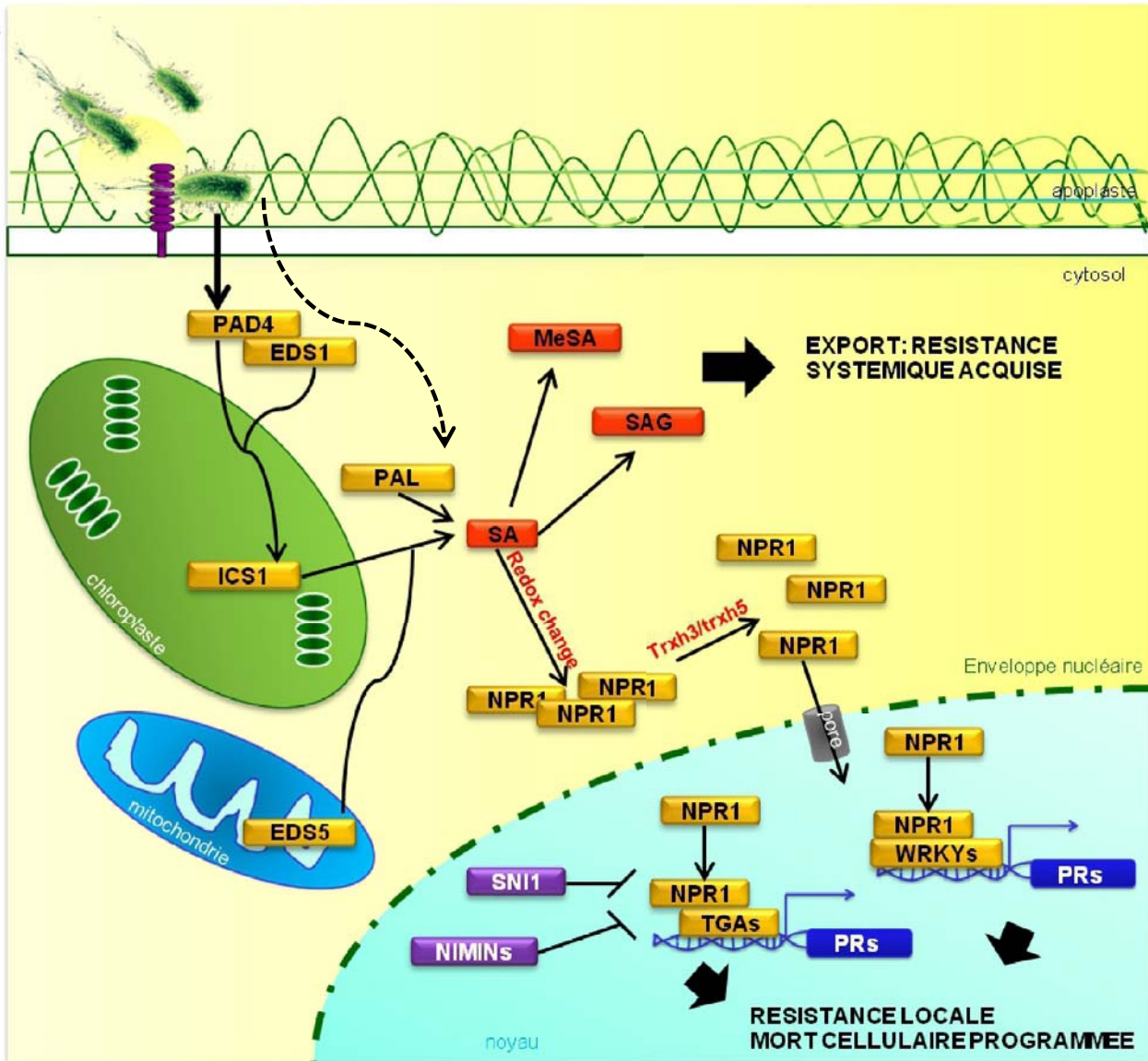


Figure 1.11 : Voie de signalisation de l'acide salicylique (SA) (Modifié d'après Pieterse, 2012)

La reconnaissance d'un agent pathogène entraîne l'activation de EDS1 et PAD4 qui activent les voies de biosynthèse du SA en interagissant avec ICS1 et EDS5. La voie de la PAL contribuerait aussi à la production de SA en réponse à un agent pathogène. Le SA peut être converti sous forme de MeSA ou SAG puis transporté dans les différents organes de la plante ce qui conduit à la mise en place de la résistance systémique acquise. L'accumulation de SA contribue aussi à la mise en place de la résistance locale par l'activation de NPR1.

Dans des cellules non stimulées, NPR1 est séquestré dans le cytoplasme sous forme d'oligomères et ne peut exercer son activité régulatrice. En réponse à des changements de l'homéostasie du SA, NPR1 est converti en monomères par des thioredoxines telles que TRHX3/TRHX5 puis transféré dans le noyau où il interagit avec des facteurs de transcription de type TGA et WRKY qui lient et activent le promoteur des gènes de réponse au SA, tel que les gènes PRs, ce qui conduit à l'activation des défenses et notamment à la mise en place de la mort cellulaire programmée.

Des régulateurs négatifs exercent un rétrocontrôle de la signalisation SA, c'est le cas notamment des facteurs de régulation NIMINs et de SNI1 qui contrôlent l'expression des gènes de défense SA dépendants.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

NPR1 (*Non-expressor of PR1*) est l'élément central de la signalisation associé au SA. Il agit à la fois dans la **perception** du SA et comme un **activateur de la transcription** de gènes de défense (**figure I.I.11** et **figure I.I.12**).

Jusqu'à maintenant, la plupart des recherches se focalisaient sur le mode d'action du SA dans les réponses de défenses mais les systèmes de perception de cette hormone dans les cellules végétales restaient inconnus. Très récemment des travaux ont permis d'identifier les récepteurs du SA chez *Arabidopsis* (**figure I.I.12**). Fu et collaborateurs (2012) ont montré que deux paralogues de NPR1, **NPR3** et **NPR4** liaient le SA avec différentes affinités. En réponse au SA, NPR3 et NPR4 formeraient un complexe avec une cullin 3 (ubiquitin E3 ligase) qui dégrade NPR1. Des doubles mutants *npr3/npr4* sont ainsi hyperaccumulateurs de la protéine NPR1 et sont incapables d'induire la SAR et la HR en réponse aux pathogènes. Une étude biochimique démontre que NPR1 serait le récepteur capable de lier le SA en présence de cuivre. NPR1 sous sa forme d'oligomère est constitué d'un domaine de transactivation et d'un domaine BTB/POZ qui inhibe l'activité du premier. La liaison du SA entraînerait un changement de la conformation de NPR1 et une diminution de l'affinité du domaine BTB/POZ pour le domaine de transactivation, ce dernier étant alors disponible pour la transcription des gènes de réponse au SA (Wu et al., 2012).

Le transport de NPR1 vers le noyau où il exerce son activité régulatrice est l'une des étapes clés de la signalisation SA. Dans des cellules non stimulées, NPR1 est nitrosylé par une S-nitroglutathione transférase. Sous cette forme oligomérique, NPR1 est séquestré dans le cytoplasme. En réponse à des changements de l'homéostasie du SA, NPR1 est converti en monomères par des **thioredoxines** telles que **TRHX5** (Pieterse et al., 2012) puis transféré dans le noyau et interagit avec des facteurs de transcription de type **TGA**. Les TGAs, au nombre de 10 chez *Arabidopsis*, appartiennent à la famille de facteurs de transcription de type BZIP (*basic leucine zipper*) qui lient le promoteur des gènes de réponse au SA, tel que les gènes **PRs** (qui codent pour des protéines dont certaines ont une activité antimicrobienne) et activent leur transcription (Pieterse et al., 2012). D'autres éléments clés interviennent dans la signalisation et les réponses dépendantes du SA. De nombreux facteurs de transcription de type **WRKY** sont induits en réponse à cette hormone et sont bien décrits dans la littérature soit comme activateurs ou soit comme répresseurs des réponses SA (Wang et al., 2006).

Des **régulateurs négatifs** exercent un rétrocontrôle de la signalisation SA, certainement pour éviter une activation inopportune des gènes de réponse à cette hormone. C'est le cas notamment des facteurs de régulation de type *NPR1-interacting proteins* comme **NIMIN1** (*NIM1-INTERACTING1*), 2 et 3 et de **SNI1** (*SUPPRESSOR of npr1 INDUCIBLE1*) qui contrôlent l'expression des gènes de défense SA dépendants et NPR1 dépendants (Weigel et al., 2005; Song et al., 2011).

_ Implication de la voie de l'acide jasmonique (JA) dans la mise en place des défenses

Le **JA** est un composé de nature **lipidique**, synthétisé *via* la voie des oxylipines en réponse à des agents pathogènes nécrotrophes ou en réponse à des insectes herbivores. La biosynthèse du JA débute avec la libération d'acide linoléique des membranes lipidiques (**figure I.I.13**). Cet acide gras est clivé par des lipases puis transformé en hydroperoxide par des lyxogénases (LOX). Des Allène Oxyde Synthases (AOS) et des Cyclases (AOC) permettent la formation des cyclopenténones (OPDA) dans le chloroplaste. Ceux-ci sont exportés vers les peroxysomes où ils sont réduits en cyclopentanones (OPC) puis oxydés en JA. Une fois synthétisé, le JA est converti dans le cytosol en

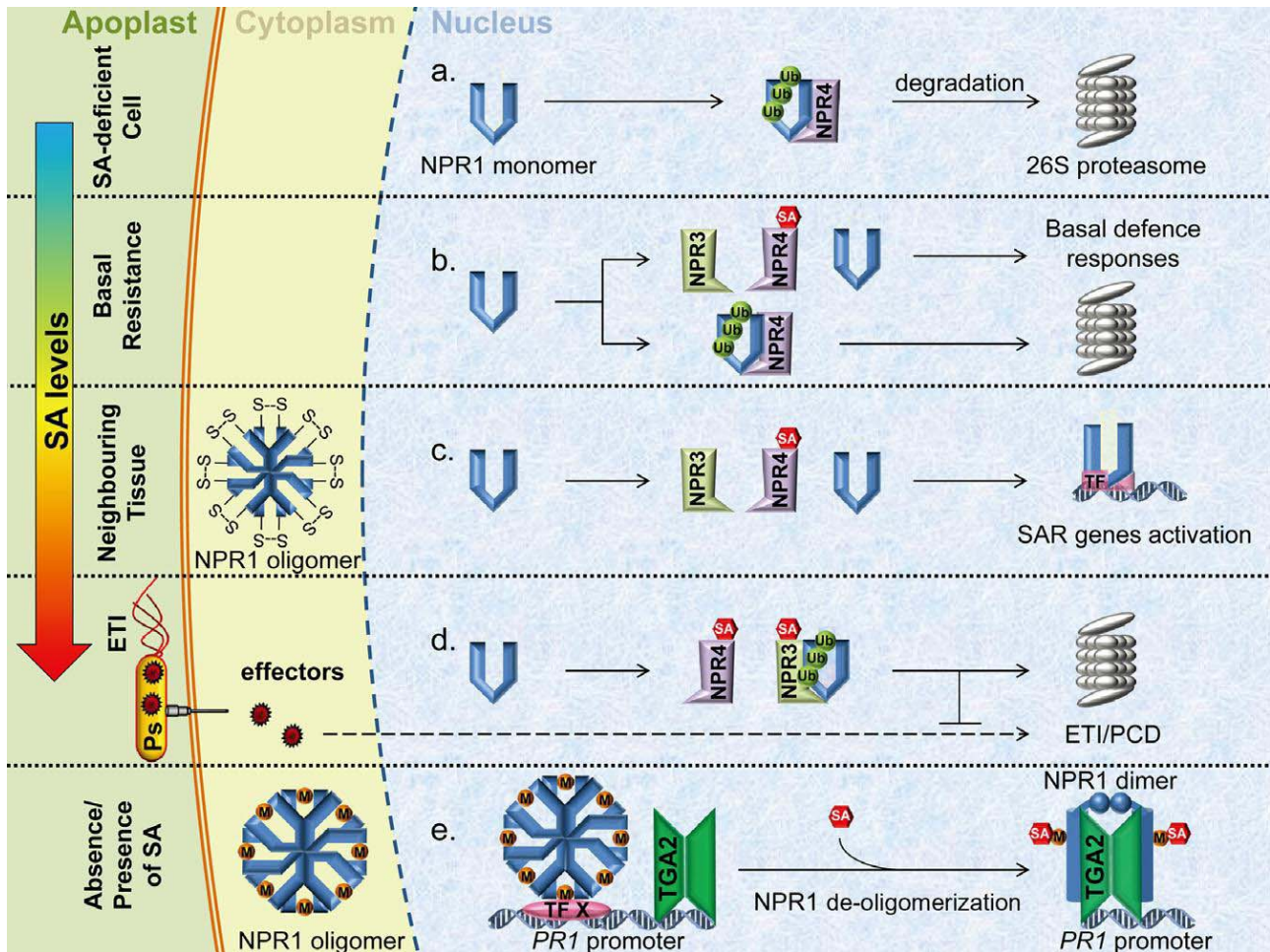


Figure I.1.12: Représentation schématique de la perception de l'acide salicylique (SA) (D'après Fu, 2013)

NPR3 et NPR4 fonctionnent comme des récepteurs au SA. L'interaction de NPR1 avec NPR4 en l'absence de SA conduit à sa dégradation par le protéasome (a). Des concentrations faibles en SA conduisent à la liaison du SA à NPR4, ce qui a pour conséquence de limiter sa capacité à agir comme une protéine de dégradation et de faibles quantités de NPR1 s'accumulent ce qui permet l'activation des mécanismes de défense (b). Des concentrations modérées en SA accumulées en réponse aux effecteurs du pathogène dans des cellules voisines (réponse systémique) entraîne aussi la liaison du SA à NPR4, ce qui limite plus fortement l'interaction NPR1-NPR4 et conduit à l'activation de la résistance systémique acquise. Une partie des protéines NPR1 interagit dans ce cas avec NPR3 ce qui entraîne sa dégradation (c). Des cellules directement en contact avec un agent pathogène avirulent accumulent de fortes quantités de SA ce qui entraîne la dégradation de NPR1 par NPR3 et l'inhibition de la mort cellulaire programmée (d). Selon l'hypothèse de Wu, 2012, NPR1 pourrait fonctionner comme le récepteur du SA. La forme oligomère du SA contient des ions cuivre ce qui faciliterait la liaison du SA. Dans des conditions réductrices et en présence de SA, NPR1 serait converti sous forme de monomère et pourrait exercer son activité régulatrice sur la transcription des gènes (e).

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

méthyl jasmonate (MeJA) par des carboxyl methyltransferases (JMT) ou conjugué avec l'isoleucine par JAR1 (JA conjugate synthase) appelée JA-isoleucine (JA-Ile). Le **MeJA** et le **JA-Ile** constituent les **formes biologiquement actives** de cette hormone (Weber, 2002).

C'est grâce au criblage de mutants insensibles au JA que les éléments d'une voie de signalisation de cette hormone ont pu être identifiés (**figure I.1.14**). **COI1** (*CORONATINE INSENSITIVE 1*), protéine à domaine F-box est le **récepteur du JA-Ile**. En réponse au JA, COI1 s'intègre dans un complexe SCF^{coi1} (*E3 ubiquitine ligase SKP1-cullin-Fbox complex*) qui est responsable de l'ubiquitination et de la **dégradation des JAZs** (*JASMONATE ZIM transcription factors*), répresseurs de la transcription des gènes de réponse au JA. Deux voies majeures interviennent en aval dans la signalisation JA impliquant deux régulateurs transcriptionnels clés: la **voie MYC** et la **voie ERF**. Généralement, la voie ERF est associée à la résistance contre des pathogènes nécrotrophes alors que la voie MYC est associée à la réponse à la blessure et à la défense contre des insectes herbivores (Pieterse et al., 2012). La voie MYC est contrôlée par des facteurs de transcription de type MYC qui régulent la transcription de **VSP2** (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*) gène marqueur de la voie JA. La voie ERF fait intervenir la famille des facteurs de transcription de type **AP2/ERF** (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) qui régule l'expression du gène marqueur **PDF1.2** (*PLANT DEFENSIN1.2*) (Pieterse et al., 2012). Cette dernière nécessite à la fois l'activation de la voie de signalisation JA et ET en amont, bien que les interactions qui existent entre ces deux voies soient mal connues. Il a été mis en évidence récemment que les facteurs de transcription EIN3 et EIL1 qui activent les gènes de réponse au JA sont réprimés par leur interaction avec les **JAZs**. En réponse au JA ou à l'ET, la dégradation des protéines JAZs entraîne la libération des facteurs EIN3/EIL1 qui exercent alors leur activité transcriptionnelle sur les gènes de réponse au JA (Zhu et al., 2011).

Dans le cas de la réponse aux herbivores, la voie JA est activée au niveau des zones blessées par les insectes mais les réponses à cette hormone peuvent également être observées à distance, au niveau des parties saines de la plante. Cette résistance induite implique la mise en place de défenses chimiques telle que la production de composés toxiques, anti-nutritifs qui repoussent les insectes et protègent la plante contre une nouvelle invasion (Howe and Jander, 2008).

_ L'éthylène (ET), une hormone présente au carrefour des voies SA et JA dans la mise en place des défenses

L'**ET** est une **hormone volatile** produite au cours de nombreuses interactions plantes-pathogènes. L'ET est synthétisé à partir de la méthionine qui est transformée en S-adenosyl-méthionine (SAM) par une SAM Synthetase puis en acide 1 aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par une ACC Synthase (ACS) et enfin en éthylène par une ACC Oxydase (ACO). Chez *Arabidopsis*, 5 récepteurs membranaires à l'éthylène sont connus (ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 et ERS2). En absence de signal, ces récepteurs activent une *Raf-like kinase*, CTR1, qui à son tour régule négativement les voies de réponse à l'éthylène (Yoo et al., 2009).

L'analyse globale des profils d'expression de gènes de plantes infectées par des pathogènes ou de mutants insensibles aux hormones révèlent de **nombreuses connections entre les voies de signalisation SA, JA et ET**. L'ET peut agir aussi bien comme un **régulateur positif ou négatif des défenses**, ce qui montre toute la complexité des mécanismes qui régissent cette voie. En effet, quand les voies de signalisation SA sont activées avant celles du JA et de l'ET, le SA supprimerait les

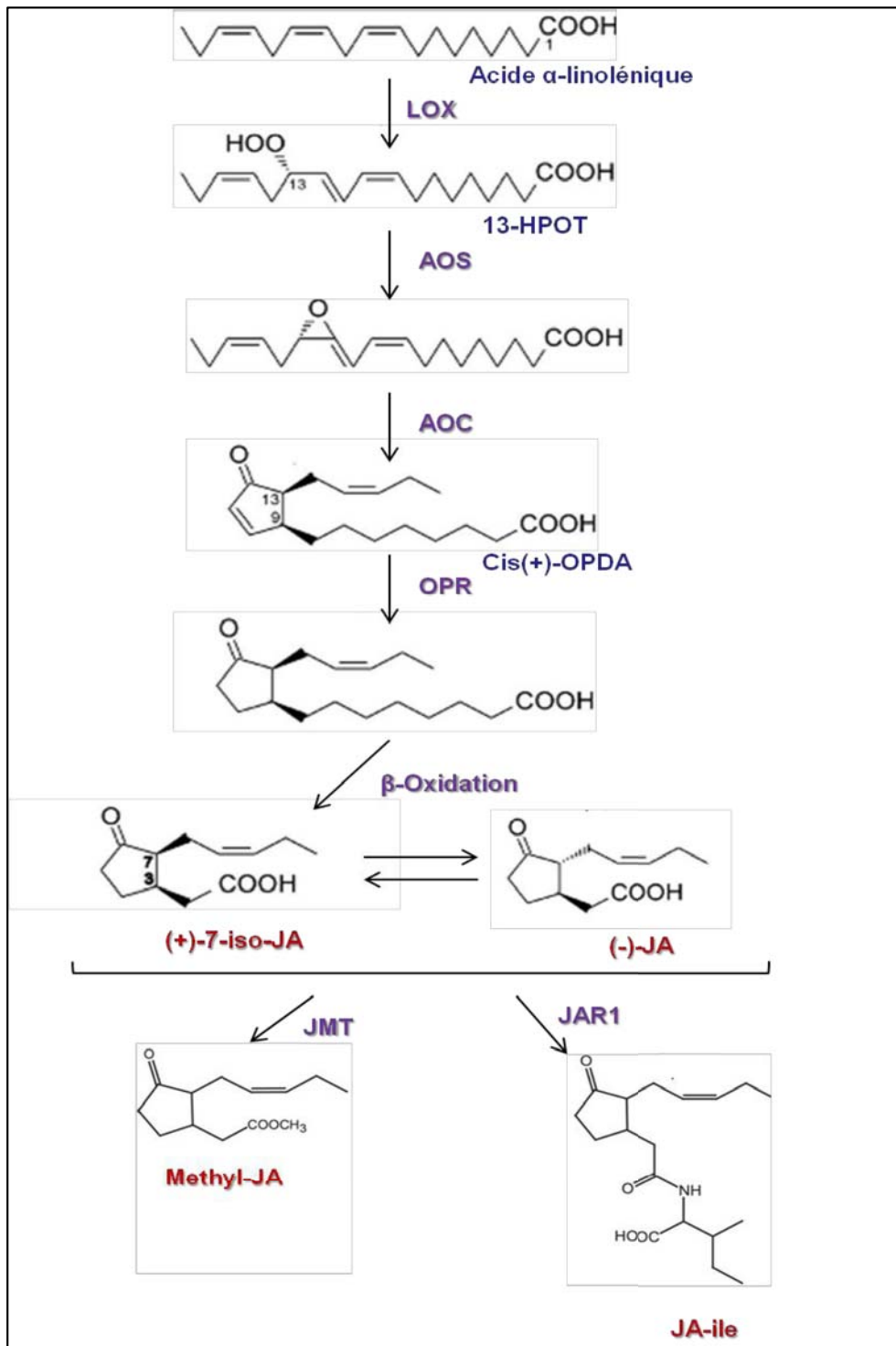


Figure I.I.13: Représentation schématique de la voie de biosynthèse du JA

La biosynthèse du JA débute avec la libération d'acide linoléique des lipides membranaires. Plusieurs enzymes (LOX, AOS, AOC, OPR) permettront la conversion de cette acide linoléique en différentes formes intermédiaires de biosynthèse du JA. Le JA est présent sous deux formes, le (+)-7-iso-JA qui s'épimérise sous une forme isomère plus stable (-)-JA. Généralement, la forme (+)-7-iso-JA est décrite comme la forme biologiquement active de l'hormone. Le JA est métabolisé en différents dérivés dont les mieux connus sont le méthyl-jasmonate (MeJA) et une forme couplée à l'isoleucine (JA-Ile). Une JA carboxyl-méthyltransférase permet la conversion du JA sous la forme volatile MeJA. La conjugaison du JA avec l'isoleucine est effectuée par JAR1.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

réponses de défense JA/ET dépendantes. Au contraire, quand les voies JA et ET sont induites avant celle du SA, l'effet antagoniste du SA sur les voies JA/ET est complètement abolie (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Ces réponses antagonistes seraient attribuées à l'ET car elles sont abolies en réponse au traitement par un inhibiteur de la voie de signalisation de cette hormone (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Chez *Arabidopsis*, l'ET serait un **régulateur positif de l'établissement de la PTI** mais un **régulateur négatif des réponses SA-dépendantes** (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Plus récemment, il a été mis en évidence que l'ET **module les réponses NPR1-dépendantes**, cependant les mécanismes moléculaires par lesquels l'ET régule l'activité de NPR1 restent encore méconnus (Pieterse et al., 2012). L'ET affecte également le devenir des réponses au JA et la production simultanée de JA et d'ET après infection par des pathogènes nécrotrophes entraîne **l'induction de la voie ERF et la répression de la voie MYC**.

Contribution d'autres composés hormonaux dans les réactions de défense

S'il est bien connu que l'**ABA** est impliqué dans divers aspects du **développement** des plantes et dans l'établissement des mécanismes d'**adaptation au stress hydrique**, des travaux ont mis en évidence le rôle de l'ABA dans la **défense contre les micro-organismes pathogènes**. En effet, chez différentes espèces végétales, une application exogène d'ABA provoque une augmentation de la sensibilité à différents pathogènes biotrophes, ce qui indique que cette hormone joue un **rôle négatif dans le contrôle des mécanismes de défense** face à ces pathogènes. Cet effet serait dû à une altération de l'expression des gènes induits par le JA et l'ET (Pieterse et al., 2012). D'autres expériences menées sur des mutants déficients dans la synthèse d'ABA (*aba1-1* et *aba2-1*) en réponse à différents pathogènes confirme cette hypothèse (Anderson et al., 2004; Mohr and Cahill, 2003). Toutefois, des traitements de plantes par l'ABA ont aussi montré une **meilleure tolérance à des pathogènes nécrotrophes** (Ton and Mauch-Mani, 2004). Ainsi, au cours de **l'interaction Arabidopsis-P. syringae**, l'ABA jouerait un **rôle double** exerçant un rôle positif en provoquant la fermeture des stomates pour empêcher l'entrée du pathogène en phase de pré-invasion puis un rôle négatif en inhibant l'activation des voies de défense liées au SA en phase post-invasive (Melotto et al., 2006; de Torres-Zabala et al., 2007). Bien que de nombreuses expériences montrent aujourd'hui le rôle de l'ABA dans la tolérance à de nombreux pathogènes, le mode d'action et les acteurs moléculaires impliqués restent encore méconnus.

Différents travaux ont aussi montré que le **GA** est un acteur-clé du **développement** qui stimule la dégradation des protéines **DELLAs, régulateurs négatifs de la croissance**. Des bio-essais en réponse au GA et des approches génétiques ont montré que le GA chez *Arabidopsis* conduit à une **meilleure tolérance** à un **pathogène biotrophe** tel que *P. syringae* mais par contre à une plus grande **sensibilité vis-à-vis du pathogène nécrotrophe A. brassicicola**. Aussi en réponse à *P. syringae* par exemple, des quadruple mutants altérés pour les gènes **DELLAs** présentent une forte expression des gènes marqueurs SA et un retard de l'expression d'un gène marqueur des voies ET et JA (Navarro et al., 2008). A l'inverse des mutants accumulant des protéines DELLAs ont montré que l'infection par des micro-organismes biotrophes provoque une plus grande sensibilité alors qu'une infection par des micro-organismes nécrotrophes conduit à une meilleure tolérance (Bari and Jones, 2009). Sur la base de ces résultats, les DELLAs pourraient agir sur la défense contre les micro-organismes nécrotrophes

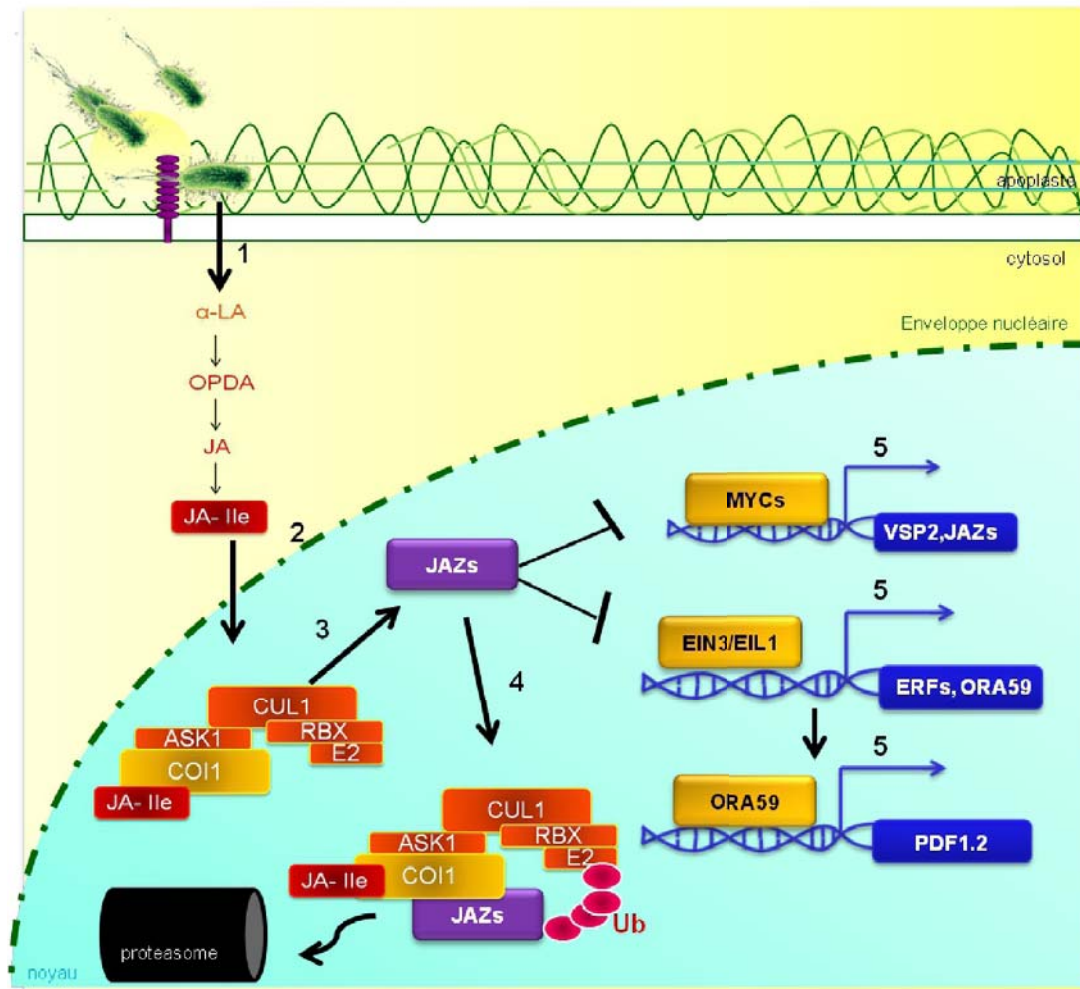


Figure I.I.14: Voie de signalisation du JA (Modifié d'après Pieterse, 2012)

En réponse à un agent pathogène, les cellules végétales synthétisent du JA-Ile. COI1 (*CORONATINE INSENSITIVE 1*), protéine à domaine F-box est le récepteur du JA-Ile. En réponse au JA, COI1 est responsable de l'ubiquitination et de la dégradation des JAZs (*JASMONATE ZIM transcription factors*), répresseurs de deux régulateurs transcriptionnels clés: les facteurs MYCs et ERFs. Les facteurs MYCs régulent la transcription du gène *VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*) marqueur de la voie JA. Les facteurs EIN3/EIL1 régulent la transcription de facteurs de type ERFs qui eux-mêmes régulent l'expression du gène marqueur *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*).

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

en induisant l'expression de gènes JA/ET dépendants, et contribueraient à la sensibilité aux pathogènes biotrophes en réprimant les voies dépendantes du SA (Navarro et al., 2008).

L'**auxine**, une hormone majeure du **développement**, provoque la dégradation de répresseurs transcriptionnels, les Aux/IAA (*Auxin/Indole Acetic Acid*) fixés sur des facteurs de transcription ARFs (*Auxin Response Factors*). La liaison de l'auxine à son récepteur TIR1 (*Transport Inhibitor Resistant 1*) conduit à une interaction avec les Aux/IAA pour former un complexe du type Aux/IAA-SCF TIR1 alors ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome, levant ainsi la répression exercée par les Aux/IAAs sur les ARFs (Bari and Jones, 2009). **En réponse aux bactéries phytopathogènes, la voie de signalisation de l'auxine est réprimée** par l'intermédiaire du micro-ARN miR393 qui entraîne la dégradation des ARNm codant TIR1 et *in fine* contribue à la résistance contre *P. syringae* (Navarro et al., 2006). En effet, l'auxine réprime la voie SA. La surexpression de mir393 entraîne la répression de la voie de l'auxine ce qui a pour conséquence de lever la répression de la voie SA et d'entraîner l'accumulation de composés anti-microbiens de défense comme les glucosinolates (Robert-Seilaniantz et al., 2011).

1.2.3 Les réponses de défense

L'ensemble des cascades de signalisation mis en place après perception de l'agent pathogène induit la reprogrammation de l'expression de gènes de défense nécessaire à l'établissement des réponses qui ont pour objectif de limiter la croissance du pathogène. Ainsi, la paroi cellulaire est le siège de réorganisations structurale et chimique qui se manifestent par le dépôt de composés nouvellement synthétisés comme la **lignine** et les **papilles de callose**, **l'accumulation de métabolites** et le recrutement de **protéines à activité anti-microbienne**. Toutes ces réponses sont également responsables de la mise en place de la HR et de la SAR dans le cas de la résistance gène pour gène. Quelques généralités sur ces réponses de défense sont précisées dans les paragraphes suivants.

❖ Les composés pariétaux constituent des barrières structurales

La **lignine** constitue une barrière de défense préformée et de ce fait elle est dite passive. Cependant des travaux ont montré que **le processus de lignification s'intensifie en réponse à un agent pathogène** notamment dans le cas de pression mécanique exercée par exemple par les différentes structures de pénétration des champignons (Bechinger et al., 1999). Une étude réalisée sur la résistance à *Xanthomonas campestris pv campestris* à sensibilité contrastée a montré l'induction d'un dépôt de lignine au niveau des tissus foliaires qui s'intensifie avec le niveau de résistance à la maladie (Gay P.A. and Tuzun S., 2000). Lorsque des racines de plants de tomate sont traitées par des éliciteurs du champignon *Fusarium oxysporum*, une plus forte accumulation de lignine permettrait à la plante d'isoler mécaniquement le champignon (Mandal and Mitra, 2007).

De même des dépôts de **callose** sont souvent observés à **proximité des lésions** provoquées par les champignons, et en réponse aux bactéries phytopathogènes. Ce polymère de **β -1,3 glucanes** est synthétisé par des **calloses synthases** dont les gènes sont communément annotés **CalS** (*Callose Synthase*) ou **GSL** (*Glucan Synthase-Like*). Plusieurs travaux réalisés chez *Arabidopsis* ont mis en

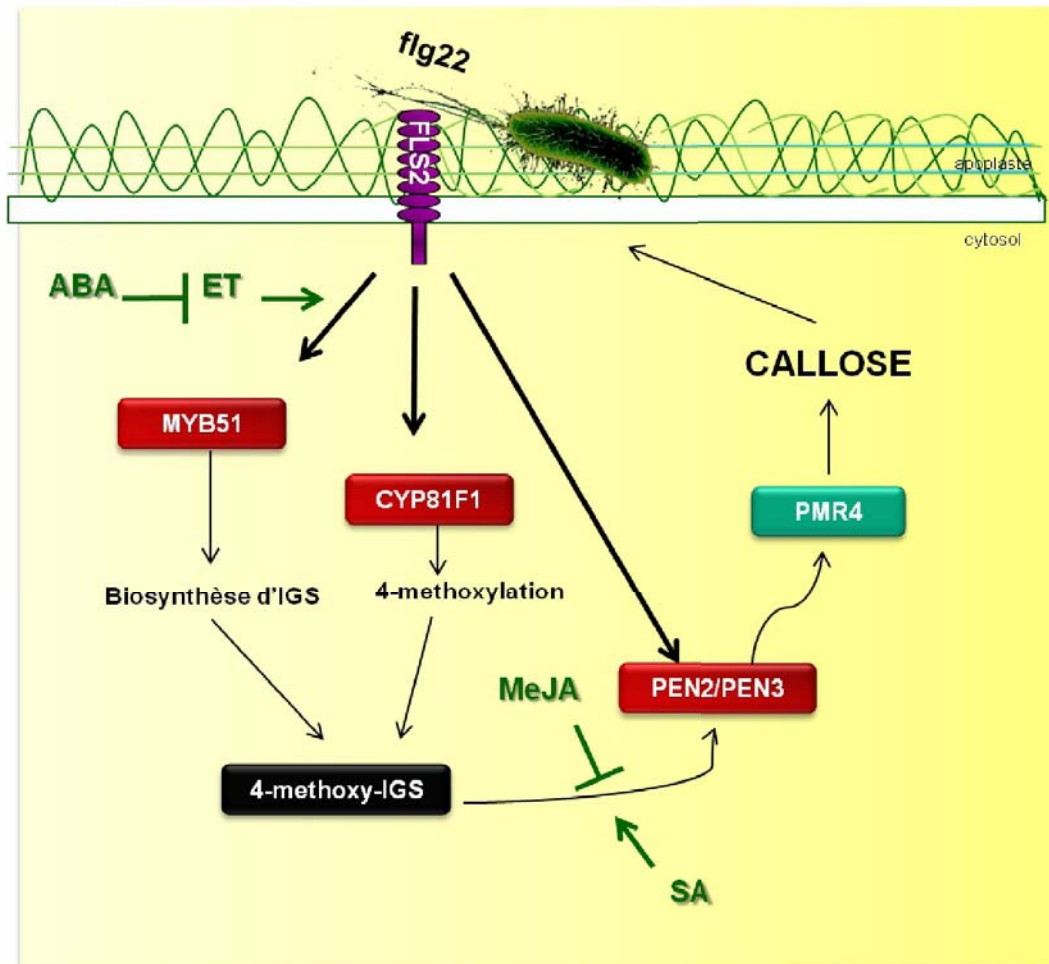


Figure 11.15: Production de callose en réponse à la perception de flagelline (flg22) (D'après Clay, 2009)

La formation de papilles de callose en réponse à la flg22 implique l'activation de trois acteurs majeurs de la voie des glucosinolates: MYB51, CYP81F2 et PEN2/PEN3. Les voies MYB51 et CYP81F2 conduisent à la production de 4-méthoxy-IGS (*IGS: indole glucosinolate*). Le 4-méthoxy-IGS est hydrolysé par PEN2/PEN3 et contribue par la suite à l'induction de la production de callose par PMR4. Ces voies sont finement régulées par les composés hormonaux tels que l'ABA et le MeJA qui suppriment la formation de papille de callose alors que l'ET et le SA contribuent à l'activation des voies de biosynthèse de la callose.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

évidence que **GSL5/PMR4/Cals12** sont responsables de la production de papilles de callose en réponse à des agents pathogènes et des mutants ayant perdu la fonction *gsl5/pmr4/cals12* sont altérés dans la formation de papilles de callose (Chen and Kim, 2009). La callose est ainsi considérée comme un marqueur de défense notamment en **réponse aux PAMPs**. Des mutants *pmr4* par exemple ne sont pas capables de former des dépôts de callose en réponse à la flg22. Les travaux de (Clay et al., 2009) décrivent de manière très détaillée l'activation de la voie de biosynthèse de la callose en réponse à la perception de flg22 (**figure I.I.15**). La formation de papilles de callose en réponse à la flg22 implique l'activation de trois acteurs majeurs de la voie des glucosinolates: **MYB51, CYP81F2 et PEN2/PEN3**. Ces voies sont **finement régulées par les composés hormonaux** tels que l'ABA et le MeJA qui suppriment la formation de papille de callose alors que l'ET et le SA contribuent à l'activation des voies de biosynthèse de la callose (Clay et al., 2009 ; Dong et al., 2008). Bien qu'elle soit considérée comme un **marqueur de défense**, le rôle de la callose en réponse à un agent pathogène n'est pourtant pas très clair. De manière assez inattendue, certains travaux ont démontré que la perte de fonction de *GSL5/PMR4* entraîne une augmentation de la résistance des plantes aux pathogènes (Jacobs et al., 2003; Nishimura et al., 2003). La callose serait donc un régulateur négatif des défenses en réponse à un agent pathogène, notamment des défenses associées aux voies de signalisation dépendante du SA. D'autres travaux ont démontré que la callose n'est pas suffisante à elle seule pour conduire à la résistance. En effet, des mutants de biosynthèse de la callose ne présentent pas une sensibilité accrue à l'infection par *P. syringae* que des plantes sauvages (Clay et al., 2009).

❖ **Glucosinolates et phytoalexines constituent des barrières chimiques de défense**

Bien qu'ils puissent constituer une barrière de défense préformée, les **glucosinolates** sont aussi produits après une attaque de pathogènes et ont donc une fonction antimicrobienne (Halkier and Gershenzon, 2006). Récemment, Schlaeppi et collaborateurs (2010) ont montré que la voie de biosynthèse des glucosinolates est stimulée en réponse à *Phytophthora brassicae* et que les produits de leur hydrolyse sont essentiels pour la résistance à ce pathogène.

Certaines plantes d'intérêt agronomique de la famille des *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Vitaceae* and *Poaceae* produisent des métabolites particuliers: les **phytoalexines**. A la différence des phytoanticipines pré-formées, les phytoalexines sont des **composés induits** en réponse aux pathogènes qui jouent un **rôle prépondérant dans la résistance**. De nature hétérogène, ces composés sont biologiquement actifs contre un grand nombre de pathogènes et considérés désormais comme des marqueurs de résistance contre la maladie.

Les étapes de biosynthèse et le mécanisme d'action de la phytoalexine majeure d'*Arabidopsis*: la **camalexine** sont bien connues aujourd'hui (**figure I.I.16**). Ce composé 3-thiazol-2-yl-indole est produit chez les *Brassicaceae* et notamment chez *Arabidopsis* en réponse à un large répertoire de **pathogènes biotrophes et nécrotrophes**, en **réponse aux PAMPs** et à certaines toxines de champignons (Bednarek, 2012). **Tous les écotypes d'Arabidopsis** analysés jusqu'à maintenant semblent produire de la camalexine, et ce dans **tous les organes** de la plante bien que son accumulation soit plus importante au niveau des lésions créées par les agents pathogènes. La biosynthèse de ce composé débute par la conversion du **tryptophane** en indole-3-acétaldoxime (**IAOx**) par deux homologues du cytochrome P450: **CYP79B2 et CYP79B3**. L'**IAOX se situe au carrefour de la production de la camalexine, d'indole glucosinolates et d'auxine**. Ce composé est

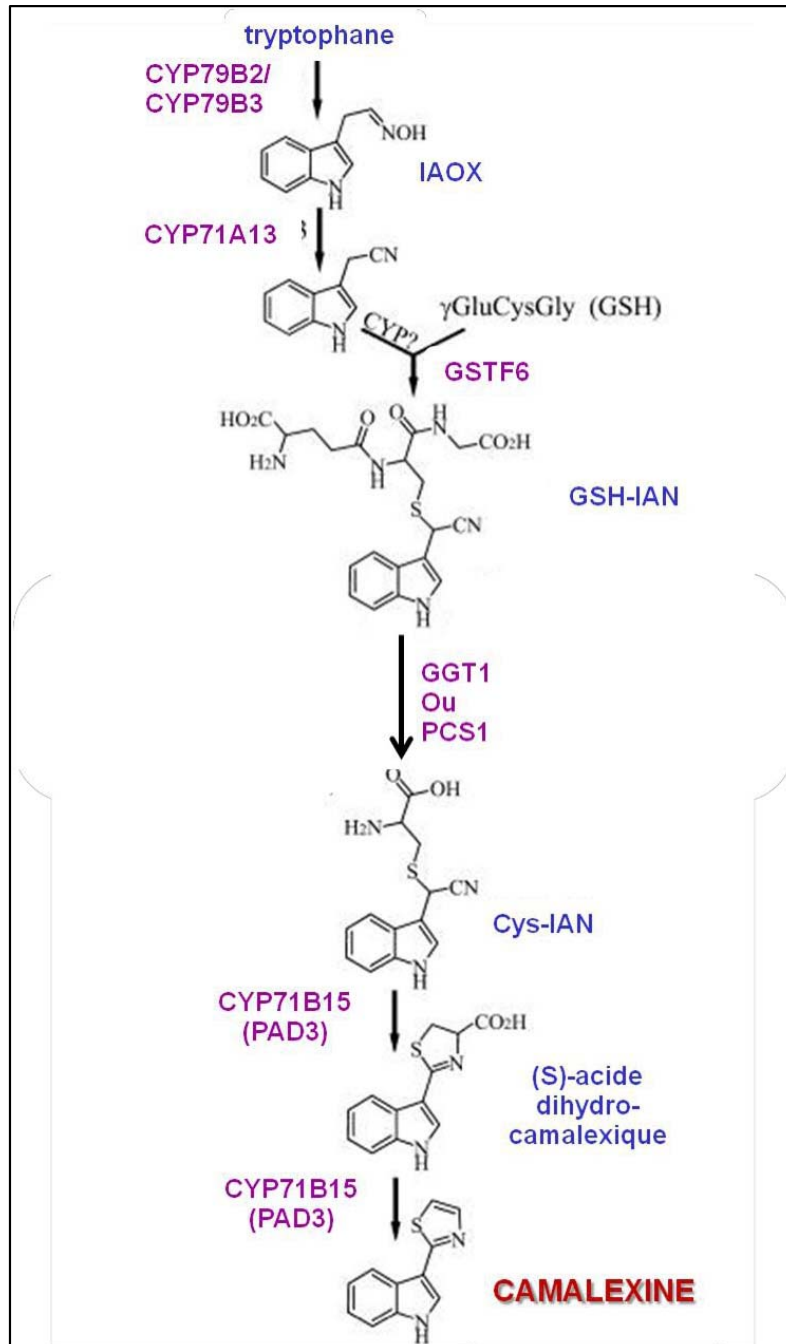


Figure I.I.16: Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la camalexine (D'après Ahuja, 2012)

La biosynthèse de la camalexine débute par la conversion du tryptophane en indole-3-acétaldoxime (IAOX) par deux homologues du cytochrome P450 : *CYP79B2* et *CYP79B3*. IAOX est converti en indole-3-acetonitrile (IAN) par *CYP71A13* dans les feuilles de rosette. Une glutathione-S-transférase *GSTF6* permet la conjugaison de l'IAN avec le glutathion GSH. Une fois conjugué, l'IAN est métabolisé en Cys-IAN par deux voies possibles : celle impliquant une γ -glutamyl transpeptidase (*GGT*) et celle impliquant une phytochélatine synthase (*PCS1*). Enfin, les deux dernières étapes de la biosynthèse conduisent à la conversion du Cys(IAN) en (S)-acide dihydro-camalexique puis en camalexine via *CYP71B15*.

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

ensuite converti en indole-3-acétonitrile (IAN) par deux autres cytochromes P450, **CYP71A13** dans les feuilles de rosette et **CYP71A12** dans les racines. Une glutathione-S-transférase GSTF6 permet la conjugaison de l'IAN avec le glutathion GSH. Une fois conjugué, l'IAN est métabolisé en Cys-IAN par deux voies possibles; celle impliquant une γ -glutamyl transpeptidase (**GGT**) et celle impliquant une phytochélatine synthase (**PCS1**). Enfin, les deux dernières étapes de la biosynthèse conduisent à la conversion du Cys(IAN) en acide dihydro-camalexique puis en camalexine via le cytochrome P450 **CYP71B15** appelé aussi PAD3 (Ahuja et al., 2012).

Plusieurs travaux réalisés sur des mutants de voies hormonales (JA/SA/ET) ou sur des plantes sauvages traitées par ces mêmes hormones ont montré que la biosynthèse de la camalexine est sous contrôle de ces composés (Feys and Parker, 2000). Les ROS générées au cours du burst oxydatif sont également associées à la production de camalexine puisqu'un traitement au paraquat est responsable de l'induction de la production de ce composé (Feys and Parker, 2000). D'autres travaux récents montrent que le miR393, un miRNA induit par la flg22 est capable de réguler la production de camalexine en contrôlant la voie de l'auxine, notamment en régulant l'activité d'ARF9 (*auxin response factor 9*), un facteur de transcription qui régule positivement la biosynthèse de camalexine (Robert-Seilaniantz et al., 2011).

❖ Les protéines PR (*pathogenesis-related*)

Les **protéines PR** ont été découvertes pour la première fois dans le cas d'une infection du tabac par le virus de la mosaïque du tabac. Depuis, leur rôle dans les réponses de défense à tous les types de pathogènes a été illustré chez un grand nombre d'espèces végétales (**figure I.1.17**, van Loon et al., 2006). Ces protéines qui possèdent généralement des **activités antimicrobiennes** sont regroupées en **17 familles** d'après leurs propriétés biochimiques et biologiques. Les **β -1,3-glucanases** (PR-2) et les **chitinases** (PR-3, -4, -8 et -11) exercent une activité hydrolytique sur la paroi cellulaire de champignons *in vitro*. La famille des PR-7, qui regroupe des **endoprotéases**, les PR-12 (*defensin*), PR-13 (*thionin*) et certaines protéines de **transfert de lipides** (PR-14), exercent leur activité contre des pathogènes bactériens et fongiques. Les protéines des familles PR-1 et PR-5 (*thaumatin-like protein*) semblent plutôt agir contre les oomycètes et la famille des PR-10 (*ribonuclease-like protein*) serait impliquée dans la défense contre les virus. D'autres ne cibleraient pas uniquement les micro-organismes mais des herbivores comme les inhibiteurs de protéases (PR-6) et les chitinases qui auraient pour cible les nématodes et insectes herbivores. Enfin, certaines PRs **génèrent de l'H₂O₂** et contribueraient au **renforcement de la paroi**, c'est le cas des PR-15 (*oxalate oxidase*) et PR-16 (*oxalate oxidase-like protein*) qui possèdent une activité **superoxyde dismutase** et des PR-9 qui sont des **peroxydases** (van Loon et al., 2006). La synthèse de la plupart des protéines PR est **induite par les voies dépendantes du SA, du JA et/ou de l'ET**. Les PRs protéines sont régulées au niveau transcriptionnel et leurs gènes servent de marqueurs moléculaires de l'activation de ces voies. Par exemple, bien que son activité biologique reste inconnue, le gène *PR-1* est utilisé comme marqueur de la voie de défense SA-dépendante et de la SAR.

❖ La réponse hypersensible (HR) et la réponse systémique acquise (SAR)

La **HR** est une **réponse de défense caractéristique**. C'est la forme ultime de la résistance chez les plantes. Elle apparaît dans les interactions plante-pathogène et est souvent associée à la

famille	Plante	taille (kDa)	propriétés	cible potentielle	référence
PR-1	Tobacco PR-1a	15	anti-fongique	ND	Antoniw et collaborateurs, 1980
PR-2	Tobacco PR-2	30	β -1,3-Glucanase	β -1,3-Glucane	Antoniw et collaborateurs, 1980
PR-3	Tobacco P, Q	25–30	Chitinase (class I,II, IV,V,VI,VI)	Chitine	Van Loon et collaborateurs, 1982
PR-4	Tobacco 'R'	15–20	Chitinase class I,II	Chitine	Van Loon et collaborateurs, 1982
PR-5	Tobacco S	25	<i>Thaumatin-like'</i>	Membrane	Van Loon et collaborateurs, 1982
PR-6	Tomato Inhibitor I	8	<i>Proteinase-inhibitor'</i>	ND	Green et collaborateurs, 1972
PR-7	Tomato P ₆₉	75	Endoprotéinase	ND	Vera et collaborateurs, 1988
PR-8	Cucumber chitinase	28	Chitinase de classe III	Chitine	Métraux et collaborateurs, 1988
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	35	Peroxydase	ND	Lagrimini et collaborateurs, 1987
PR-10	Parsley 'PR1'	17	'Ribonuclease-like'	ND	Somssich et collaborateurs, 1986
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	40	Chitinase de classe I	Chitine	Melchers et collaborateurs, 1994
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Défensine	Membrane	Terras et collaborateurs, 1995
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	5	Thionine	Membrane	Epple et collaborateurs, 1995
PR-14	Barley LTP4	9	LTP	Membrane	García-Olmedo et collaborateurs, 1995
PR-15	Barley OxOa (germin)	20	Oxalate oxidase	ND	Zhang et collaborateurs, 1981
PR-16	Barley OxOLP	20	'Oxalate oxidase-like'	ND	Wei et collaborateurs, 1998
PR-17	Tobacco PRp27	27	ND	ND	Okushima et collaborateurs, 2000

Figure I.I.17 : Les protéines PRs (D'après Van Loon, 1999)

Classification des protéines PRs. Les dernières données disponibles sont mises à jour sur le site internet: <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.html>, (ND: non déterminé).

résistance dite **race-spécifique** mais peut également être déclenchée par les PAMPs (Dangl and Jones, 2001; Heath, 2000). Elle se caractérise par une **mort programmée** des cellules localisées au site d'infection qui a pour conséquence d'entraîner l'apparition de **lésions nécrotiques**. Plutôt observée dans les réponses de défense contre des pathogènes biotrophes, cette résistance locale limite le développement du pathogène en réduisant l'accès aux nutriments (Dangl et al., 1996; Greenberg and Yao, 2004). Par contre, la HR peut contribuer au développement des pathogènes nécrotrophes comme c'est le cas pour *Botrytis cinerea*, qui se nourrit exclusivement de tissus morts (Govrin and Levine, 2000). Plusieurs processus cellulaires associés à la HR sont communs à la mort cellulaire programmée (PCD, *Programmed Cell Death*) tels que la rétractation du cytoplasme, la condensation de la chromatine, ou l'implication de protéases à cystéine. Les mécanismes qui gouvernent la HR ne sont pas encore complètement élucidés, mais plusieurs preuves indiquent un **lien entre la HR et la voie SA** (Alvarez, 2000).

En réponse à des pathogènes avirulents, une **autre forme de résistance** se propage dans la plante entière par l'intermédiaire du **système vasculaire: la SAR** (Sticher et al., 1997). Cette protection durable est nécessaire à la plante pour se défendre contre l'attaque ultérieure d'un large spectre de pathogènes. De nombreux travaux ont montré que la SAR implique la voie dépendante du SA. Cette hormone s'accumule en effet au niveau des lésions créées par les pathogènes mais également dans les tissus non infectés. Par ailleurs, l'expression de gènes marqueurs de la voie SA (PR-1), est observée lors de la SAR (Durrant and Dong, 2004). Des greffes entre des plantes sauvages et des plantes transgéniques NahG pour lesquelles le SA est dégradé ont démontré que le SA ne serait pas le signal transféré au cours de la SAR. La nature des signaux mobiles qui déclenchent la SAR sont encore méconnus (van Loon et al., 2006).

2. Les différentes stratégies de neutralisation des défenses par des agents pathogènes bactériens

Dans certaines conditions, les plantes dites hôtes s'avèrent sensibles et développent des symptômes de maladie lors d'une infection par un agent pathogène virulent. Si grâce à leurs systèmes de reconnaissance des PAMPs, les plantes sont capables de reconnaître un grand nombre de micro-organismes et d'activer les défenses, comment les agents pathogènes sont-ils capables de réaliser l'infection et de se multiplier dans la plante?

Cette capacité est en grande partie associée à la mise en place de **facteurs de virulence** de nature variée: des protéines sécrétées (**effecteurs**), des **toxines** et des **analogues de phytohormones** qui contribuent à manipuler le métabolisme de la plante hôte pour contrecarrer la mise en place de la PTI. Les dernières avancées en matière de métabolomique, génomique et transcriptomique ont permis de mieux comprendre les interactions moléculaires à l'interface de la plante hôte et d'un micro-organisme virulent. Ici seront illustrées les principales stratégies établies par des pathogènes pour pouvoir contourner les défenses, à savoir la sécrétion de phytotoxines, d'hormones et l'injection d'effecteurs. Un exposé plus précis concernera l'implication des effecteurs sécrétés par le système de sécrétion de type III (Et3s) dans le pouvoir pathogène de bactéries phytopathogènes et sur les différentes voies de signalisation de la plante ciblées et neutralisées par ces effecteurs.

2.1 Les stratégies mises en place par les pathogènes pour contourner les défenses

_ La sécrétion de phytotoxines

La plupart des agents pathogènes sécrètent des **phytotoxines** pour exacerber, amplifier leur virulence. Ces toxines sont des **composés de faible poids moléculaire** qui **détériorent les tissus de l'hôte** ou **manipulent le métabolisme des plantes** pour faciliter les processus d'infection. Les syringomycines et syringopeptides de *P. syringae* par exemple sont des lipodepsipeptides qui forment des pores dans la membrane plasmique des cellules hôtes au site d'infection entraînant une fuite en électrolytes et généralement la mort cellulaire. Au cours de ce processus, des éléments nutritifs sont relargués des tissus de l'hôte au bénéfice du pathogène. D'autres phytotoxines n'agissent pas directement sur les tissus végétaux mais **miment l'effet de certains composés de la plante comme les hormones**.

Parmi les composés les mieux décrits, la coronatine de *P. syringae* est un composé majeur qui agit sur les interactions antagonistes existantes entre le SA et le JA «en mimant» la structure du JA-Ille. Aussi, la **coronatine** est capable de lier le récepteur COI1 pour contribuer à l'antagonisme SA/JA en réprimant les voies de signalisation SA et les mécanismes de défense qui y sont associés, augmentant ainsi la virulence du pathogène (da Cunha et al., 2007). Concernant l'effet biologique de ce composé sur les plantes, il a été prouvé que des plantes infectées par des mutants de *P. syringae* déficients en coronatine sont plus résistantes au pathogène et présentent des symptômes de chlorose moins développés qu'en réponse à une souche sauvage de *P. syringae* (Nomura et al., 2005). La coronatine n'est pas le seul composé phytotoxique produit par *P. syringae*. Très récemment, il a été démontré que le pathogène *P. syringae* pv. *tabaci* pathogène virulent chez le tabac *Nicotiana benthamiana*, ne produit pas de coronatine mais supprime les réponses de défense via l'action d'autres métabolites qui interfèrent avec les voies dépendantes du SA (Lee et al., 2013).

_ La synthèse de composés hormonaux

Plusieurs souches de *P. syringae* sont capables de produire de l'**auxine**, ce qui provoquerait non seulement une augmentation de la sensibilité des plantes au pathogène mais aussi l'induction de la biosynthèse de cette hormone par la plante.

Ainsi certains pathogènes comme *P. syringae* pv. *savastanoi* synthétisent de fortes quantités d'auxine (Yamada, 1993) et d'autres comme *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Howden et al., 2009) ou *Pst* DC3000 entraînent en plus une augmentation de la production d'auxine par la plante-hôte (Glickmann et al., 1998; O'Donnell et al., 2003). Il a été démontré notamment que la surexpression de *TIR1* (récepteur à l'auxine) chez *Arabidopsis* entraîne une augmentation de la sensibilité à *Pst* DC3000 (Navarro et al., 2006).

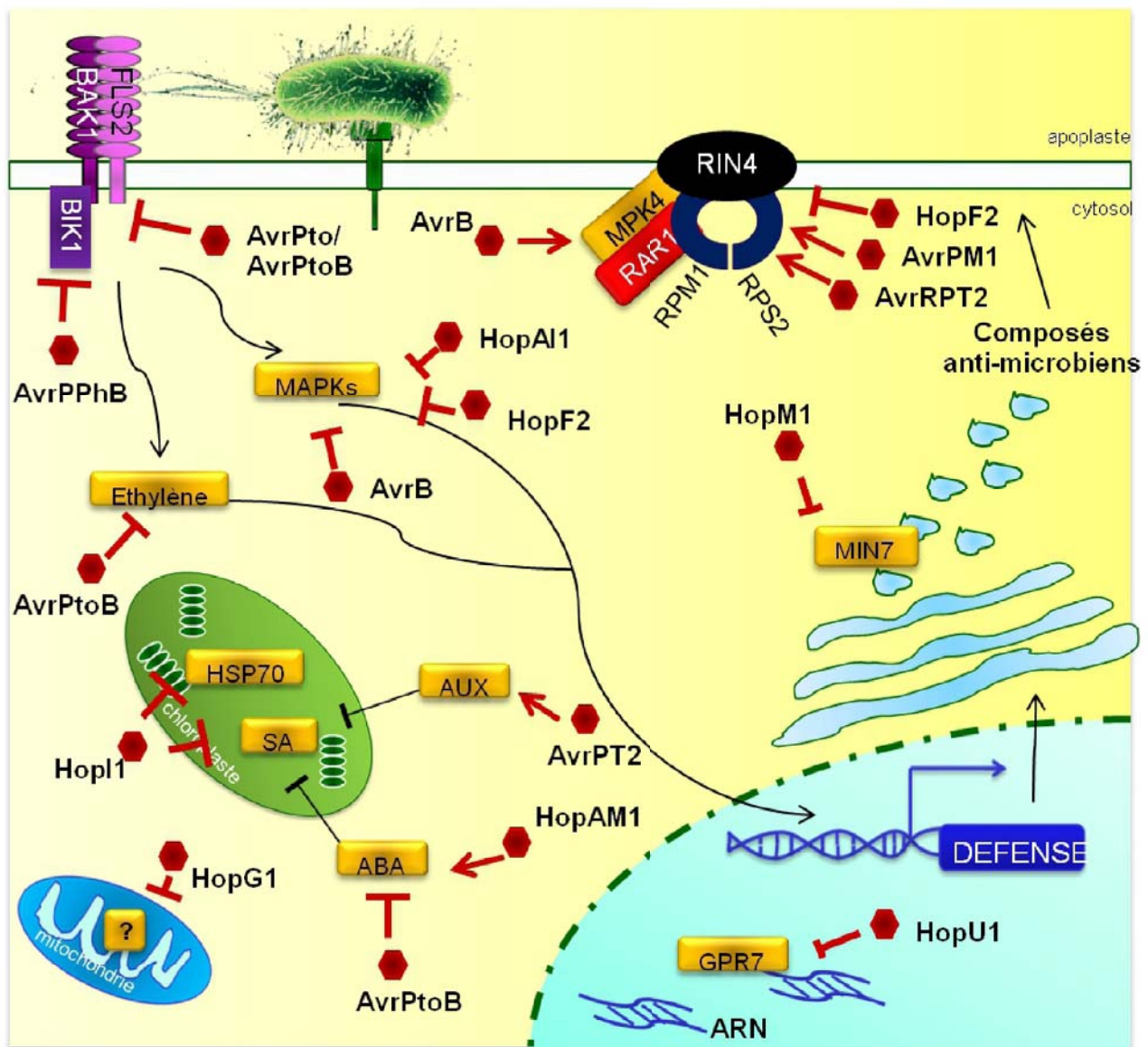


Figure I.18: Overview des effecteurs de *P. syringae* et de leurs cibles (D'après Collmer, 2012)

Les effecteurs suppriment les réponses de défense en interférant avec différents éléments des voies de signalisation activées en réponse à la perception du pathogène. Une grande majorité des cibles des effecteurs sont des kinases ou des protéines impliquées dans des cascades de phosphorylation (MAPKs, MAPK4, RIN4, FLS2, BAK1, BIK1). D'autres effecteurs sont capables de contre-carrer directement les voies hormonales (SA) ou au contraire d'activer les voies de signalisation de certains composés hormonaux qui agissent de manière antagoniste (ABA, AUX). Certains effecteurs sont capables d'exercer un contrôle transcriptionnel sur l'expression des gènes de défense ou post-transcriptionnel sur la machinerie de dégradation des petits ARNs (GPR7). Le trafic vésiculaire qui permet le transport de composés anti-microbiens (MIN7) est aussi la cible d'effecteurs.

_ La synthèse d'enzymes de dégradation de la paroi végétale

Les bactéries phytopathogènes sont aussi capables de sécréter une batterie **d'enzymes de dégradations** de la paroi végétale appelées *cell-wall degrading enzymes (CWDEs)* afin de faciliter le processus d'**extraction des nutriments** provenant des tissus infectés. Parmi ces CWDEs de nombreuses cellulases, pectinases et protéases sont essentielles pour le pouvoir pathogène de *Dickeya dadantii*. (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996), *Xanthomonas campestris pv.campestris* (Wang et al., 2007) et *Ralstonia solanacearum* (Allen et al., 1997; González and Allen, 2003), et sont présentes dans le génome de *P. syringae* même si leur fonction est moins bien connue (Fogliano et al., 2002).

_ L'injection d'effecteurs

Les bactéries pathogènes ont développé un mécanisme performant pour détourner les défenses basée sur l'**injection de molécules effectrices** dans les cellules animales ou végétales qui bloquent les défenses de l'hôte (Block et al., 2008). L'injection d'effecteurs est rendue possible grâce à différents systèmes de sécrétion qui transportent des macromolécules entre le cytoplasme bactérien et le milieu extérieur. Cinq types de systèmes de sécrétion (type I à V; SST1 à SST5) sont décrits chez les bactéries et classés d'après leur composition protéique et leur mode d'action (Baron and Coombes, 2007). Bien que l'impact de ces systèmes de sécrétion sur la virulence des bactéries varie d'un pathogène à l'autre, un **rôle essentiel dans la pathogénie** a été attribué au **système de sécrétion de type III (SST3)** de bactéries phytopathogènes ou de pathogènes d'animaux (*Yersinia*, *Shigella*...). Les bactéries *gram-* pathogènes de plantes comme *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* et *Ralstonia solanacearum* infectent leur hôte en entrant par les blessures ou les ouvertures naturelles (stomates, hydrotodes, émergence des racines latérales...). Une fois à l'intérieur, elles produisent des facteurs de virulence. Parmi les facteurs de virulence les plus importants, les **effecteurs de type III ou T3Es (Type 3 effectors)** sont injectés directement dans les cellules de l'hôte via le SST3. Chez les bactéries phytopathogènes, le SST3 est codé par des gènes du cluster *hrp (HR and pathogenicity)*. Il est décrit comme un système d'injection des T3Es. Les T3Es sont indispensables à l'expression du pouvoir pathogène puisque des mutants de sécrétion *hrp* perdent leur pouvoir pathogène (Alfano and Collmer, 2004).

La partie suivante de cette introduction explique de manière plus détaillée comment les T3Es inhibent les défenses végétales et induisent la maladie.

2.2 Importance des effecteurs de type 3 (T3Es) dans la virulence chez les bactéries phytopathogènes

2.2.1 T3Es et virulence bactérienne

La suppression des défenses de la plante associées à la PTI par les T3Es bactériens est désignée sous le terme d'**ETS (effector-triggered susceptibility, figure I.1.18)**. Dans le cas de bactéries

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

phytopathogènes disposant d'un SST3 pour lesquelles des informations de séquence sont disponibles, le répertoire de T3Es prédits ou avérés s'établit entre 15 et 30 membres (Cunnac et al., 2009). Parmi les 28 T3Es de *Pst* DC3000, 21 sont capables de supprimer au moins un des processus associés à la PTI (Cunnac et al., 2009). Pour pouvoir exercer cette fonction, **les T3Es vont mimer des composants naturels de la plante**, ils possèdent des caractéristiques retrouvées chez des protéines Eucaryotes comme des domaines de type LRR, des séquences de localisation nucléaire ou chloroplastique, etc. D'autres ont des fonctions enzymatiques de type phosphatase. Enfin, certains T3Es ont une structure proche de protéines de l'hôte, c'est le cas des T3Es qui ont une activité de type cysteine protease ou de ceux qui ciblent le protéasome de la cellule hôte. Par exemple, l'effecteur AvrPtoB de *P. syringae* pv. *tomato* possède une activité E3 ligase qui permet l'ubiquitination et donc la dégradation de protéines cibles (Abramovitch et al., 2006). Les effecteurs GALA de *Ralstonia solanacearum* possèdent un domaine F-box qui interagit avec les sous unités Skp1 et Cullin1 de la plante formant un complexe ubiquitine E3 ligase de type SCF active (Angot et al., 2006).

Un ET3 peut cibler une seule protéine, mais dans la majorité des cas, il va en neutraliser plusieurs. C'est le cas par exemple de l'effecteur HopM1 de *P. syringae* capable d'interagir avec 21 protéines cibles d'*Arabidopsis* en double hybride (Nomura et al., 2006) ou encore d'AvrPto et AvrPtoB qui présentent de multiples partenaires (Munkvold and Martin, 2009). Si certains effecteurs sont à eux seuls responsables en grande partie du pouvoir pathogène, d'autres agissent de manière redondante pour supprimer les réponses de la PTI.

La recherche des cibles végétales de ces effecteurs constitue un véritable challenge pour les phytopathologistes. L'identification des cibles végétales des T3Es par des approches *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence des récepteurs aux PAMPs, des éléments des voies de signalisation (MAPK, hormones), et des régulateurs de défense (Lindeberg et al., 2012).

2.2.2 Voies de signalisation du végétal ciblées par les T3Es

Chez *P. syringae*, les effecteurs **AvrPto** et **AvrPtoB** interagissent par exemple avec plusieurs RLKs et/ou récepteurs aux PAMPs comme FLS2, CERK1, EFR et BAK1, ce qui entraîne un blocage des réponses de défense normalement activées en aval. AvrPtoB qui possède une activité E3 ligase peut ubiquitinyler FLS2, EFR et CERK1 *in vitro*, FLS2 *in vivo* et entraîner une dégradation de CERK1 *in planta*, certainement par le même mécanisme (Lewis et al., 2009). Un autre effecteur de *P. syringae*, **AvrPphB** possède une activité cystéine protéase qui entraîne le clivage de BIK1 et de plusieurs PBS1-like (PBL) kinases, ce qui a pour conséquence d'inhiber les défenses normalement mises en place en réponse à flg22 (Zhang et al., 2010). Les trois souches séquencées de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) possèdent également un effecteur nommé **AvrAC** qui participe à la virulence bactérienne en ciblant spécifiquement deux protéines de type RLKs; BIK1 et RIPK. AvrAC possède une activité uridylyltransférase et va ajouter un groupement uridine-5-monophosphate sur des sites conservés de phosphorylation de BIK1 et RIPK, ce qui inhibent leur activité et de ce fait l'activation des réponses de défense (Feng et al., 2012).

Chez la plante hôte, la perception des PAMPs entraîne l'activation de cascades de transduction de signaux faisant intervenir la voie des MAPKs. Cette voie de signalisation est ciblée

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

par un ou plusieurs **effecteurs bactériens qui agissent soit en phosphorylant soit en déphosphorylant les MAPKs** (Lewis et al., 2009, Deslandes and Rivas, 2012). Aussi, certains effecteurs suppriment la PTI en bloquant l'activité kinase; **HopF2** est un effecteur de *P.syringae* qui atténue l'activité de MKKs et interfère ainsi avec la PTI. D'autres effecteurs interagissent spécifiquement avec certaines MAPKs (Deslandes and Rivas, 2012). C'est le cas notamment d'un ET3 de *Pst DC3000*: **HopAI1**, qui interagit avec MPK3 et MPK6 en réponse à la flg22. HopAI1 possède une activité phosphatase conduisant à une déphosphorylation des MAPKs ce qui a pour conséquence de supprimer les événements de défense associés à la PTI (Zhang et al., 2007). HopAI1 bloquerait également l'activité d'une autre MAPK, MPK4, ce qui aurait pour conséquence de supprimer les défenses basales de la plante hôte mais également d'activer une protéine de résistance de type NB-LRR: SUMM2 (Zhang et al., 2012). La MPK4 peut se comporter comme un régulateur négatif de la PTI en modulant les voies hormonales de défenses (Zhang et al., 2012). **AvrB** est un autre effecteur de *P. syringae* qui serait responsable de la phosphorylation de MPK4 et pourrait induire une sensibilité exacerbée des plantes hôtes en dérégulant indirectement les voies hormonales (Cui et al., 2010). De plus, AvrB ciblerait la protéine RIN4 un autre régulateur négatif de la PTI (Deslandes and Rivas, 2012).

Certaines étapes clefs de biosynthèse des hormones de défense comme le SA et JA ont lieu dans le chloroplaste. Plusieurs travaux ont mis en évidence que **certaines effecteurs de *Pst DC3000* possèdent des séquences d'adressage au chloroplaste**. Ces effecteurs pourraient altérer la biosynthèse des hormones au cours de la PTI. C'est le cas notamment de **HopI1** qui interfère avec l'accumulation du SA au niveau du chloroplaste très certainement en stimulant l'activité de protéines HSP70. Le lien entre ces protéines et la production de SA reste cependant à déterminer (Block and Alfano, 2011). D'autres effecteurs viennent indirectement **contrecarrer la production de SA** en stimulant la production d'hormones antagonistes comme l'auxine ou l'ABA afin de promouvoir l'infection. Il a été démontré que l'effecteur **AvRpt2 induit une accumulation d'auxine** chez *Arabidopsis* et augmente la sensibilité au pathogène (Chen et al., 2007). D'autres effecteurs de *P. syringae* tels que **HopAM1** vont induire chez des plantes d'*Arabidopsis* **une hypersensibilité à l'ABA** et promouvoir la virulence de *P. syringae* sur des plantes en déficit hydrique (Goel et al., 2008), d'autres comme **AvrPtoB stimulent la production d'ABA** (de Torres-Zabala et al., 2007). **AvrPtoB** est également décrit comme étant un **régulateur des voies de signalisation des BRs et de l'ET**. AvrPtoB interagit avec BAK1 qui est lui-même associé au récepteur BRI1 des brassinostéroïdes, ces derniers jouent un rôle important dans la défense contre une grande variété de pathogènes chez le tabac et le riz. AvrPtoB affecte également la voie de biosynthèse de l'éthylène puisqu'il induit l'expression des ACCs oxydases responsables de la production de cette hormone (Lewis et al., 2009).

Les effecteurs ne ciblent pas uniquement les voies de signalisation mais régulent directement certains processus cellulaires comme le **trafic vésiculaire** qui permet la sécrétion des composants qui renforcent la paroi au niveau du site d'infection par le pathogène. La protéine MIN7 (*HopM1 Interactor 7*) appartient à la famille ARF-GEF (pour *adenosine diphosphate ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor*) dont les membres sont impliqués dans le transport vésiculaire de composés telle que la callose au cours de la PTI (Steinmann, 1999). HoPM1 est un facteur de virulence de *P. syringae* qui induit la dégradation de plusieurs protéines par le protéasome chez *Arabidopsis* dont MIN7, afin de supprimer les défenses basales associées au renfort pariétal (Nomura et al., 2006).

CHAPITRE I : Concepts de phytopathologie

Certains effecteurs bactériens sont décrits comme agissant directement sur les **processus de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle** de la plante. Le facteur de virulence HopU1, une mono-ADP-ribosyltransferase de *P. syringae* exerce son activité enzymatique sur la protéine de liaison à l'ARN, GRP7, impliquée dans la PTI. Cette interaction affecterait la régulation de nombreux gènes et contrôlerait négativement les réponses de défense (Fu et al., 2007; Monaghan and Zipfel, 2012).

Enfin, **d'autres ET3s agissent comme des facteurs de transcription**. Les effecteurs de la famille AvrBs3, identifiés chez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pathogène du poivron, agissent directement sur la transcription en se liant à l'ADN (Boch et al., 2009). Ces effecteurs possèdent les caractéristiques d'un facteur de transcription avec un signal de localisation nucléaire et un domaine leucine zipper de liaison à l'ADN et un domaine d'activation de la transcription et ils sont capables d'induire l'expression des gènes de l'hôte (Kay et al., 2007).

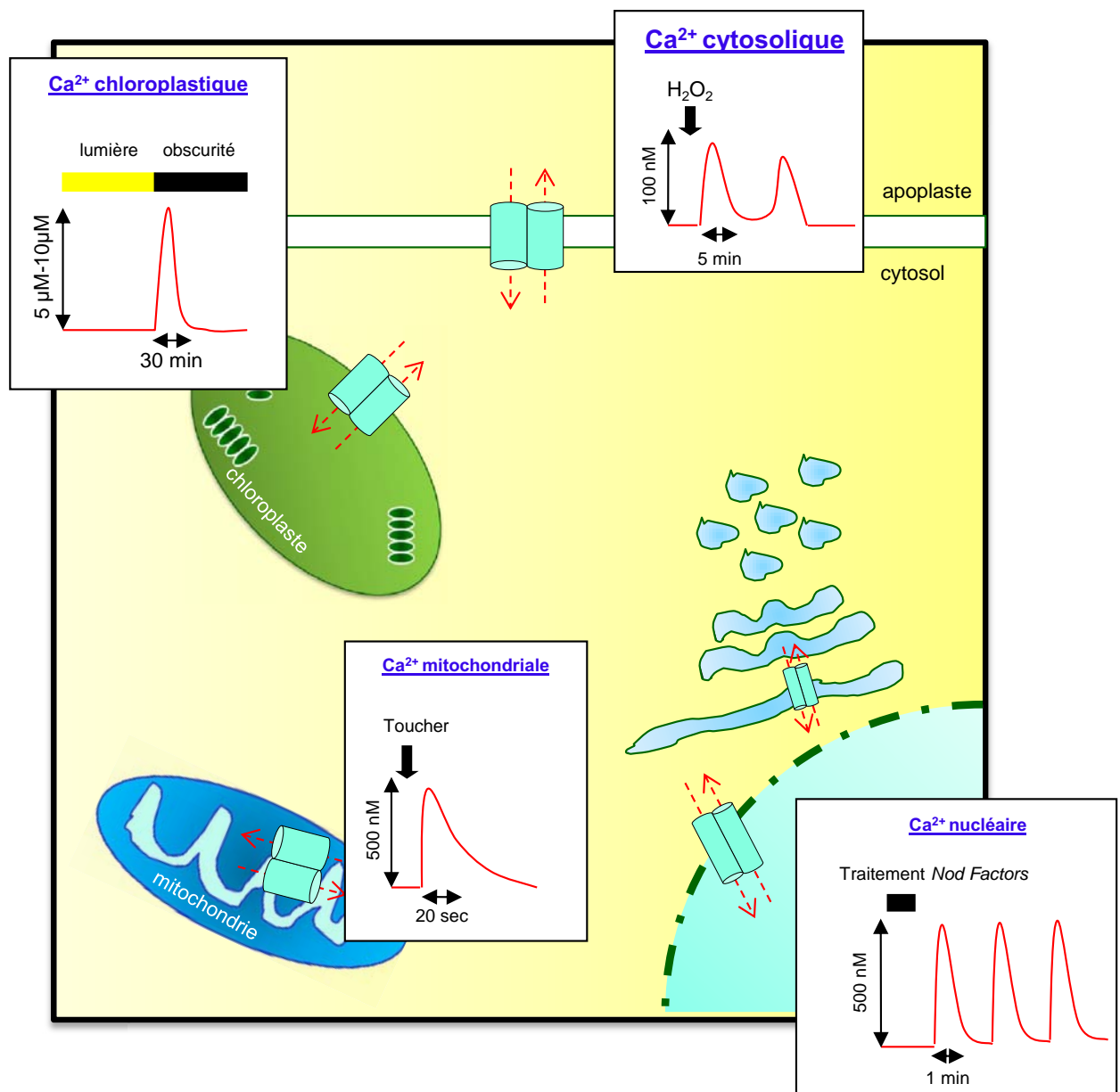


Figure I.I.19: Signatures calciques induites par différents stimuli dans le cytosol et les organites des cellules de plantes.

De nombreuses données sur les variations intracellulaires du taux de calcium ont été acquises grâce à l'utilisation de divers outils permettant la mesure du calcium libre dans les différents compartiments de la cellule. Diverses signatures calciques, de durée, d'amplitude, de fréquence différentes ont pu être mesurées dans le cytoplasme après l'application d'H₂O₂ et dans différents organites suite à des stimuli variés, comme l'application de facteur s NOD au niveau nucléaire, dans la mitochondrie suite à une induction par le toucher, ou dans le chloroplaste lors de la transition lumière/obscurité.

CHAPITRE II: SIGNALISATION CALCIUM ET DEFENSE

Introduction: Importance du calcium et de la signalisation calcique au cours de stress biotiques

A l'échelle cellulaire, la compréhension des mécanismes d'adaptation des plantes aux stress de l'environnement a fait l'objet de nombreux travaux. Certains se sont particulièrement focalisés sur les évènements précoces déclenchés par la perception du stress et notamment sur la contribution des messagers secondaires et les mécanismes qui permettent leur décodage. Parmi ces messagers secondaires, **l'ion calcium** est un véritable **intégrateur des fluctuations de l'environnement**. Bien plus qu'un élément nutritif et de structure de la paroi de la cellule végétale, il module de nombreux aspects physiologiques tels que la croissance, le développement et les réponses aux contraintes de l'environnement (Knight et al., 1998; Lecourieux et al., 2002; Hetherington and Brownlee, 2004; Hepler, 2005; Lecourieux et al., 2006). Ces dernières années, les variations de Ca^{2+} intracellulaire ont pu être mesurées et suivies efficacement grâce au développement de différents outils comme les sondes caméléons (protéines fluorescentes couplées à la calmoduline) et l'aéqorine (protéine bioluminescente sensible au Ca^{2+} , Rudd and Franklin-Tong, 2001).

Dans le cytosol, la concentration en Ca^{2+} cytosolique est maintenue à une faible teneur à l'état de repos, et augmente de manière rapide et transitoire en réponse aux facteurs abiotiques comme les variations de température, de lumière, le stress salin et le stress hydrique (Hepler, 2005; Hetherington and Brownlee, 2004; Knight, 2001; Lecourieux et al., 2002; Rentel and Knight, 2004) mais également en réponse à des changements de l'homéostasie hormonale, de la présence de microorganismes symbiotiques ou pathogènes, et en réponse aux PAMPs (Lecourieux et al., 2002; Ranf et al., 2008; Maffei et al., 2007; Navazio et al., 2007; Shaw and Long, 2003). Cette **homéostasie** est rendue possible grâce à des **systèmes d'efflux/influx (pompes /canaux)** et de **compartmentation cellulaire de l'ion Ca^{2+}** qui est stocké principalement dans l'apoplasme, la vacuole et le réticulum endoplasmique (**figure I.II.1**).

Ces variations de Ca^{2+} se définissent par des caractéristiques spatio-temporelles spécifiques (fréquence, amplitude, durée, localisation) appelées communément «**signatures calciques**» (McAinsh and Hetherington, 1998; Scrase-Field and Knight, 2003). L'information codée par ces signatures est décryptée, amplifiée, relayée et convertie en une réponse biologique adaptée au stimulus de départ par des **protéines affines pour le Ca^{2+}** . La plupart d'entre elles possèdent un motif «**EF-hand**», structure secondaire de type hélice-boucle-hélice capable de lier l'ion Ca^{2+} . Lors de la liaison au Ca^{2+} , des changements de la conformation des protéines senseurs de Ca^{2+} a pour conséquence l'activation de leur fonction régulatrice exercée sur des **protéines cibles** (**figure I.II.2a**).

A ce jour, bien que la plupart des protéines à motifs EF-hand présentes chez l'homme et les animaux aient été largement étudiées, le séquençage d'*Arabidopsis* a révélé un grand nombre de protéines à motifs EF-hand dont les fonctions sont encore méconnues. Près de 250 protéines à motif

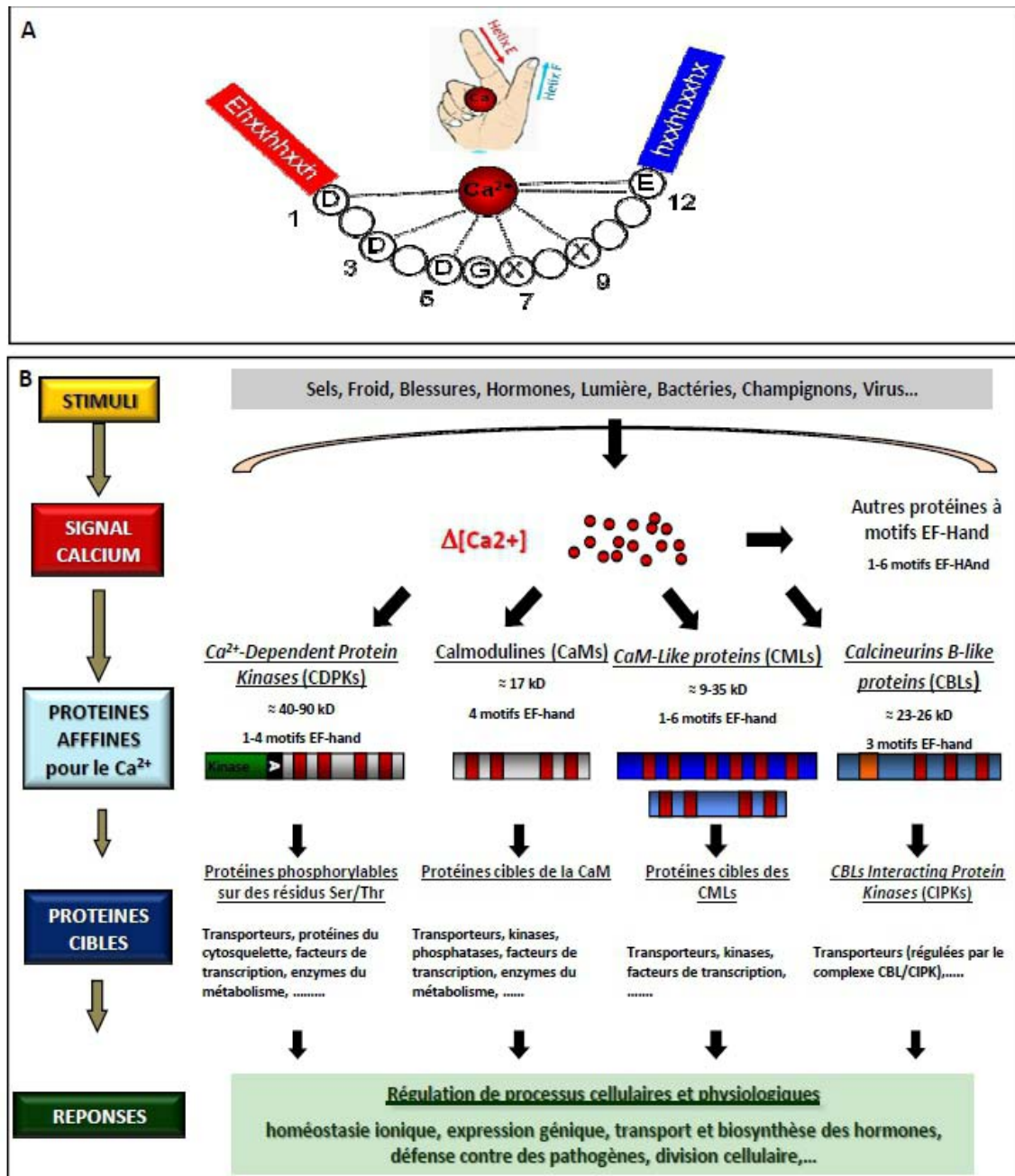


Figure 1.1.20: Représentation schématique du motif de liaison au calcium (EF-Hand) et de la structure des protéines participant à la signalisation calcique (modifié d'après Zhou , 2009).

A. Représentation schématique du motif EF-hand.

Ce motif est constitué de 29 résidus formant une structure Hélice-Boucle-Hélice. Cette structure peut être représentée dans l'espace à l'aide d'une main, ce qui est à l'origine du nom de ce motif. Les résidus 1,3,5,7,9,12 de la boucle sont impliqués dans la fixation de l'ion calcium. h: résidu hydrophobe, x:n'importe quel résidu.

B. Représentation schématique des principales familles de protéines affines pour le calcium chez les plantes.

Suite à la perception de différents stimuli, des variations de calcium intracellulaire constituent un message intracellulaire qui est décodé par différentes familles de protéines affines pour le calcium, permettant d'activer des réponses physiologiques appropriées au stimulus initial. Le motif de liaison au calcium EF-hand est représenté en rouge. En orange est représenté un motif EF-hand de 14 AA présent chez les CBLs en position N-terminal. La lettre A représente le domaine auto-inhibiteur de l'activité kinase des CDPKs.

CHAPITRE II : Signalisation calcium et défense

EF-hand sont présentes chez *Arabidopsis*. Ces protéines peuvent être, sur la base d'homologies de séquence, subdivisées en 3 catégories: les **calmodulines (CaMs)** et *calmodulin-related proteins* appelées communément **CMLs (calmodulin-like)**, les CDPKs et CBLs (Boonburapong and Buaboocha, 2007; Luan et al., 2002 ; **figure I.II.2b**). Les CaMs sont présentes aussi bien chez les plantes que chez les animaux alors que les **CMLs (calmodulin-like)**, les CDPKs et CBLs sont **spécifiques du règne végétal ou retrouvées uniquement chez certains protistes**. Cette diversité pourrait être une stratégie mise en place pour pouvoir répondre aux stress de l'environnement auxquels elles ne peuvent échapper du fait de leur immobilité. Ces protéines contrôlent des fonctions essentielles pour la survie de la plante dont certaines ont été bien décrites au cours du développement et au cours de stress abiotiques (Reddy et al., 2011).

Des travaux récents font état du rôle important des protéines de liaison au calcium au cours de stress biotiques. L'importance des CDPKs et CBLs en réponse aux agents pathogènes a déjà été abordée dans la **PARTIE I** et il ne sera donc présenté ici que les éléments régulés par les CaM/CMLs impliqués dans la génération des signaux calciques et dans la régulation de l'expression génique en réponse aux pathogènes. Pour cela, je m'appuierai sur l'article «**Recent advances in calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity**» publié dans BBA (*Biochimica et Biophysica Acta*) et qui présente ces différents aspects.



Review

Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity[☆]Cécilia Cheval^{*}, Didier Aldon, Jean-Philippe Galaud, Benoît Ranty

Université de Toulouse (UPS), UMR 5546 Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP42617, F-31326 Castanet-Tolosan CEDEX, France
 CNRS, UMR 5546, BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan CEDEX, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2012

Received in revised form 20 January 2013

Accepted 21 January 2013

Available online 1 February 2013

Keywords:

Calcium signalling

Signal transduction

Calmodulin-binding proteins

Defence responses

Plant-microbe interactions

Transcriptional regulation

ABSTRACT

Calcium is a universal messenger involved in the modulation of diverse developmental and adaptive processes in response to various physiological stimuli. Ca²⁺ signals are represented by stimulus-specific Ca²⁺ signatures that are sensed and translated into proper cellular responses by diverse Ca²⁺ binding proteins and their downstream targets. Calmodulin (CaM) and calmodulin-like (CML) proteins are primary Ca²⁺ sensors that control diverse cellular functions by regulating the activity of various target proteins. Recent advances in our understanding of Ca²⁺/CaM-mediated signalling in plants have emerged from investigations into plant defence responses against various pathogens. Here, we focus on significant progress made in the identification of CaM/CML-regulated components involved in the generation of Ca²⁺ signals and Ca²⁺-dependent regulation of gene expression during plant immune responses. This article is part of a Special Issue entitled: 12th European Symposium on Calcium.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In their natural environment, plants are constantly exposed to fluctuating conditions, and they have evolved sophisticated mechanisms to perceive and respond to environmental cues in order to survive and propagate. To process the information perceived, plants use secondary messengers such as the Ca²⁺ ion. An increase in free Ca²⁺ levels in a cell compartment acts as a signal carrying specific information to be translated into appropriate biological responses by downstream effectors. Many exogenous and endogenous factors including light, temperature, drought and salt stress, pathogen-derived molecules and phytohormones provoke elevations of free Ca²⁺ levels in different compartments of plant cells [1]. The Ca²⁺ level peaks with spatio-temporal characteristics depending on the nature and the strength of the primary stimulus. These stimulus-specific patterns of Ca²⁺ signals, also called Ca²⁺ signatures, result from a tight control of the activities of channels and pumps, present on the plasma-membrane and endomembranes, that govern Ca²⁺ flux between neighbouring compartments [2]. As plants appear to lack most of the Ca²⁺ channels found in animals, the

search for ion channels initiating Ca²⁺ elevation in plant cells has been a topic of intense research that has provided evidence for the contribution of cyclic nucleotide gated channels, glutamate-like receptor channels and two-pore channels to Ca²⁺ signalling in plants [3–5]. Ca²⁺ extrusion systems that restore a basal Ca²⁺ level after a Ca²⁺ rise are represented by Ca²⁺-ATPase pumps and Ca²⁺/proton exchangers [6,7]. Ca²⁺ efflux processes are as important as Ca²⁺ influx events in shaping defined Ca²⁺ signals, and both processes are subject to complex regulation in order to coordinate their respective activities.

Ca²⁺ signatures are recognized by Ca²⁺ binding proteins that translate Ca²⁺ signals into cellular responses through Ca²⁺-dependent regulation of downstream effectors. Most Ca²⁺ sensor proteins possess EF hand motifs, a helix-loop-helix structure that binds one Ca²⁺ ion [8]. Upon Ca²⁺ binding, Ca²⁺ sensors undergo conformational changes that promote either their own catalytic activity or their interaction with target proteins. Plants have a superfamily of EF hand proteins with at least 250 members predicted from the genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* [9], and those known to function as Ca²⁺ sensors and transducers are mainly represented by three sub-families: calmodulin (CaM) and calmodulin-like proteins (CMLs), Ca²⁺-dependent protein kinases (CPKs), calcineurin B-like proteins (CBLs) and their interacting protein kinases [10]. CaM, a well known Ca²⁺ sensor found in all eukaryotes, is highly conserved during evolution, whereas CMLs, CPKs and CBLs appear to be restricted to plants and lower protists [11].

Because Ca²⁺ acts as a versatile second messenger in various developmental processes and adaptation responses, progress in our understanding of Ca²⁺ signalling systems has emerged from studies performed in various fields of plant biology. In particular, investigations on plant defence strategies against pathogens have greatly contributed

Abbreviations: CaM, calmodulin; CML, calmodulin-like; CPK, calcium-dependent protein kinase; CBL, calcineurin B-like; Pst, *Pseudomonas syringae* pathovar tomato; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; ETI, effector-triggered immunity; PTI, PAMP-triggered immunity; HR, hypersensitive response; ACA, autoinhibited Ca²⁺-ATPase; CNGC, cyclic nucleotide-gated channel; RSS, RNA silencing suppressor; TF, transcription factor; CAMTA, calmodulin binding transcription activator; SA, salicylic acid; NO, nitric oxide

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: 12th European Symposium on Calcium.

^{*} Corresponding author. Université de Toulouse (UPS), UMR 5546 Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP42617, F-31326 Castanet-Tolosan CEDEX, France. Tel.: +33 534323828.

E-mail address: cheval@irsups-utse.fr (C. Cheval).

to identifying components involved in the generation and processing of Ca^{2+} signals, and to demonstrating their roles in plant immunity [12,13]. Because exhaustive reviews on Ca^{2+} signalling in plants are regularly published, we will focus here on recent advances in Ca^{2+} /CaM-mediated signalling during plant–pathogen interactions with an emphasis on key components involved in the generation of Ca^{2+} signals and modulation of gene expression. Readers can also refer to recent articles reviewing the function of other Ca^{2+} sensor proteins including CPKs and CBLs, in immune and stress signalling [14–16].

2. Ca^{2+} signals in plant immunity

Plants defend themselves against potential pathogens by using two main strategies [17]. The first strategy, referred as to non-host resistance, is initiated by the recognition of conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pathogen recognition receptors [18]. Typical examples of PAMPs are flg22 and elf18, two peptides derived respectively from bacterial flagellin and the elongation factor Tu, and fungal chitin. Each of these PAMPs is specifically recognized by a distinct receptor kinase. Perception of PAMPs activates diverse signalling events including the generation of Ca^{2+} signals and oxidative burst, the production of hormones and phosphorylation cascades, leading to a broad and non-specific resistance, called PAMP-triggered immunity (PTI). To counteract this basal defence, pathogens can deliver a range of effectors into plant cells that suppress PTI, thus allowing the propagation of pathogens in plant tissue and occurrence of disease. In a second strategy, plants activate another layer of defence, called effector-triggered immunity (ETI), which is initiated by the specific recognition of a pathogen effector by the corresponding plant resistance protein. ETI is a robust and specific resistance that often leads to the hypersensitive response (HR). The HR is a programmed cell death of plant cells surrounding the site of infection, which is believed to prevent further spread of the pathogen in plant tissue [19].

One of the earliest signalling events observed after the recognition of a pathogen is ion fluxes across the plasma membrane including influx of

Ca^{2+} into the cytosol [12]. Transformed plants expressing aequorin, a Ca^{2+} sensitive luminescent protein, have been used to monitor changes in intracellular Ca^{2+} levels after pathogen inoculation or application of PAMPs. Thus, distinct cytosolic Ca^{2+} signatures have been described in *Arabidopsis* leaves after infiltration with various strains of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* (*Pst*) [20]. All strains produce a rapid and transient rise in cytosolic Ca^{2+} concentrations with a maximum peaking at around 10 min after pathogen challenge. In addition, avirulent strains of *Pst* which trigger the HR, elicit a second and sustained increase in cytosolic Ca^{2+} levels, whereas virulent strains do not. Interestingly, preventing the Ca^{2+} influx with LaCl_3 , a general Ca^{2+} channel blocker, results in the suppression of the HR, suggesting a crucial role of Ca^{2+} in ETI. Similar studies have been performed after plant treatment with PAMPs such as flg22 and elf18, or other elicitors of plant defence, to show that different PAMPs and elicitors induce distinct cytosolic Ca^{2+} signatures [21]. Moreover, transgenic plants expressing aequorin targeted to different cellular compartments have revealed that PAMPs and elicitors can induce Ca^{2+} signatures not only in the cytosol, but also in the nucleus, mitochondria or chloroplasts, suggesting the integration of all organelles in plant defence systems [22,23].

Little is known about the channels and pumps controlling Ca^{2+} transport in plant cells [24]. Recently, a collection of mutants obtained by a chemical mutagen treatment of transgenic aequorin plants, has been used to isolate mutated plants exhibiting a disordered Ca^{2+} signal in response to flg22 treatment [25]. Interestingly, some mutants show differential phenotypes induced by various PAMPs, and further characterization of these plants will likely lead to the discovery of key actors required for the generation and/or regulation of Ca^{2+} signals during PAMP signalling. Other genetic approaches performed to isolate mutants with impaired pathogen resistance, have recently revealed the essential roles of Ca^{2+} permeable channels, such as cyclic nucleotide-gated channels (CNGCs), and Ca^{2+} pumps, like autoinhibited Ca^{2+} -ATPases (ACAs), in plant immunity (Fig. 1). CNGCs are non-selective cation channels that were shown to conduct Ca^{2+} through the plant cell plasma-membrane [26]. Disruption of *CNGC2* or *CNGC4* genes in *Arabidopsis* results in an

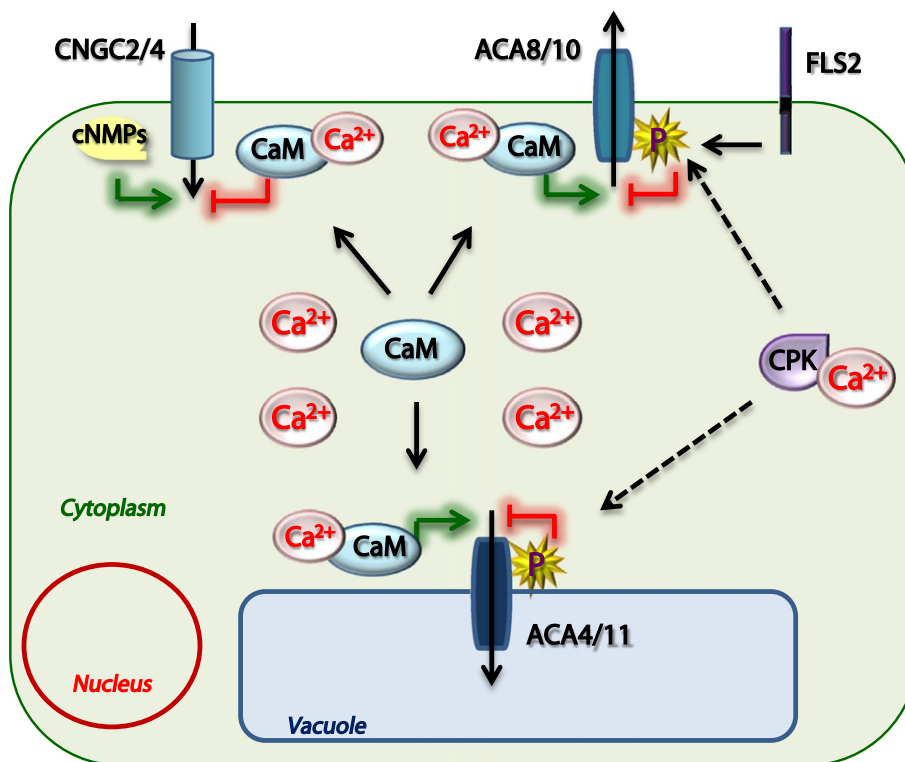


Fig. 1. Role of Ca^{2+} and CaM in regulating the activities of Ca^{2+} influx/efflux systems involved in plant immunity. Details are given in the text.

impaired HR phenotype in response to avirulent pathogens [27,28]. In addition, monitoring Ca^{2+} signals in *cngc2* mutant background expressing aequorin suggests that CNGC2 facilitates Ca^{2+} flux into the cytosol during plant–pathogen interactions [3]. Other Ca^{2+} permeable channels such as glutamate-like receptors (GLRs) have been proposed to function in plant defence signalling. Inhibiting GLRs in tobacco cells using antagonists of animal ionotropic glutamate receptors was found to reduce the cytosolic Ca^{2+} signal and the production of NO induced by cryptogein, a fungal elicitor [29]. Furthermore, cryptogein triggers a release of glutamate in the apoplast at a concentration allowing the activation of GLRs. Genetic approaches have also been used to show a role for GLRs in development and adaptation to stresses [30], but the identity of the genes associated to plant defence remains to be elucidated.

On the Ca^{2+} efflux side, disruption of several members of the ACA family was found to alter plant immunity in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* has 14 P-type Ca^{2+} ATPases including 10 ACAs located on different cellular membranes [31]. A double knockout mutation in the vacuolar Ca^{2+} pumps, ACA4 and ACA11, results in a high frequency of HR-like lesions by potentiating the action of salicylic acid (SA), a phytohormone playing a pivotal role in defence [32]. Other work has shown that disruption of the plasma membrane-localized ACA8 or ACA10 leads to an enhanced susceptibility to a virulent strain of *Pst* [33]. Interestingly, a modified Ca^{2+} signature was observed in the double mutant *aca8/aca10* in response to flg22 treatment. The expression levels of other ACAs, including ACA12 and ACA13, were also found to be dramatically induced upon exposure to pathogens, suggesting the involvement of additional members of the ACA family in the control of Ca^{2+} homeostasis during pathogen infection [34].

All these data reveal that the action of channels and pumps governing Ca^{2+} flux across the plasma-membrane and the tonoplast contributes to generating cytosolic Ca^{2+} signals elicited by pathogens and PAMPs, and that disruption of Ca^{2+} homeostasis affects the ability of plants to mount appropriate defence responses against pathogens.

As Ca^{2+} signatures result from the coordinated action of Ca^{2+} influx and efflux pathways, how Ca^{2+} -permeable channels and transporters are regulated during plant–pathogen interactions, has to be considered. CaM appears as a central player in the control of Ca^{2+} transport systems because both CNGCs and ACAs are known to be regulated by CaM (Fig. 1). It was previously shown that CNGCs are activated by cyclic nucleotides and bind CaM at a site that partially overlaps the binding site of cyclic nucleotides [35]. Binding of CaM results in the inactivation of the CNGCs by interfering with the binding of cyclic nucleotides [36]. Thus, the negative action of CaM on CNGC activity provides a direct feedback pathway allowing Ca^{2+} itself to restrict its flux into plant cells. The ACAs, described above, belong to a sub-group of CaM-regulated Ca^{2+} -ATPases that contain at their N-terminus, a CaM binding site and an auto-inhibitory domain [37]. CaM stimulates the activity of these Ca^{2+} pumps by preventing their auto-inhibition. The activity of ACAs can also be inhibited by phosphorylation within the N-terminus domain. Phosphorylation of several serine residues surrounding the CaM binding domain in ACA8 was shown to reduce the kinetics of activation by CaM [38]. Interestingly, protein kinases possibly involved in the regulation of ACAs have been proposed. Both ACA8 and ACA10 were reported to be differentially phosphorylated upon treatment of *Arabidopsis* cells by flg22, and ACA8 was found to form a complex with FLS2, the receptor-kinase of flg22, suggesting a direct regulation of the Ca^{2+} pump by the flagellin perception system [33,39]. ACA8 was also shown to be phosphorylated *in vitro* by a CPK [38]. It will be interesting to confirm that ACAs are *in vivo* substrates for CPKs because several CPKs have been recently characterized as central regulators of immune responses [14,40,41], but their substrates have to be determined. Moreover, the possibility to activate and inactivate the ACAs by two distinct Ca^{2+} sensor proteins enhances the importance of Ca^{2+} in the feedback control of Ca^{2+} transport systems.

Collectively, these data reveal a central role for CaM in the regulation of Ca^{2+} channels and pumps, like CNGCs and ACAs, whose activities can be modulated by additional regulatory events such as ligand binding or

phosphorylation. The multiple regulatory properties of CNGCs and ACAs, their diverse sub-cellular locations and tissue-specific expression patterns provide a great flexibility for modulating Ca^{2+} oscillations. A future challenge is to decipher how Ca^{2+} influx and efflux processes occurring at different cellular membranes are coordinated to generate a stimulus-specific Ca^{2+} signal.

3. Function of CaM isoforms and CMLs in plant immunity

Unlike animals, plant genomes generally contain CaM genes encoding several typical CaM isoforms and genes for divergent forms of CaM, called CaM-like proteins (CMLs). For instance, 3 distinct CaM isoforms and 50 CMLs are predicted from the *Arabidopsis* genome [42]. Despite potential redundancy between members of the CaM/CML family, accumulating evidence indicates that deregulation of CaM/CML gene expression or loss of CaM/CML function in mutated plants strongly affects immune responses (Table 1). Down-regulation of the expression of pathogen induced-CaM isoforms, such as NtCaM1 and NtCaM13, was found to differentially impact disease resistance in tobacco [43]. Thus, silencing the expression of *NtCaM13* enhanced plant susceptibility to viral, bacterial and fungal pathogens while knockdown of *NtCaM1* did not. Conversely, transient overexpression of pepper CaM1 activates the production of reactive oxygen species and NO, and induces the appearance of HR-like lesions and the expression of defence-related genes in pepper leaves, leading to a local resistance to bacterial pathogens [44]. Genetic evidence for the implication of CMLs in plant immunity was also recently reported through silencing the expression of *APR134*, a CML gene in tomato, that results in the suppression of HR, whereas overexpression of *CML43*, an ortholog of *APR134* in *Arabidopsis*, accelerates the HR [45]. *CML24*-knockout mutation in *Arabidopsis* also impairs the HR to an avirulent strain of *Pst* and reduces the generation of NO induced by lipopolysaccharides, which are bacterial components acting as PAMPs [46]. *Arabidopsis* CML9 contributes to plant immune responses, as demonstrated by the enhanced and reduced susceptibilities displayed respectively by *cml9* mutants and overexpressors in response to virulent strains of *Pst* [47]. This phenotype is defined by alterations in flg22-induced responses, including deposition of callose papillae and expression of defence-related genes. Other genetic studies have shown that a tobacco CML termed rgs-CaM (for regulator of gene silencing) plays a role in antiviral defence by modulating RNA silencing, a general plant defence strategy against viruses [48]. All these observations provide strong evidence for the involvement of CaM isoforms and CMLs in several

Table 1

Examples of CaM and CMLs involved in plant immunity. The biological effect of gene mutation or modulation of CaM/CML expression is given, together with the gene name and the organism. *Pst*: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, HR: Hypersensitive Reaction.

Gene name	Plant species	Experimental evidence	Biological effect	Reference
<i>CaM1</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Transient expression	Local resistance to <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	[44]
<i>CaM13</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Virus-induced gene silencing	Enhanced susceptibility to tobacco mosaic virus, <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	[43]
<i>Rgs-CaM</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Knockdown/overexpression	Impaired resistance to cucumber mosaic virus	[48]
<i>APR134</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Virus-induced gene silencing	Loss of HR to avirulent <i>Pst</i> (<i>avrPto</i>)	[45]
<i>CML43</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Overexpression	Accelerated HR to avirulent <i>Pst</i> (<i>avrRpt2</i>)	[45]
<i>CML24</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Point mutation	Impaired HR to avirulent <i>Pst</i> (<i>avrRpt2</i>)	[46]
<i>CML42</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Insertional mutation	Enhanced resistance to <i>Spodoptera littoralis</i>	[67]
<i>CML9</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Insertional mutation/overexpression	Impaired susceptibility to virulent <i>Pst</i>	[47]

aspects of plant immunity. Moreover, recent studies focusing on CaM/CML interacting proteins have highlighted detailed mechanisms of CaM/CML regulation of plant immunity, as described hereafter.

Searches for CML binding proteins by screening approaches have revealed that, like CaM, CML9 can bind various proteins including diverse transcription factors [49–51]. Some of these potential targets are unique to CML9 and closely related CMLs, whereas others are common to CaM. It is worth noting that CML9 interacts in plant cells with transcription factors such as WRKYs and TGAs, two classes of transcription factors known to play key roles in the regulation of disease resistance. However, the effects of CML9 on the activity of these transcription factors are yet to be elucidated. Among other CML interacting proteins, ATG4b, a cysteine protease involved in cell autophagy, was recently identified as a specific CML24 binding protein [52]. Comparative analysis of ATG4 activity in *cml24* mutant and wild-type plants suggests that CML24 is required for the regulation of ATG4 activity. ATG4b is a possible target associated to the role of CML24 in the HR, because knockout *atg* mutants, like *cml24* mutants, display defects in the HR [53]. Surprisingly, the tobacco CML (rgs-CaM), involved in the regulation of virus-induced RNA silencing, was found to directly interact with virus RNA silencing suppressors [48], thus providing the first example of interaction between a plant CML and a pathogen protein. Plants use RNA silencing as a defence strategy against viruses by promoting the cleavage of viral double-stranded RNA into short interfering RNAs (siRNAs) which then silence the expression of viral RNAs [54]. However, viruses possess RNA silencing suppressors (RSSs) which weaken the host defence response. RSSs bind to siRNAs and block their action. As observed in the ETI, plants have developed proteins that can detect viral RSSs, and a direct interaction of rgs-CaM with diverse RSSs has been observed in tobacco cells. Rgs-CaM was found to inhibit siRNA binding to RSSs, and to facilitate the recruitment and the degradation of RSSs into auto-lysosomes [48,55]. These data represent a unique example suggesting that Ca²⁺-mediated regulation of plant defence can occur through the interaction of a plant Ca²⁺ sensor with pathogen proteins. To date, searches for CaM/CML target proteins have mainly focused on the interaction of the Ca²⁺ sensors with plant proteins. However, current studies on the identification of plant proteins targeted by pathogen effectors might provide new findings on the ability of CaM and CMLs to interact with microbe proteins.

Other studies on CaM binding proteins have highlighted the role of CaM in the control of expression of defence-related genes. Mounting plant defence depends on massive changes in gene expression in order to favour defence responses over other cellular functions, and the coordination of this transcriptional reprogramming is conferred by

the concerted action of a variety of transcription factors (TFs) [56]. In plants, CaM binding TFs have been identified in diverse families of DNA binding proteins including plant-specific TF families [57]. Functional analyses of pathogen-induced TFs have revealed key roles of several CaM binding TFs in plant immunity [58]. Notably, the function of some CaM binding TFs was found to link Ca²⁺ signalling and salicylic acid (SA), a defence hormone required for both PTI and ETI [59]. Pathogen infection induces the production of SA by up-regulating the expression of two genes (*ICS1* and *EDS1*) involved in SA biosynthesis, and recent studies indicate that expression of *ICS1* and *EDS1* is positively or negatively controlled by CaM-binding TFs (Fig. 2). Knockout mutation in *CBP60g*, a plant-specific CaM binding TF, results in defects in pathogen-induced SA production and *ICS1* expression, and an enhanced susceptibility to the bacterial pathogen *Pst* [60]. Importantly, complementation of the *cbp60g* mutant background with a mutated *CBP60g* protein, impaired in CaM binding, does not restore SA production and defence, thus indicating a critical role of CaM in *CBP60g* function in the control of SA level and defence. Additional analysis indicates that *CBP60g* and *SARD1*, another member of the same TF family, are recruited to the promoter of *ICS1* gene after pathogen infection, suggesting a direct regulation of *ICS1* transcription by these TFs [61,62]. *EDS1* gene is another positive regulator of SA level, whose expression is negatively regulated by *CAMTA3* (also called *SR1*), a CaM binding transcription activator. Plants lacking a functional *CAMTA3* display an elevated level of SA, a high expression of *EDS1*, and constitutive defence responses [63]. As observed with *CBP60g*, complementation experiments have shown that CaM binding is required for the function of *CAMTA3* in the control of SA production and defence. *CAMTA3* was also shown to bind the promoter of *EDS1* to repress its expression. Collectively, this suggests that CaM binding TFs are key modulators of pathogen-induced SA production, which act by exerting opposing effects on the expression of SA biosynthesis genes. Thus, Ca²⁺/CaM-mediated signalling promotes the production of SA and SA-dependent defence, but also prevents an over-accumulation of the hormone, that could lead to deleterious effects in normal conditions. Other studies have revealed additional roles of *CAMTA3* in defence, such as the direct regulation of the expression of *NDR1*, a key component in ETI, and the regulation of genes involved in the metabolism of glucosinolates [64,65]. Glucosinolates are secondary metabolites acting as a chemical defence against herbivores, and their production induced by a herbivory attack, was also found to be regulated by *CML42* in *Arabidopsis* [66,67]. Other CaM binding TFs including several members of TGA, WRKY, MYB and NAC families have been reported to positively or negatively regulate plant defence responses, but the effects of CaM on

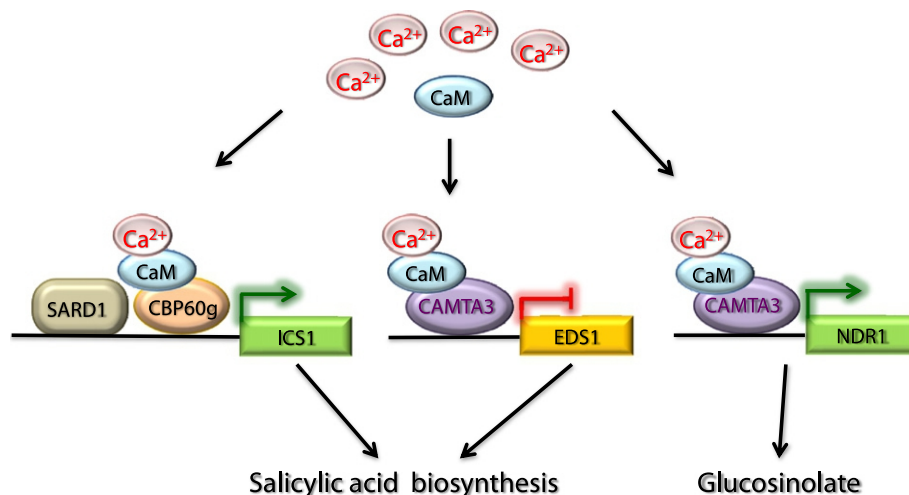


Fig. 2. Role of Ca²⁺ and CaM binding transcription factors in regulating the expression of *NDR1* and SA biosynthetic genes, *EDS1* and *ICS1*. Details are given in the text.

the function of these TFs are poorly understood [56,58]. Overall, the fact that CaM is involved in the modulation of positive and negative effectors of defence reveals a pivotal role of CaM in tuning immune responses.

4. Concluding remarks and future directions

Despite the fact that CaM has been a subject of research for many years, our understanding of CaM/CML-mediated signalling in plants is still far from complete. Over recent years, significant advances in the biological function of individual CaM isoforms and CMLs have been achieved by phenotyping knockout mutants. Given the diversity of CMLs in plants, it will be difficult to define the biological role of each CML, but gene expression analysis, sub-cellular localization of proteins and isolation of targets will provide valuable information to evaluate the distinct functions of CMLs and their contribution in conferring specificity in Ca²⁺ signalling. Only few of them have been studied for their biochemical properties; therefore, much remains to be done to demonstrate that CMLs function as true Ca²⁺ sensors by defining their respective Ca²⁺ binding properties. There is also a need to explore the biological functions of CaM/CML binding proteins and the relevance of protein complex between CaM/CML and their interacting partners in plant cells. Significant advances in Ca²⁺-mediated regulation of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels have been achieved by recent studies of several CaM/CML targets [45,46]. Given that different members of the CaM/CML family and other classes of Ca²⁺ sensors, like CPKs and CBLs, often function in the same physiological processes, the connections between these Ca²⁺ signalling systems need to be explored to decipher how they are coordinated. Moreover, Ca²⁺ signalling is also connected with other signalling pathways, and hubs where Ca²⁺ signalling and hormone-mediated pathways converge, are now emerging. Deciphering integration and crosstalks between the myriad of signalling systems involved in the regulation of plant physiology remains a challenge for forthcoming studies.

Acknowledgements

We thank Christian Mazars for the critical reading of the manuscript. Cecilia Cheval is the recipient of a fellowship from The French Ministry of National Education and Research. This work has been done in LRSV, part of the “Laboratoire d’Excellence” (LABEX) entitled TULIP (ANR -10- LABX-41). The authors acknowledge the CNRS and the Université de Toulouse (UPS) for funding their research.

References

- [1] A.N. Dodd, J. Kudla, D. Sanders, The language of calcium signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.* 61 (2010) 593–620.
- [2] M.R. McAinsh, J.K. Pittman, Shaping the calcium signature, *New Phytol.* 181 (2009) 275–294.
- [3] W. Ma, G.A. Berkowitz, Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades, *New Phytol.* 190 (2011) 566–572.
- [4] E. Michard, P.T. Lima, F. Borges, A.C. Silva, M.T. Portes, J.E. Carvalho, M. Gilliam, L.H. Liu, G. Obermeyer, J.A. Feijo, Glutamate receptor-like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine, *Science* 332 (2011) 434–437.
- [5] I. Pottosin, T. Wherrett, S. Shabala, SV channels dominate the vacuolar Ca²⁺ release during intracellular signaling, *FEBS Lett.* 583 (2009) 921–926.
- [6] J. Bose, I.I. Pottosin, S.S. Shabala, M.G. Palmgren, S. Shabala, Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants, *Front. Plant Sci.* 2 (2011) 85.
- [7] E.P. Spalding, J.F. Harper, The ins and outs of cellular Ca(2+) transport, *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (2011) 715–720.
- [8] J.L. Gifford, M.P. Walsh, H.J. Vogel, Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs, *Biochem. J.* 405 (2007) 199–221.
- [9] I.S. Day, V.S. Reddy, G. Shad Ali, A.S. Reddy, Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*, *Genome Biol.* 3 (2002), (RESEARCH0056).
- [10] T.A. Defalco, K.W. Bender, W.A. Snedden, Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling, *Biochem. J.* 425 (2010) 27–40.
- [11] A. Perochon, D. Aldon, J.P. Galaud, B. Ranty, Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling, *Biochimie* 93 (2011) 2048–2053.
- [12] D. Lecourieux, R. Ranjeva, A. Pugin, Calcium in plant defence-signalling pathways, *New Phytol.* 171 (2006) 249–269.
- [13] W. Ma, G.A. Berkowitz, The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 2571–2585.
- [14] M. Boudsocq, J. Sheen, CDPKs in immune and stress signaling, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 30–40.
- [15] G. Tena, M. Boudsocq, J. Sheen, Protein kinase signaling networks in plant innate immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (2011) 519–529.
- [16] S. Weinkl, J. Kudla, The CBL-CIPK Ca(2+)-decoding signaling network: function and perspectives, *New Phytol.* 184 (2009) 517–528.
- [17] J.D. Jones, J.L. Dangl, The plant immune system, *Nature* 444 (2006) 323–329.
- [18] C. Zipfel, S. Robatzek, Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: *vidi...?* *Plant Physiol.* 154 (2010) 551–554.
- [19] N.S. Coll, P. Epple, J.L. Dangl, Programmed cell death in the plant immune system, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 1247–1256.
- [20] M. Grant, I. Brown, S. Adams, M. Knight, A. Ainslie, J. Mansfield, The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death, *Plant J.* 23 (2000) 441–450.
- [21] S. Ranf, L. Eschen-Lippold, P. Pecher, J. Lee, D. Scheel, Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe-or damage-associated molecular patterns, *Plant J.* 68 (2011) 100–113.
- [22] H. Manzoor, A. Chiltz, S. Madani, P. Vatsa, B. Schoefs, A. Pugin, A. Garcia-Brugger, Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors, *Cell Calcium* 51 (2012) 434–444.
- [23] C. Mazars, S. Bourque, A. Mithofer, A. Pugin, R. Ranjeva, Calcium homeostasis in plant cell nuclei, *New Phytol.* 181 (2009) 261–274.
- [24] J. Kudla, O. Batistic, K. Hashimoto, Calcium signals: the lead currency of plant information processing, *Plant Cell* 22 (2010) 541–563.
- [25] S. Ranf, J. Grimmer, Y. Poschl, P. Pecher, D. Chinchilla, D. Scheel, J. Lee, Defense-related calcium signaling mutants uncovered via a quantitative high-throughput screen in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Plant* 5 (2012) 115–130.
- [26] A.K. Zelman, A. Dawe, C. Gehring, G.A. Berkowitz, Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels, *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 95.
- [27] C. Balague, B. Lin, C. Alcon, G. Flottes, S. Malmstrom, C. Kohler, G. Neuhaus, G. Pelletier, F. Gaymard, D. Roby, HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family, *Plant Cell* 15 (2003) 365–379.
- [28] S.J. Clough, K.A. Fengler, I.C. Yu, B. Lippok, R.K. Smith Jr., A.F. Bent, The *Arabidopsis* *dn1* “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9323–9328.
- [29] P. Vatsa, A. Chiltz, S. Bourque, D. Wendehenne, A. Garcia-Brugger, A. Pugin, Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production, *Biochimie* 93 (2011) 2095–2101.
- [30] F. Jammes, H.C. Hu, F. Villiers, R. Bouten, J.M. Kwak, Calcium-permeable channels in plant cells, *FEBS J.* 278 (2011) 4262–4276.
- [31] H. Sze, F. Liang, I. Hwang, A.C. Curran, J.F. Harper, Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 433–462.
- [32] Y. Boursiac, S.M. Lee, S. Romanowsky, R. Blank, C. Sladek, W.S. Chung, J.F. Harper, Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in *Arabidopsis* results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway, *Plant Physiol.* 154 (2010) 1158–1171.
- [33] N. Frei dit Frey, M. Mbengue, M. Kwaaitaal, L. Nitsch, D. Altenbach, H. Haweker, R. Lozano-Duran, M.F. Njo, T. Beeckman, B. Huettel, J.W. Borst, R. Panstruga, S. Robatzek, Plasma membrane calcium ATPases are important components of receptor-mediated signaling in plant immune responses and development, *Plant Physiol.* 159 (2012) 798–809.
- [34] Y. Boursiac, J.F. Harper, The origin and function of calmodulin regulated Ca²⁺ pumps in plants, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 409–414.
- [35] B. Kaplan, T. Sherman, H. Fromm, Cyclic nucleotide-gated channels in plants, *FEBS Lett.* 581 (2007) 2237–2246.
- [36] B.-G. Hua, R.W. Mercier, R.E. Zielinski, G.A. Berkowitz, Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel, *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 945–954.
- [37] M.C. Bonza, M.I. De Michelis, The plant Ca²⁺-ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions, *Plant Biol. (Stuttg)* 13 (2011) 421–430.
- [38] S. Giacometti, C.A. Marrano, M.C. Bonza, L. Luoni, M. Limonta, M.I. De Michelis, Phosphorylation of serine residues in the N-terminus modulates the activity of ACA8, a plasma membrane Ca²⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 1215–1224.
- [39] J.J. Benschop, S. Mohammed, M. O’Flaherty, A.J. Heck, M. Slijper, F.L. Menke, Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*, *Mol. Cell Proteomics* 6 (2007) 1198–1214.
- [40] M. Boudsocq, M.R. Willmann, M. McCormack, H. Lee, L. Shan, P. He, J. Bush, S.H. Cheng, J. Sheen, Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases, *Nature* 464 (2010) 418–422.
- [41] M. Coca, B. San Segundo, AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*, *Plant J.* 63 (2010) 526–540.
- [42] E. McCormack, J. Braam, Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*, *New Phytol.* 159 (2003) 585–598.
- [43] R. Takabatake, E. Karita, S. Seo, I. Mitsuhashi, K. Kuchitsu, Y. Ohashi, Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco, *Plant Cell Physiol.* 48 (2007) 414–423.
- [44] H.W. Choi, D.H. Lee, B.K. Hwang, The pepper calmodulin gene CaCaM1 is involved in reactive oxygen species and nitric oxide generation required for cell death and the defense response, *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 (2009) 1389–1400.

- [45] D. Chiasson, S.K. Ekegren, G.B. Martin, S.L. Dobney, W.A. Snedden, Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Plant Mol. Biol.* 58 (2005) 887–897.
- [46] W. Ma, A. Smigel, Y.C. Tsai, J. Braam, G.A. Berkowitz, Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein, *Plant Physiol.* 148 (2008) 818–828.
- [47] L.-J. Leba, C. Cheval, I. Ortiz-Martín, B. Ranty, C.R. Beuzón, J.-P. Galaud, D. Aldon, CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway, *Plant J.* 71 (2012) 976–989.
- [48] K.S. Nakahara, C. Masuta, S. Yamada, H. Shimura, Y. Kashiwara, T.S. Wada, A. Meguro, K. Goto, K. Tadamura, K. Sueda, T. Sekiguchi, J. Shao, N. Itchoda, T. Matsumura, M. Igarashi, K. Ito, R.W. Carthew, I. Uyeda, Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 10113–10118.
- [49] A. Perochon, S. Dieterle, C. Pouzet, D. Aldon, J.P. Galaud, B. Ranty, Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398 (2010) 747–751.
- [50] S.C. Popescu, G.V. Popescu, S. Bachan, Z. Zhang, M. Seay, M. Gerstein, M. Snyder, S.P. Dinesh-Kumar, Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4730–4735.
- [51] S.C. Popescu, M. Snyder, S. Dinesh-Kumar, *Arabidopsis* protein microarrays for the high-throughput identification of protein–protein interactions, *Plant Signal. Behav.* 2 (2007) 416–420.
- [52] Y.C. Tsai, Y. Koo, N.A. Delk, B. Gehl, J. Braam, Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in *Arabidopsis*, *Plant J.* 72 (2012) 325–335.
- [53] D. Hofius, T. Schultz-Larsen, J. Joensen, D.I. Tsitsigiannis, N.H. Petersen, O. Mattsson, L.B. Jorgensen, J.D. Jones, J. Mundy, M. Petersen, Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*, *Cell* 137 (2009) 773–783.
- [54] S. Mlotshwa, G.J. Pruss, V. Vance, Small RNAs in viral infection and host defense, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 375–382.
- [55] R. Anandalakshmi, R. Marathe, X. Ge, J.M. Herr Jr., C. Mau, A. Mallory, G. Pruss, L. Bowman, V.B. Vance, A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants, *Science* 290 (2000) 142–144.
- [56] J.W. Moore, G.J. Loake, S.H. Spoel, Transcription dynamics in plant immunity, *Plant Cell* 23 (2011) 2809–2820.
- [57] Y. Galon, A. Finkler, H. Fromm, Calcium-regulated transcription in plants, *Mol. Plant* 3 (2010) 653–669.
- [58] A.S. Reddy, G.S. Ali, H. Celesnik, I.S. Day, Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression, *Plant Cell* 23 (2011) 2010–2032.
- [59] R. Bari, J.D. Jones, Role of plant hormones in plant defence responses, *Plant Mol. Biol.* 69 (2009) 473–488.
- [60] L. Wang, K. Tsuda, M. Sato, J.D. Cohen, F. Katagiri, J. Glazebrook, *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000301.
- [61] L. Wang, K. Tsuda, W. Truman, M. Sato, V. Nguyen le, F. Katagiri, J. Glazebrook, CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling, *Plant J.* 67 (2011) 1029–1041.
- [62] Y. Zhang, S. Xu, P. Ding, D. Wang, Y.T. Cheng, J. He, M. Gao, F. Xu, Y. Li, Z. Zhu, X. Li, Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18220–18225.
- [63] L. Du, G.S. Ali, K.A. Simons, J. Hou, T. Yang, A.S. Reddy, B.W. Poovaiah, Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity, *Nature* 457 (2009) 1154–1158.
- [64] H. Nie, C. Zhao, G. Wu, Y. Wu, Y. Chen, D. Tang, SR1, a calmodulin-binding transcription factor, modulates plant defense and ethylene-induced senescence by directly regulating NDR1 and EIN3, *Plant Physiol.* 158 (2012) 1847–1859.
- [65] Y. Qiu, J. Xi, L. Du, J.C. Suttle, B.W. Poovaiah, Coupling calcium/calmodulin-mediated signaling and herbivore-induced plant response through calmodulin-binding transcription factor AtSR1/CAMTA3, *Plant Mol. Biol.* 79 (2012) 89–99.
- [66] A. Mithofer, W. Boland, Plant defense against herbivores: chemical aspects, *Annu. Rev. Plant Biol.* 63 (2012) 431–450.
- [67] J. Vadassery, M. Reichelt, B. Hause, J. Gershenzon, W. Boland, A. Mithofer, CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 159 (2012) 1159–1175.

En conclusion...

L'ensemble des exemples illustrés dans cet article montre que la CaM joue un rôle majeur dans la réponse aux pathogènes. Cependant, bien que des études décrivent de manière détaillée les processus cellulaires impliquant la CaM et ses partenaires, la compréhension du rôle des CMLs est loin d'être achevée puisque peu d'entre elles ont été caractérisées à ce jour. Les propriétés biochimiques de ces protéines et notamment leur aptitude à lier le Ca^{2+} et le rôle joué par cet ion dans l'activation des CMLs a été très peu étudié jusqu'à maintenant. L'identification de protéines cibles ainsi que l'étude du rôle des interactions entre CMLs et leurs différents partenaires commencent à révéler la nature des processus régulés par ces protéines. La recherche systématique de partenaires des CMLs à partir d'un *protein array* contenant 1133 protéines d'*Arabidopsis* a permis d'identifier 173 partenaires impliqués dans un grand nombre de processus biologiques (Popescu et al., 2007). Ces derniers sont localisés dans différents compartiments cellulaires (cytosol, membranes ou noyau) et certains sont bien décrits pour être des régulateurs positifs ou négatifs au cours des interactions plantes-pathogènes.

Notre équipe «**Signalisation calcique cytosolique et nucléaire chez les végétaux**» développe des activités de recherche qui portent un intérêt tout particulier à la caractérisation des éléments des voies de signalisation dépendantes du calcium dans le cadre des réponses des plantes à leur environnement biotique et abiotique. Ces recherches ont conduit à identifier, le gène *CML9* d'*Arabidopsis thaliana* induit en réponse à différents stimuli de nature abiotique et biotique (Magnan et al., 2008, Leba et al., 2012). En effet, l'analyse fonctionnelle de lignées perte et gain de fonction pour *CML9* et de lignées complémentées chez *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence que *CML9* est un régulateur du stress hydrique et de la réponse aux pathogènes (Magnan et al., 2008, Leba et al., 2012). Afin d'identifier les processus cellulaires modulés par *CML9*, ses partenaires ont été isolés par différentes stratégies (Perochon et al., 2010). Ces recherches ont contribué à l'identification de *PRR2* un facteur de transcription de type GARP qui a été retenu pour la suite des travaux (Perochon et al., 2010). Le **CHAPITRE III** présente plus en détail les travaux réalisés dans l'équipe ces dernières années sur la caractérisation de la fonction de *CML9* et l'identification de son partenaire *PRR2*.

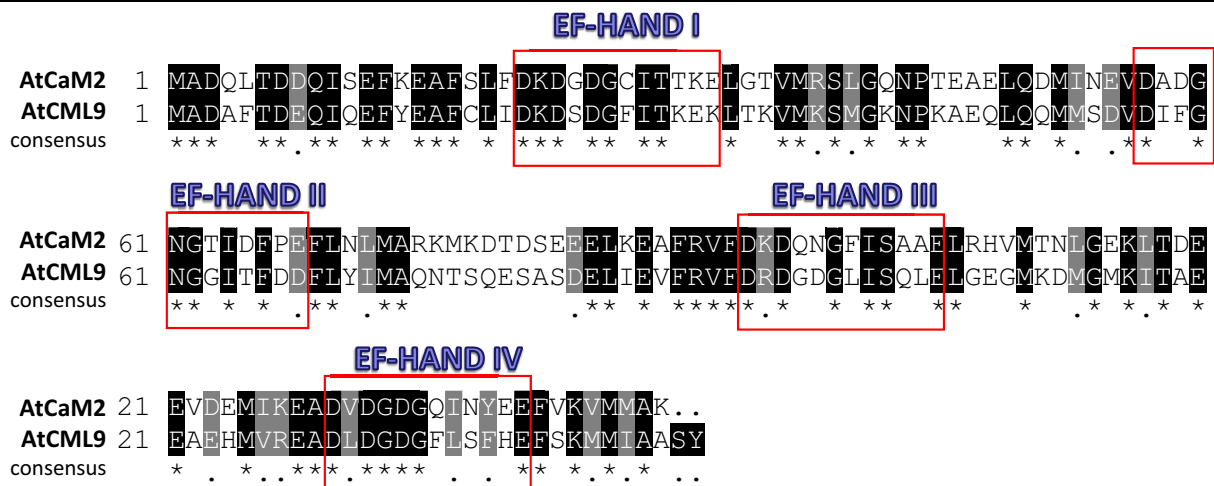


Figure I.II. 1: Alignement des séquences d'AtCML9 et de la forme typique de CaM, AtCaM2

AtCML9 présente 49% d'identité avec la forme typique de CaM et 70% de similarité. En noir sont représentés les acides aminés identiques, en gris les acides aminés de même nature. Les 4 motifs EF-Hands sont encadrés.

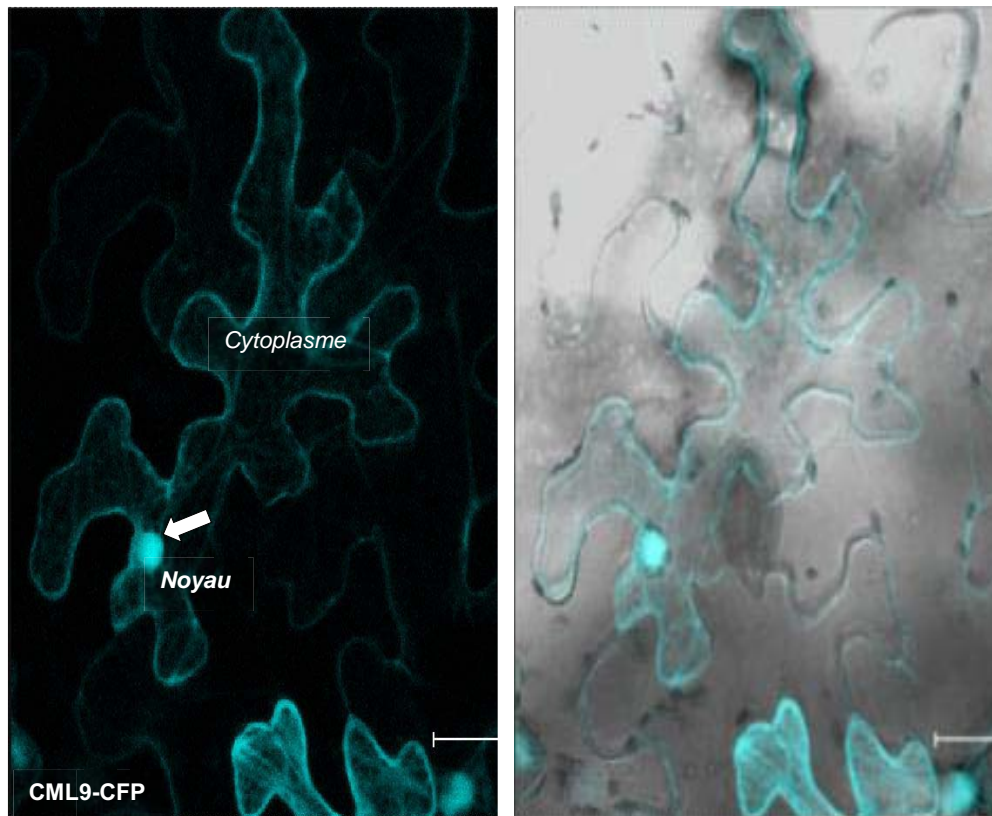


Figure I.II. 2: Localisation subcellulaire d'AtCML9 par expression transitoire dans des cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana*.

Images de microscopie confocale réalisées 48h après transformation des cellules épidermiques de tabac avec une construction portant CML9 en fusion avec la protéine fluorescente CFP. Les clichés de gauche illustrent l'acquisition de fluorescence de la CFP (465-505 nm). A droite est présentée la superposition de cette observation avec celle faite par Nomarski (ou contraste interférentiel différentiel). La flèche indique la présence du noyau.

CHAPITRE III: TRAVAUX ANTERIEURS ET OBJECTIFS DE THESE

1. CML9, une «Calmodulin-like protein» impliquée dans les réponses aux stress

1.1 CML9, une protéine apparentée à la calmoduline

CML9 code une CML de 151 acides aminés constituée de 4 motifs EF-Hand (figure I.III.1). Cette calmoduline partage seulement 49% d'identité avec les formes typiques de CaMs de par la présence de nombreuses substitutions sur toute la longueur de sa séquence protéique, notamment au niveau des motifs de liaison au Ca^{2+} .

Des données expérimentales sur la liaison des CMLs au Ca^{2+} indiquent que CML9 est capable de lier le Ca^{2+} (Köhler and Neuhaus, 2000). Ces expériences laissent toutefois entrevoir la possibilité que cette capacité de fixation au calcium puisse s'effectuer avec une affinité moindre que celle de la forme typique de CaM. En effet, des essais de mobilité électrophorétique de formes typiques de CaM et de CML9 montrent que 2mM de Ca^{2+} sont suffisants pour observer un retard de migration pour les CaMs typiques alors que 5mM sont nécessaires pour CML9 (Köhler and Neuhaus, 2000). Néanmoins, ces essais ne permettent pas de quantifier l'affinité de CML9 pour le Ca^{2+} et ne constituent qu'une preuve expérimentale préliminaire de l'interaction de CML9 pour le Ca^{2+} sans préjuger de l'efficacité/affinité des différentes boucles de liaison au Ca^{2+} dans cette interaction.

Concernant la localisation sub-cellulaire de CML9, aucun motif d'adressage à un compartiment cellulaire en particulier n'est identifié dans sa séquence protéique. Des fusions traductionnelles GFP-CML9 (ou des versions CFP en extrémités N et C-ter) sous le contrôle d'un promoteur *p35S* ont été exprimées dans des cellules de *N. benthamiana* par agroinfiltration et conduisant à une localisation nucléo-cytoplasmique des protéines de fusion (figure I.III.2, Perochon et al., 2010)

1.2 Implication de CML9 dans les réponses aux stress abiotiques

L'analyse de l'expression du gène *CML9* dans des plantules mises en culture *in vitro* met en évidence que ce gène est exprimé dans les cotylédons, l'hypocotyle, le collet et la coiffe racinaire. Dans des plantes adultes *CML9* est transcrit dans les tissus végétatifs et notamment dans les structures spécialisées comme les trichomes, les hydatodes, et les stomates. Une analyse transcriptomique réalisée sur des plantes d'*Arabidopsis* a permis de mettre en évidence que *CML9* est induit en réponse à une contrainte osmotique. Ces données ont motivé l'analyse de l'expression de *CML9* dans des plantes exposées à ce type de contraintes. Les données de Magnan (2008) indiquent que *CML9* est régulé dans différentes conditions de stress abiotiques comme l'exposition au froid, la salinité, la déshydratation et en réponse à l'ABA.

Ces résultats ont incité à l'étude du rôle de CML9 dans les réponses des plantes aux contraintes abiotiques par des approches génétiques. Les analyses fonctionnelles réalisées sur des lignées mutantes *KO* (*Knock-out*) *cml9* n'ont pas permis d'observer d'altération de processus de croissance ou de développement de ces lignées dans des conditions de culture standards. Cependant, des mutants *KO* pour *CML9* présentent une hypersensibilité à l'ABA, au stress salin et une meilleure tolérance à la déshydratation (Magnan et al., 2008).

Comme CML9 est une protéine de signalisation qui n'a pas d'activité biologique mais qui exerce une fonction régulatrice sur l'activité de partenaires cibles, la recherche des partenaires de CML9 s'avère être une étape essentielle à la compréhension de son rôle dans la physiologie de la plante. En vue d'identifier les processus cellulaires impliquant CML9, la recherche de ses partenaires a été effectuée dans l'équipe (Perochon et al., 2010).

2. PRR2, un partenaire nucléaire de CML9

2.1 Identification des protéines partenaires de CML9

Des analyses menées au laboratoire ont montré que des protéines capables d'interagir avec CML9 de façon Ca^{2+} -dépendante sont présentes dans des extraits protéiques totaux de plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Magnan et al., 2008). CML9 semble donc avoir, au moins *in vitro*, le comportement d'une calmoduline par son interaction avec des protéines cibles. Plusieurs auteurs avaient rapporté l'absence d'interaction de CML9 avec des peptides ou des protéines cibles connus pour interagir avec les CaMs typiques. En effet, CML9 n'est pas capable d'interagir avec le peptide synthétique *trp3* (Zielinski, 2002), avec CaMBP25, une protéine nucléaire impliquée dans les réponses des plantes aux stress (Perruc., 2004), avec CNGC2, un canal ionique (Köhler and Neuhaus, 2000) ou encore avec DWF1, une cytochrome P450 intervenant dans la biosynthèse des brassinostéroïdes (Du and Poovaiah, 2005).

Depuis, deux autres stratégies ont été utilisées pour la recherche des partenaires de CML9. Compte tenu de l'implication de CML9 dans la tolérance au stress salin, il semblait pertinent de rechercher les partenaires de cette CML dans ce contexte. Un premier criblage *in vitro* a été réalisé à partir d'une banque d'expression préparée avec des suspensions cellulaires soumises ou non à un stress osmotique produite chez *E. coli* et disponibles dans l'équipe. Peu de partenaires ont été isolés par cette approche, et parmi les partenaires validés, aucun n'est connu pour être impliqué au cours de stress osmotiques (Thèse Perochon, 2010). Etant donné que *CML9* est exprimé constitutivement au cours du développement, un deuxième criblage a été réalisé *in vivo* en double hybride chez la levure à partir d'une banque d'expression d'ADNc d'*A. thaliana*, préparée à partir de jeunes plantules au cours du développement (thèse Perochon, 2010). Ces approches ont permis d'identifier plusieurs enzymes et facteurs de transcription comme partenaires de CML9 dont certains sont capables d'interagir avec la CaM canonique ou d'autres CMLs (thèse Perochon, 2010).

La suite du travail s'est focalisée sur l'un des partenaires de CML9 validé par des approches *in vitro* et *in planta*. Il s'agit de PRR2, une protéine de fonction inconnue, associée au système à deux composantes qui appartient à la famille des facteurs de transcription de type GARP.

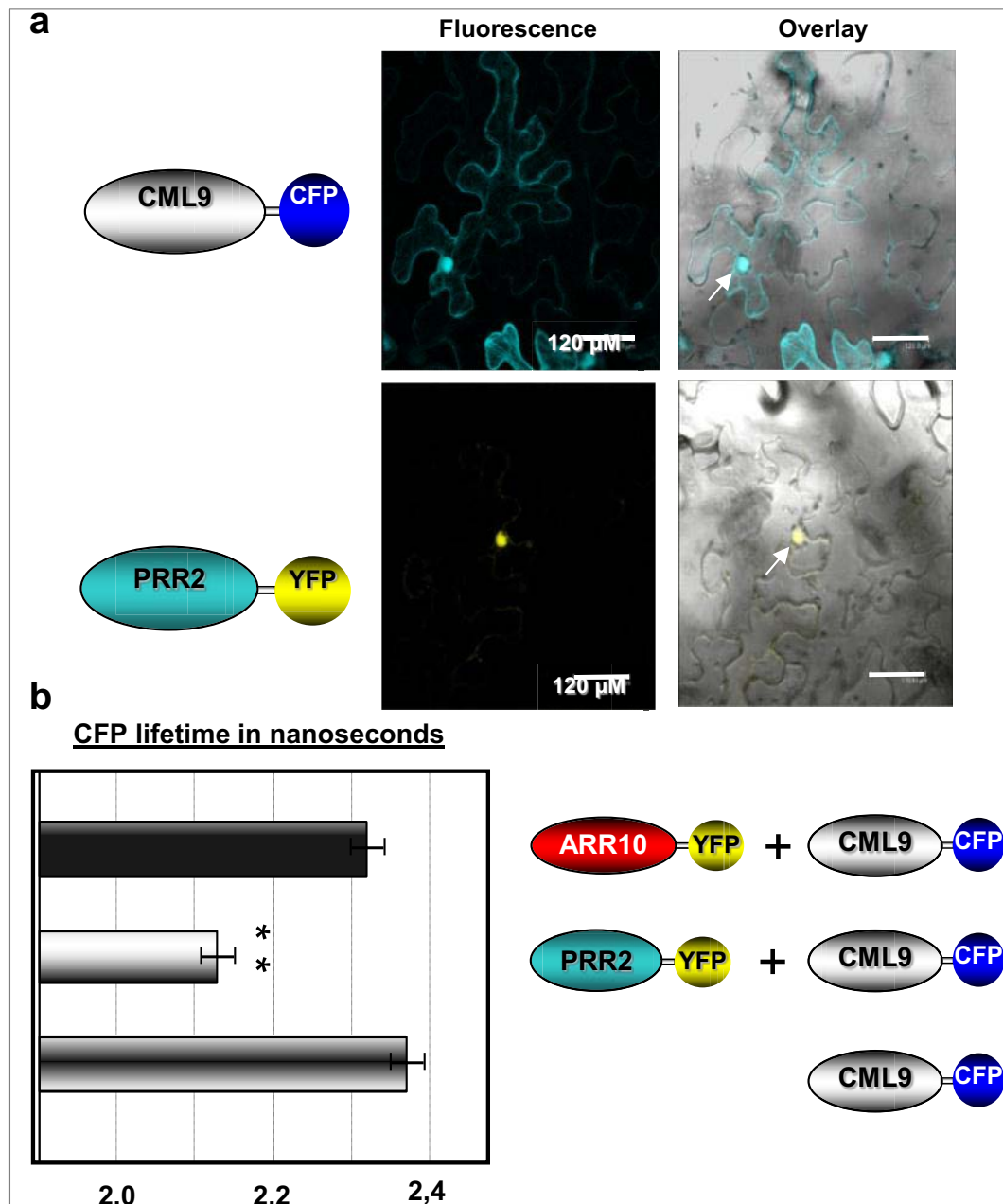


Figure I.II. 3: Localisation subcellulaire de PRR2 et interaction CML9/PRR2 in planta (Thèse Perochon, 2010)

a. Localisation subcellulaire de PRR2 par expression transitoire dans des cellules épidermiques de *N. benthamiana*

Images de microscopie confocale réalisées 48h après transformation des cellules épidermiques de tabac avec les constructions portant CML9, PRR2, ou ARR10 en fusion avec les protéines fluorescentes YFP ou CFP. Les clichés de gauche illustrent l'acquisition de fluorescence de l'YFP (525-600 nm) ou de la CFP (465-505 nm). A droite, est présentée la superposition de ces observations et de celles faites par Nomarski. Les flèches indiquent la présence des noyaux.

b. Mesure de l'interaction in planta entre PRR2 et CML9 par FRET/FLIM.

Histogramme représentant les valeurs moyennes de temps de vie de fluorescence (τ) de la CFP). Les valeurs moyennes présentées correspondent à la mesure d'au moins 60 objets (noyaux) répartis en trois répliques biologiques. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne. Toutes ces données ont été soumises à traitement statistique à l'aide du logiciel statgraphics, le seuil de significativité est indiqué au dessus des histogrammes (** $P < 0.01$).

2.2 PRR2, un partenaire nucléaire de CML9

Les travaux de Perochon (2010) se sont focalisés sur l'étude détaillée de l'interaction physique entre CML9 et PRR2. Des expériences réalisées à partir de noyaux de cellules épidermiques de *N. benthamiana* ont mis en évidence que PRR2 en fusion avec la YFP est localisé uniquement au niveau de compartiment nucléaire. De plus, des expériences de FRET-FLIM ont révélé que l'interaction entre CML9 et PRR2 a lieu dans le noyau des cellules de *N. benthamiana* (figure I.III.3).

L'analyse de la spécificité de cette interaction a démontré que PRR2 est capable d'interagir de manière différentielle avec d'autres CMLs et la CaM. En effet, en plus de CML9, PRR2 est aussi capable d'interagir avec d'autres CMLs du groupe 2 telle que CML8 et potentiellement CML11, mais ni avec CML10 ni avec la CaM. Enfin, il a été mis en évidence en double hybride chez la levure que cette interaction est spécifique et assez atypique puisqu'elle ne fait pas intervenir un motif peptidique en particulier dans l'interaction. En effet, des expériences d'interactions ont été réalisées en double hybride avec différentes formes tronquées de PRR2 et CML9 afin d'identifier si un motif en particulier est responsable de cette interaction. Ces travaux ne révèlent pas de séquence peptidique responsable de l'interaction, mais indiquent la nécessité d'avoir la forme pleine taille de PRR2, donc probablement une structure tridimensionnelle pour permettre l'interaction avec CML9 et CML8. Par ailleurs, d'autres études d'interactions réalisés *in vivo* n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre certains ARRs-type B et CML9.

PRR2 possède toutes les caractéristiques d'un facteur de transcription, cependant son mécanisme de régulation et sa fonction biologique sont encore méconnus. Ces travaux nous ont conduits à l'hypothèse que CML9 pourrait exercer un rôle régulateur sur l'activité de PRR2 en tant que facteur de transcription dans un contexte physiologique donné.

En résumé, l'ensemble de ces travaux indiquent que CML9, une CML d'*Arabidopsis* impliquée dans différentes réponses de stress interagit spécifiquement avec différents partenaires et partage également des interactions avec des protéines connues pour interagir avec la CaM typique. Parmi ses partenaires spécifiques, il a été identifié pour la première fois un régulateur de réponse atypique de fonction inconnue: PRR2.

Ces résultats soulèvent de nombreuses questions sur la contribution de CML9 et de PRR2 dans la physiologie de la plante:

- ❖ **Dans quel contexte physiologique (développement, stress abiotique ou biotique) les deux partenaires CML9 et PRR2 interviennent-ils?**
- ❖ **Quels sont les processus cellulaires contrôlés par CML9 et PRR2 dans un contexte physiologique donné?**

Mon projet de thèse décrit dans le paragraphe suivant a permis de répondre en partie à ces questions.

3. Objectifs du projet de thèse

Le rôle de CML9 et de PRR2 a été évalué dans les réponses de défense au cours de l'interaction entre la plante modèle *Arabidopsis* et l'agent pathogène *P. syringae*.

En effet, plusieurs données dans la littérature suggéraient un rôle potentiel de CML9 dans les réponses à différents agents pathogènes, dont *P. syringae*. Au cours de mon master et de ma première année de thèse, j'ai contribué dans un premier temps à **évaluer le rôle de CML9 dans la mise en place des réactions de défense à *P. syringae*** en collaboration avec un autre étudiant en thèse dans l'équipe Leba L.J.. Les travaux ont consisté en l'analyse fine du contrôle transcriptionnel du gène *CML9* et en l'étude du comportement de différents génotypes *CML9* (mutants alléliques, lignées surexpresses et complémentées) en réponse à *P. syringae* et à un traitement par des PAMPs de ce pathogène. Les résultats de cette première partie de mon travail ont fait l'objet d'une publication dans *Plant Journal* (2012) intitulée «***CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway***». Les résultats publiés feront l'objet du **CHAPITRE I** de la partie résultats.

Je me suis intéressée par la suite à la **caractérisation de la fonction biologique de PRR2** qui sera développée dans le **CHAPITRE II**. Au début de ma thèse, les informations disponibles dans la littérature étaient très peu informatives quant à la régulation transcriptionnelle de *PRR2* ou sa fonction biologique au cours du développement et en réponse au stress de l'environnement. J'ai donc commencé par **réaliser le profil d'expression détaillé du gène *PRR2*** (à partir de données *in silico* et de constructions promoteur de *PRR2::gène rapporteur*) au cours du développement et en réponse à différents stimuli biotiques (*P. syringae* et PAMPs).

Les résultats obtenus m'ont permis d'émettre l'hypothèse que PRR2 pourrait être impliqué dans les réponses à des agents pathogènes dont *P. syringae*. En conséquence, j'ai donc **évalué le comportement de différents génotypes PRR2** (mutants alléliques, lignées RNAi et surexpresses) **en réponse à *P. syringae*** (**CHAPITRE II**). Ces travaux m'ont permis de formuler l'hypothèse que PRR2 pourrait être responsable de changements majeurs de la régulation de l'expression des gènes en réponse à *Pst* DC3000. J'ai donc **évalué l'effet de PRR2 sur la régulation de l'expression génique** par une analyse transcriptomique globale en réponse à un stimulus simple, la flagelline et dans des conditions standards de croissance et de développement (**CHAPITRE II**).

Pathogènes	Points de cinétiques testés	Expériences
<i>P. syringae</i> DC3000	2h 6h 24h	NASCARRAYS-120
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	4h 8h 16h 24h 48h	NASCARRAYS-168
<i>P. syringae</i> HrcC ⁻	2h 6h 24h	NASCARRAYS-120
<i>Phytophthora parasitica</i>	2h 6h 24h	NASCARRAYS-120
<i>Phytophthora parasitica</i>	0.5h 2.5h 6h 10.5h	GEO-annotation Series GSE20226
<i>Echerichia coli</i> O157:H7	7h	GEO-annotation Series GSE5520

Eliciteurs	Points de cinétiques testés	Expériences
flg22	1h 3h	ArrayExpress-annotation E-NASC-76
LPS	1h 4h	GEO-annotation Series GSE5615
HrpZ	1h 4h	GEO-annotation Series GSE5615
elf18/26	0.5h 1h	ArrayExpress-annotation E-MEXP-547
OG	1h 3h	ArrayExpress-annotation E-NASC-76
GST-NPP1	1h 4h	GEO-annotation Series GSE5615
Chitine	0.5h	GEO-annotation Series GSE2538



Induction

Tableau I.1: Illustration de l'induction d'AtCML9 par différents stimuli.

Représentation schématique de l'expression du gène *AtCML9* chez *Arabidopsis thaliana* au cours de différentes expériences de transcriptome. L'induction du gène *AtCML9* au cours des temps testés, a été représentée par des boîtes de couleurs illustrant le niveau relatif d'induction du gène. Les données sont issues de puces Affymetrix 22K.

PARTIE II: RESULTATS

CHAPITRE I: CONTRIBUTION DE CML9 A L'IMMUNITE VEGETALE DANS UNE VOIE DE SIGNALISATION DEPENDANTE DE LA FLAGELLINE

Introduction: Contribution de CML9 dans les réponses aux pathogènes

De nombreux éléments dans la littérature ont conduit à étudier le rôle de CML9 dans les réponses à des agents pathogènes bactériens. Lorsqu'on s'intéresse aux données d'expression à haut débit générées par des approches de type microarray, on constate que le gène *CML9* est induit de manière significative en réponse à différents pathogènes bactériens ou fongiques et en réponse aux PAMPS ([Tableau I.1](#)). Les données issues de puces Affymetrix 22k indiquent que *CML9* est induit très fortement entre 2h et 6h après infection par l'oomycète *Phytophthora parasitica*. Des analyses transcriptomiques réalisées en réponse à un autre oomycète (*Golovinomyces orontii*) ont révélé que le gène *CML9* est presque 20 fois plus exprimé dans des tissus d'*Arabidopsis* infectés par rapport à des tissus sains (Chandran et al., 2010). Les données d'expression globales issues des puces Affymetrix montrent également une expression très forte mais plus tardive (entre 16h et 24h) de *CML9* en réponse à une souche particulièrement virulente de *P. syringae* pv. *maculicola*. Cette induction serait dépendante de la présence de certains effecteurs responsable du pouvoir pathogène de *P. syringae* puisque le gène *CML9* n'est pas induit voire même réprimé en réponse à d'autres souches moins virulentes (*Pst* DC3000) ou ayant perdu leur virulence (*P. syringae* hrcc-) entre 2h et 24h post-infection. Cependant, une analyse plus fine de l'expression de ce gène réalisée par de Torres (2003) a permis de mettre en évidence une induction transitoire du gène *CML9* entre 30min et 1h post-infection avec *Pst* DC3000 et en réponse à une souche avirulente de ce même pathogène. Ce profil d'expression précoce et transitoire est similaire à celui observé pour des gènes impliqués dans la mise en place des défenses basales. Lorsqu'on s'intéresse de plus près aux données d'analyse globale qui concerne la régulation de l'expression de *CML9* par des PAMPs, on note que ce gène est induit très fortement en réponse à un grand nombre de PAMPs bactériens (flg22, harpaine, EF-Tu) ainsi qu'en réponse à d'autres motifs structuraux de champignons (oligogalacturonides, chitine et GST-npp1, [Tableau I.1](#)). D'autres analyses transcriptomiques indiquent également que certains PAMPs modulent fortement l'expression de *CML9*. C'est le cas de la flg22 dont l'application exogène sur des plantes d'*Arabidopsis* stimule fortement et rapidement (30min) l'expression de ce gène. Cette

CHAPITRE I : Contribution de CML9 à l'immunité végétale

expression serait FLS2 dépendante dans la mesure où elle est abolie dans un mutant *fls2* insensible au traitement flg22 (Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2004). L'ensemble de ces données d'expression bien que partielles nous conforte dans l'idée que CML9 pourrait être impliqué dans les réponses de défense contre *P. syringae* et nous avons choisi dans un premier temps de réaliser une étude cinétique détaillée de l'expression de ce gène en réponse à différentes souches de *P. syringae* et en réponse aux PAMPs.

Il est désormais bien établi que l'homéostasie hormonale régule finement le devenir des interactions plantes micro-organismes. Le SA en particulier est un élément clé de la mise en place des réponses à *P. syringae*. Plusieurs travaux ont démontré que l'ABA vient moduler les réactions de défense en réponse à *P. syringae* et peut notamment exercer un rôle négatif sur la production de SA au cours de certaines étapes de l'infection (Pieterse et al., 2012). Or, les travaux de Magnan (2008), ont montré que CML9 est induit en réponse à une application exogène d'ABA. De plus des mutants *cm19* présentent des altérations physiologiques en réponse au stress abiotique qui impliqueraient des voies de signalisations ABA dépendantes. Au vue de l'importance de la régulation hormonale dans la réponse à *P. syringae*, nous avons recherché l'effet de ces métabolites sur la régulation du gène CML9 dans les bases de données telles qu'AtGenExpress (<http://www.arabidopsis.org>) et Efp Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Les résultats issus de ces analyses indiquent que CML9 est induit par les GAs, l'ABA, les brassinostéroïdes et réprimé par le MeJA. Nous avons choisi de générer, dans nos propres conditions expérimentales, des données d'expression précises en terme de cinétique en réponse à une application exogène de SA, MeJA et d'ABA afin de mieux comprendre comment la régulation de CML9 est modulée par ces composés majeurs de défense. Le contrôle transcriptionnel du gène CML9 au cours de l'infection par *P. syringae* et en réponse aux PAMPs et aux hormones a été présenté dans un article de ***The Plant Journal*, Volume 71, Issue 6, pages 976–989, September 2012, intitulé: «CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway».**

En plus de la régulation hormonale du gène CML9, cet article présente la contribution de CML9 dans les réponses à *P. syringae* et aux PAMPs évaluées par des approches génétiques. Les réponses des différentes lignées *cm19* (mutants alléliques, lignées complémentées et surexprimeurs) concernant la sensibilité aux pathogènes et l'analyse des différents marqueurs cellulaires et moléculaires de défense sont décrites dans ce manuscrit qui est présenté ci-après.

CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway

Louis-Jérôme Leba^{1,2,†}, Cécilia Cheval^{1,2,†}, Inmaculada Ortiz-Martín³, Benoit Ranty^{1,2}, Carmen R. Beuzón³, Jean-Philippe Galaud^{1,2} and Didier Aldon^{1,2,*}

¹Université de Toulouse, Université de Toulouse (UPS), UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France,

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5546, BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France, and

³Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga 29071, Spain

Received 7 December 2011; revised 2 May 2012; accepted 3 May 2012; published online 28 June 2012.

*For correspondence (e-mail aldon@lrsv.ups-tlse.fr).

†These authors contributed equally to this work.

SUMMARY

Many stimuli such as hormones and elicitors induce changes in intracellular calcium levels to integrate information and activate appropriate responses. The Ca²⁺ signals are perceived by various Ca²⁺ sensors, and calmodulin (CaM) is one of the best characterized in eukaryotes. Calmodulin-like (CML) proteins extend the Ca²⁺ toolkit in plants; they share sequence similarity with the ubiquitous and highly conserved CaM but their roles at physiological and molecular levels are largely unknown. Knowledge of the contribution of Ca²⁺ decoding proteins to plant immunity is emerging, and we report here data on *Arabidopsis thaliana* CML9, whose expression is rapidly induced by phytopathogenic bacteria, flagellin and salicylic acid. Using a reverse genetic approach, we present evidence that CML9 is involved in plant defence by modulating responses to bacterial strains of *Pseudomonas syringae*. Compared to wild-type plants, the later responses normally observed upon flagellin application are altered in knockout mutants and over-expressing transgenic lines. Collectively, using PAMP treatment and *P. syringae* strains, we have established that CML9 participates in plant innate immunity.

Keywords: calmodulin-like protein, flagellin, callose, *Pseudomonas syringae*, *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUCTION

Plants are sessile organisms that rely on complex multi-layered signalling pathways to cope with adverse environmental conditions or pathogenic micro-organisms. In this context, plants have developed effective defence mechanisms to detect and suppress the growth of invading pathogens (Zipfel and Felix, 2005; Bittel and Robatzek, 2007; Boller and Felix, 2009). The first level of defence responses is initiated by perception of extracellular conserved microbial features called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In bacteria, these PAMPs include molecules such as flagellin, lipopolysaccharides and the bacterial translation elongation factor EF-Tu (Boller and Felix, 2009). Plants have developed the ability to recognize PAMPs using specific plasma membrane-localized receptor-like kinases that initiate rapid changes such as calcium

transients, phosphorylation of target proteins, production of reactive oxygen species (ROS) and transcription of defence-related genes (Zipfel, 2009). FLS2 is a receptor that perceives a conserved 22 amino acid peptide (flg22) from bacterial flagellin and activates downstream events such as MAPK cascades and WRKY transcription factors in *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002; Gomez-Gomez and Boller, 2002). The flagellin treatment also triggers later defence responses such as deposition of callose at the cell wall and production and accumulation of antimicrobial components (Gomez-Gomez and Boller, 2000, 2002; Clay *et al.*, 2009). Perception of PAMPs induces a resistance response that restricts growth of the bacterial invader when the PAMP responses occur with sufficient speed and/or strength to prevent the bacterial pathogen from

becoming established (Zipfel *et al.*, 2004). However, some virulent pathogens have evolved strategies to interfere with host immune systems; for instance, Gram-negative bacterial pathogens are able to counteract this first layer of defence through the activity of specific effectors delivered inside the host cell through the type III secretion system (TTSS). In this case, multiplication of the bacteria in the host plant will lead to development of disease (Chisholm *et al.*, 2006).

When plant cells are challenged with microbes, elicitors or abiotic stimuli, specific patterns of intracellular Ca^{2+} variations, called signatures, are generated. These calcium variations are at the origin of signalling cascades that ultimately establish appropriate physiological responses (Lecourieux *et al.*, 2006). Several studies have demonstrated an essential role for Ca^{2+} during plant resistance to microbial pathogens (Lecourieux *et al.*, 2006). Using transgenic Arabidopsis plants expressing aequorin, Grant *et al.* (2000) showed that inoculation with virulent or avirulent strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) elicits different patterns of cytosolic Ca^{2+} increases. Similarly, various calcium signatures have been described in plant cell-elicitor systems (Lecourieux *et al.*, 2006), and purified elicitors or PAMPs such as flg22, elongation factor peptide or peptidoglycan have also been reported to induce Ca^{2+} signatures that may be associated with defence-related gene expression (Lecourieux *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2009; Ranf *et al.*, 2011).

Although it remains unclear how Ca^{2+} signatures are decoded, there is a growing body of evidence indicating that Ca^{2+} is a key messenger during plant immune response to pathogens (Defalco *et al.*, 2010). Ca^{2+} -binding proteins, such as Ca^{2+} -dependent protein kinases, or calcineurin B-like proteins or calmodulins (CaM), serve as sensors to detect and translate Ca^{2+} signals and activate specific downstream pathways (Defalco *et al.*, 2010). Biochemical and transcript expression studies of CaMs and functional analyses of CaM targets showed that various CaM target proteins such as AtSR1/CAMTA3, a calmodulin-binding transcription factor, and CBP60g contribute to plant immunity through modulation of salicylic acid levels (Galon *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Interestingly, plants have evolved a large repertoire of putative Ca^{2+} sensors, termed CMLs (calmodulin-like), that are closely related to CaM (McCormack and Braam, 2003; Ranty *et al.*, 2006). To date, only a few studies have examined the role of CMLs (Heo *et al.*, 1999; Chiasson *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Heterologous over-expression of two pathogen-induced soybean CML genes, *SCaM-4* and *SCaM-5*, in tobacco and Arabidopsis correlates with enhanced pathogen resistance (Heo *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004). Remarkably, there are 50 predicted CMLs in Arabidopsis, but most of these proteins remain unstudied (McCormack and Braam, 2003; Perochon *et al.*, 2011). Recently, certain Arabidopsis CMLs were functionally characterized and it was found that some are involved in plant stress

responses (Delk *et al.*, 2005; Magnan *et al.*, 2008) and/or are associated with defence-related processes (Chiasson *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2008). Genetic and functional studies of plant CMLs are thus essential to understand how Ca^{2+} signals are decoded during host-pathogen interactions. Previous work by de Torres *et al.* (2003) showed that *CML9*, an *A. thaliana* gene encoding a calmodulin-like protein, is induced early upon *P. syringae* inoculation. *CML9* is a 151 amino acid protein that shares 46% amino acid sequence identity with a typical CaM bearing four predicted Ca^{2+} -binding sites. This CML was reported to bind Ca^{2+} (Kohler and Neuhaus, 2000) and to fulfil, under certain conditions, the role of CaM by complementation of a yeast *CaM* null mutant (Zielinski, 2002), suggesting that *CML9* may act as a Ca^{2+} sensor. In a previous study, we showed that *CML9* acts as a negative regulator in abiotic stress such as water deficit (Magnan *et al.*, 2008), and here we report that the *CML9* gene is also responsive to *P. syringae* and to exogenous PAMP application. Using a loss- and gain-of-function strategy, we show that *CML9* contributes to plant immunity in response to phytopathogenic bacteria through a flagellin-dependent pathway.

RESULTS

CML9 gene expression is responsive to the phytopathogenic bacteria *P. syringae* (*Pto* DC3000) through PAMP- and SA-associated signalling pathways

To determine *CML9* gene expression in response to phytopathogenic bacteria, *A. thaliana* (Col) plants were inoculated with the virulent *P. syringae* pv. *tomato* (*Pto*) strain DC3000. *CML9* transcript levels were then analysed using quantitative RT-PCR. *Pto* foliar infiltration resulted in a moderate (twofold) but significant up-regulation of *CML9*. This induction was transient as gene expression returned to resting levels by 1–3 h post-inoculation (Figure 1a).

It is well established that phytohormones such as ethylene, salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) contribute to the coordination of plant defence reactions (Pieterse *et al.*, 2009). To obtain information about *CML9* gene regulation by these compounds, the *CML9* gene expression level was analysed in wild-type (WT) plants (Col), as well as in mutants altered in the production of SA (*sid1* and *sid2*), JA signalling (*jar1*) and ethylene perception (*ein2*) following inoculation with *Pto* DC3000. The contribution of two PAMP receptors (FLS2 and EFR), involved in perception of flagellin and the elongation factor EF-Tu, respectively, were also evaluated with regard to the regulation of *CML9* using their respective mutants (Figure 1b). As indicated in Figure 1(a), inoculation by the virulent bacterium induced a peak of *CML9* gene expression after 30 min. This level of induction was not modified in *ein2*, *jar1* and *efr* mutants, indicating that the induction of *CML9* in response to *Pto* is independent of signalling pathways involving ethylene, JA or the functional

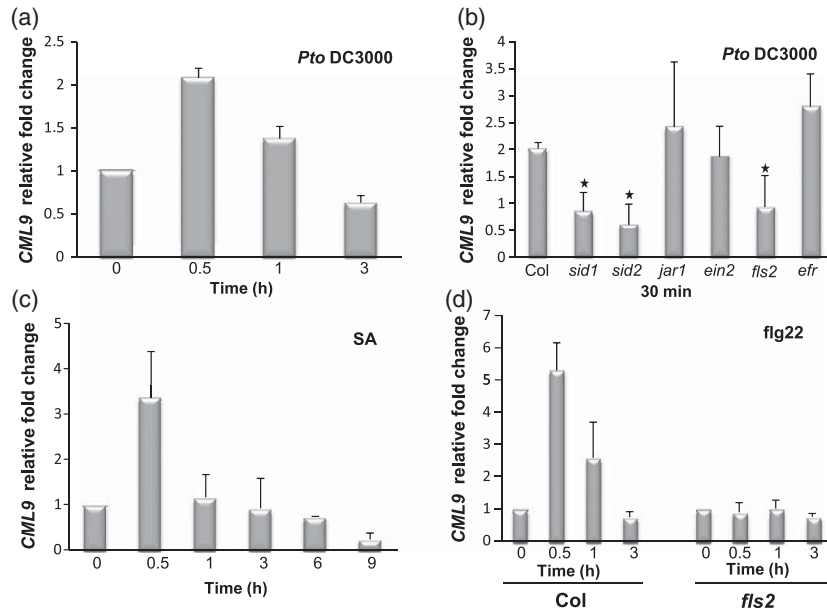


Figure 1. Expression profiles of the *CML9* gene in response to pathogen inoculation, PAMP and hormonal treatments.

(a) Leaves of 4-week-old Col plants were inoculated with *Pto* DC3000 at 10^7 cfu mL⁻¹. Samples were collected at 0, 0.5, 1 and 3 h post-inoculation, and *CML9* gene expression was analysed by quantitative RT-PCR.

(b) *CML9* expression was monitored upon *Pto* DC3000 inoculation in mutants defective in SA production (*sid1* and *sid2*) or JA (*jar1*) and ethylene (*ein2*) signalling pathways, and also mutants altered in flagellin (*fls2*) or EF-Tu (*efr*) perception. Asterisks indicate significant changes of *CML9* gene expression in these different genetic backgrounds compared with Col (ANOVA, *P* value <0.05).

(c) Kinetics of *CML9* expression in response to exogenous application of SA (100 μ M). Two-week-old seedlings (Col) cultivated on MS medium were sprayed with SA or water and harvested at the indicated times.

The results illustrated in (a–c) are expressed as fold change relative to mock treatment. Data illustrate the average of three independent experiments with standard deviation.

(d) Kinetics of *CML9* gene expression in WT (Col) and the *fls2* mutant in response to exogenous application of flg22. *In vitro* cultivated seedlings (10 days old) were elicited using 1 μ M of flg22 and harvested at 0, 0.5, 1 and 3 h. The results are fold changes relative to mock treatment (water-treated seedlings), and the values are means \pm SD for four independent experiments.

receptor EFR. In contrast, data showed that alteration of SA production in *sid* mutants, as well as the abolition of flagellin perception, led to significant reduction or elimination of the induction of *CML9* (Figure 1b). Because expression of the *CML9* gene is modulated in an SA-dependent manner during the *A. thaliana*–*Pto* interaction, the effect of exogenous application of SA (100 μ M) on *CML9* expression was quantified using *in vitro* cultivated plantlets (20 days old) (Figure 1c). As a control, we confirmed that application of SA led to strong expression of the *PR1* gene (45-fold) 9 h post-treatment but mock treatment caused no change (Figure S1a). The *CML9* gene exhibited early induction of expression 30 min to 1 h after the treatment (up to threefold induction) (Figure 1c). These data indicate that up-regulation of *CML9* may be exerted by SA, which is already known to play a key role in plant defence responses against *P. syringae*.

The results reported in Figure 1(b), as well as the information already available (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004), suggest an important contribution of the FLS2-dependent signalling pathway in control of *CML9* expression. Accurate analysis of this regulation was performed by

exogenous application of the flg22 peptide to *A. thaliana* growing *in vitro* (Figure 1d). *CML9* was rapidly (30 min) and strongly induced (fivefold induction) after the flg22 treatment, and this induction was transient because the level of expression returned to its initial state after 3 h. *CML9* gene expression was not induced by the flg22 peptide in the *fls2* mutant, indicating that flg22-mediated *CML9* induction requires FLS2 (Figure 1d).

The early and transient induction of *CML9* gene expression in response to *Pseudomonas*, SA and flg22 suggests that *CML9* is associated with plant defence.

Physiological relevance of *CML9* in the *A. thaliana*–*P. syringae* interaction

To evaluate whether *CML9* contributes to plant defences, a reverse genetic approach using two T-DNA insertional mutants, *cm19-1* (Col-8 background) and *cm19-2* (Ws4 background), was developed. These mutants were previously characterized, and the insertions were shown to result in lack of full-length *CML9* transcripts (Magnan *et al.*, 2008). In this study, transgenic Arabidopsis plants (Col) that express the coding sequence of *CML9* under the control of the 35S

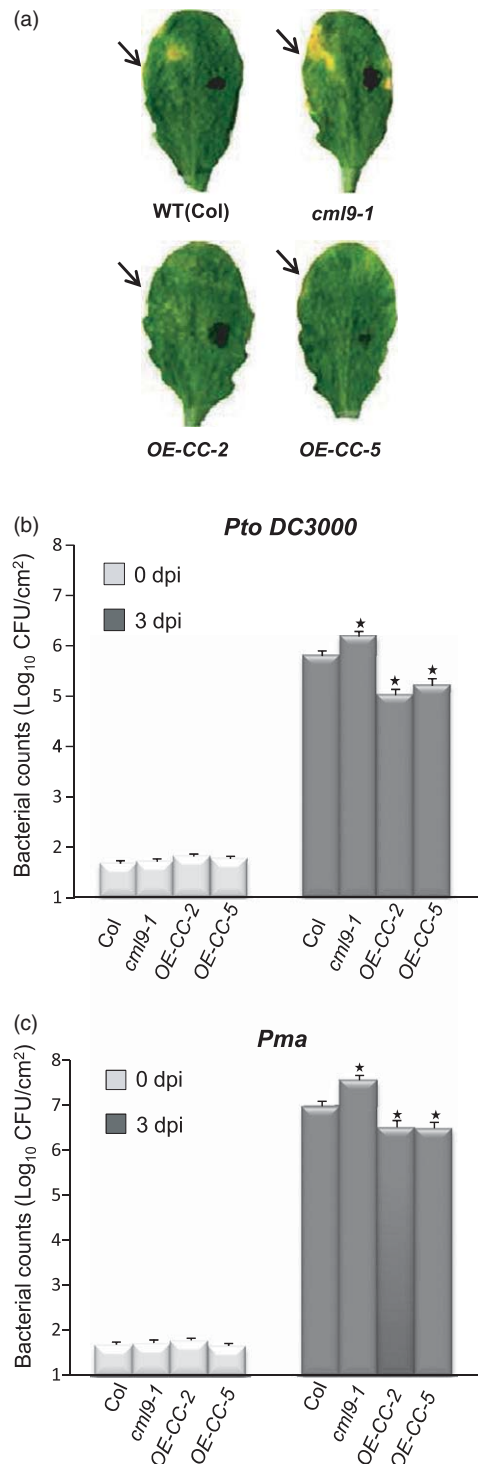
promoter (*p35S::cdsAtCML9*) were generated. Two independent lines (*OE-CC-2* and *OE-CC-5*) harbouring constitutive and stronger expression of the transgene compared to the WT under control conditions were selected (Figure S2). Under standard culture conditions, neither mutation of *CML9*, as reported by Magnan *et al.* (2008), nor over-expression of *CML9* had a significant impact on plant growth and morphology (Figure S2).

The behaviour of the *cml9* genotypes [knockout mutant lines (*cml9-1* and *cml9-2*) and over-expressors of *AtCML9* (*OE-CC-2* and *OE-CC-5*)] was compared to WT ecotypes Col-8 and Ws4 when inoculated with virulent strains of either *Pto* (DC3000) or *P. syringae* pv. *maculicola* (*Pma*). Leaves of 4-week-old Arabidopsis plants were hand-infiltrated with bacterial inoculum (2×10^5 cfu mL⁻¹). The *cml9* genotypes exhibited a different response to *Pto* DC3000 as chlorosis and water-soaked patches associated with disease development were more pronounced after 5 days in *cml9-1* than in WT, and appeared delayed in transgenic lines *OE-CC-2* and *OE-CC-5* over-expressing *CML9* at 7 days post-inoculation (dpi) (Figure 2a). Experiments performed with the Ws4 ecotype showed similar results, with a greater sensitivity to *Pto* DC3000 in *cml9-2* compared to WT (Figure S3a). Quantification of *in planta* bacterial growth in inoculated leaves indicated that no difference between the genotypes was observed just after infiltration (Figure 2b, 0 dpi). The *cml9-1* mutant plants displayed an approximately 2.5-fold increase in bacterial titre compared to Col-infected plants at 3 dpi (Figure 2b). The second allelic mutant line (*cml9-2*) also exhibited a significant increase of *in planta* bacterial growth at 3 dpi compared to WT (Figure S3b). In contrast, a statistically relevant decrease in bacterial growth was observed in the over-expressing lines (Figure 2b). Using the crucifer pathogen strain, *P. syringae* pv. *maculicola*, similar results were obtained (Figure 2c). Enhanced susceptibility was observed in the *cml9-1* knockout mutant compared to WT, and increased resistance was observed in *OE-CC-2* and *OE-CC-5* lines (Figure 2c). Collectively, these data indicate that modulation of *CML9* gene expression (i.e. knockout and over-expressing lines) provokes changes in susceptibility.

Figure 2. Altered susceptibility to *P. syringae* in *cml9* mutants and transgenic lines over-expressing the *CML9* gene.

(a) Disease symptoms in Arabidopsis leaves (WT, *cml9-1* and *CML9* over-expressing lines) caused by *Pto* DC3000 infection. Leaves of 4-week-old plants were syringe-infiltrated with 2×10^5 cfu mL⁻¹ *Pto* DC3000, and photographs were taken 7 days post-inoculation. Arrows indicate the half of the leaf that was inoculated.

(b, c) Quantifications of *in planta* bacterial growth were performed at 0 or 3 dpi using *Pto* DC3000 (b) or *P. syringae* pv. *maculicola* (*Pma*) (c). In these experiments, leaves were syringe-infiltrated with 10^5 cfu mL⁻¹ *Pto* DC3000 or *Pma*. Data are representative of five replicates of three independent experiments. *P* values were calculated using the two-tailed Mann–Whitney *U* test to indicate significant differences between the genotypes. Asterisks indicate significant differences compared to Col at *P* < 0.05. Error bars represent SEM.



Expression of defence-associated marker genes in *cml9* genotypes following *P. syringae* infection

Expression analyses of various well-known defence-associated genes were performed in leaves of Col, *cml9* mutant and over-expressing plants at various time points before and after inoculation with *Pto* DC3000. The expression of two

defence-associated marker genes *PR1* and *ICS1* is illustrated in Figure 3(a,b). The results obtained indicate that the *PR1* gene expression level is altered in the over-expressing lines, with significant up-regulation 24 h post-inoculation compared to WT (Figures 3a and S4a). Expression of *ICS1*, encoding an isochorismate synthase involved in SA biosynthesis, was also analysed (Figure 3b). The results showed no significant differences between WT and other genotypes. The work presented here suggests that CML9 is connected with PAMP-triggered immunity (PTI). Moreover, as expression of *PR1*, a marker gene of the SA pathway, is altered in *cm19* genotypes, and because it was established that SA acts as a positive regulator of PTI (Tsuda *et al.*, 2008), we determined whether SA production is modified in *cm19* genotypes. Quantification of the biologically active form of SA was performed by UPLC/ESI Q-TOF in WT, *cm19-1* and *OE-CC-5* genotypes following *Pto* inoculation. As already reported (de Torres Zabala *et al.*, 2009), a significant increase in SA content was observed 24 h post-inoculation, but no difference was observed among the genotypes (Figure 3c). These data suggest that, if CML9 contributes to the SA pathway, it participates in SA signalling rather than SA production.

CML9 acts as a positive regulator of plant defence when bacterial effectors counteract PAMP-triggered immunity

For a better understanding of the contribution of CML9 to plant immunity and the signalling processes associated with CML9, different derivative strains of *P. syringae* were used. Plants were first inoculated with the *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ strain, a mutant deficient in the type III secretion system (TTSS) that is necessary for effector delivery into host cells (Figure 4a) (Yuan and He, 1996). Compared to the virulent *Pto* DC3000, the *hrcC*⁻ strain is unable to counteract the first level of plant defence triggered by perception of PAMPs. The behaviour of *cm19-1* and over-expressing lines was analysed following foliar inoculation with the *hrcC*⁻ strain, and, as expected, limited bacterial growth was observed in WT plants (Figures 4a and S3B) (Yuan and He, 1996) compared to the fully virulent bacteria (see Figure 2b). No significant differences were detected between WT and the knockout mutant lines *cm19-1* and *cm19-2* (Figures 4a and S3B). In contrast, the over-expressing lines *OE-CC-2* and *OE-CC-5* exhibit a significantly higher sensitivity to strain *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ than the WT (Figure 4a).

Because the *Pto hrcC*⁻ strain does not efficiently suppress the basal level of defence in Arabidopsis, we evaluated the contribution of CML9 to callose deposition and *PR1* gene expression, two markers of PTI, with *Pto* DC3000 or *Pto hrcC*⁻. Mock treatment did not induce significant changes in callose deposition on the leaves of the genotypes tested (Figure 4b). As expected, callose deposition is enhanced in WT plants inoculated with *Pto hrcC*⁻ but not with *Pto* (Figure 4b). No significant differences between the number

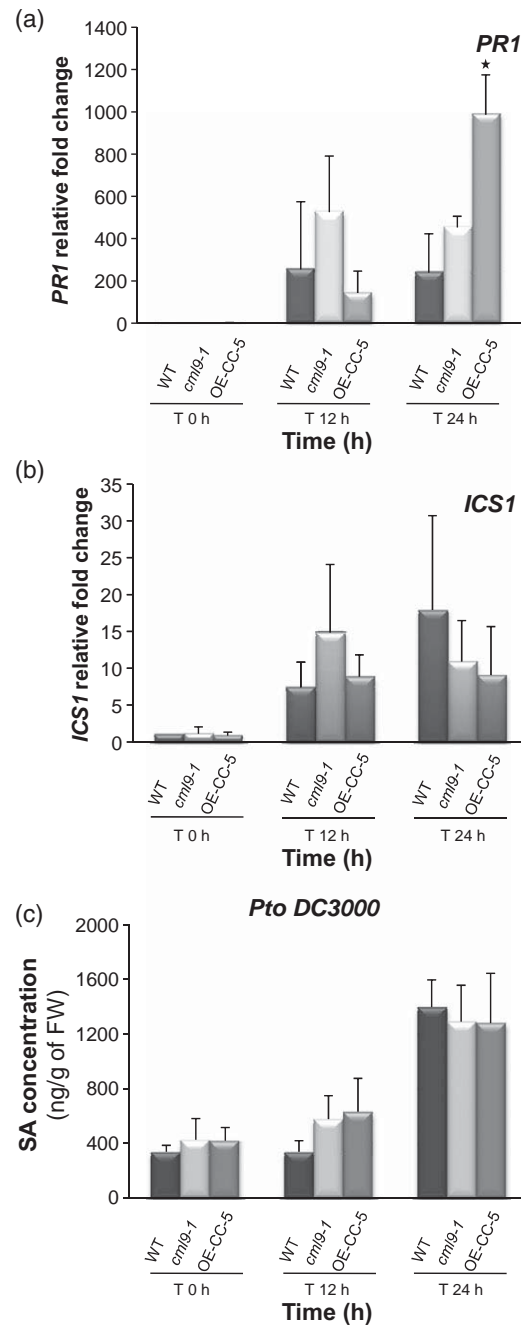
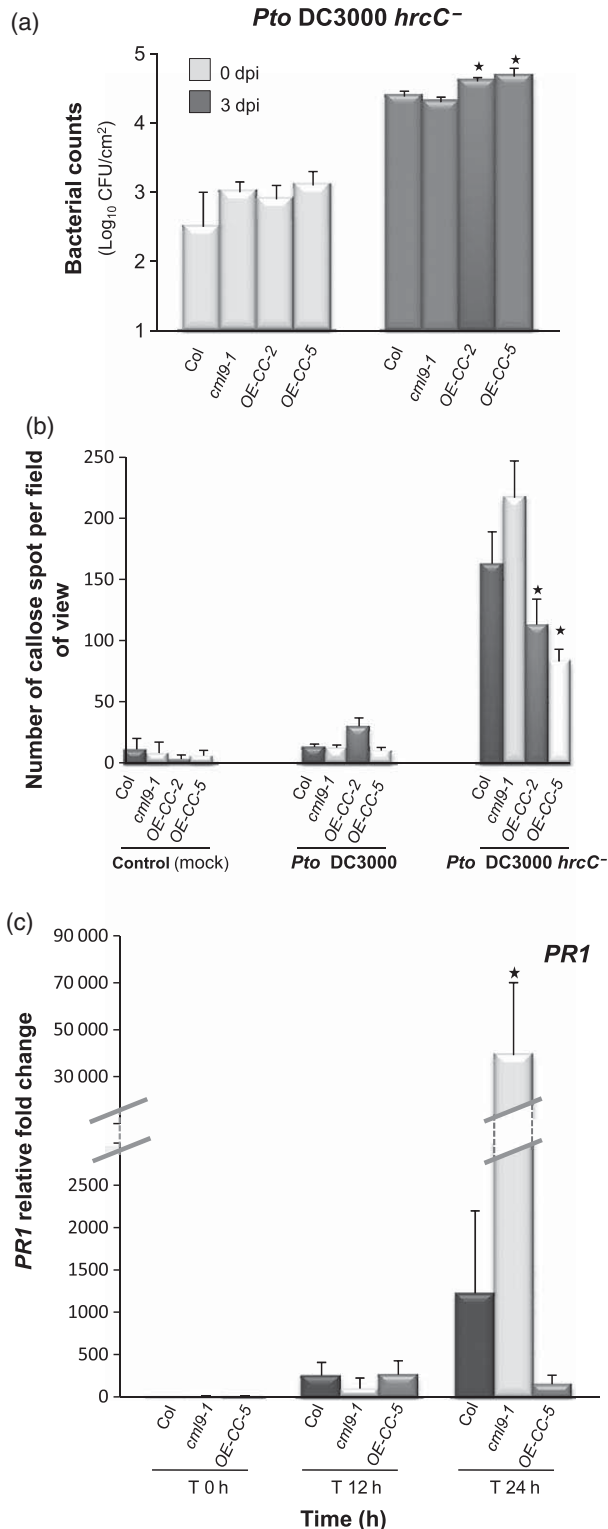


Figure 3. Expression analysis of defence marker genes and SA quantification in *cm19* genotypes upon *P. syringae* inoculation.

(a, b) Analyses of *PR1* (a) and *ICS1* (b) marker genes in various genetic backgrounds. Leaves of WT (Col), the knockout mutant *cm19-1*, and *OE-CC-5* were syringe-infiltrated with 2×10^5 cfu mL⁻¹ *Pto* DC3000 and harvested at 0, 12 and 24 h post-inoculation. The fold changes relative to the mock treatment were determined by real-time PCR. The values are means \pm SD of four independent experiments. The asterisk indicates a significant differences compared to Col at $P < 0.05$.

(c) Quantification of SA levels in leaves of 4-week-old plants of *A. thaliana* under control conditions or after inoculation with *Pto*. Leaves were syringe-infiltrated with 10^7 cfu mL⁻¹ *Pto* DC3000, and SA quantifications were performed 12 and 24 h post-inoculation. Data were obtained in three independent experiments, each with three technical replicates, and analysed by ANOVA.



of papillae were found following either mock or *Pto* DC3000 treatments in WT or the mutant *cml9-1* (Figure 4b). In contrast, in response to the *hrcC*⁻ strain, the *OE-CC-2* and *OE-CC-5* lines displayed a significant reduction in callose accumulation (30–50%) (Figure 4b).

Figure 4. The *cml9-1* mutant and the transgenic lines over-expressing the *CML9* gene exhibit altered responses to a disarmed strain of *P. syringae*.

(a) Quantifications of *in planta* bacterial growth in the Arabidopsis genotypes were performed at 0 or 3 dpi using 10^6 cfu mL⁻¹ of a strain of *Pto* DC3000 altered in the TTSS (*hrcC*⁻). Data are representative of five replicates of three independent experiments. *P* values were calculated using the two-tailed Mann–Whitney *U* test to indicate significant differences between the genotypes. Asterisks indicate significant differences compared to Col at *P* < 0.05. Error bars represent SEM.

(b) Quantitative analyses of callose deposition on WT leaves (Col) and *cml9* genotypes using aniline blue staining after *Pto* DC3000 (10^7 cfu mL⁻¹), *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ (10^7 cfu mL⁻¹) or water infiltration (control). Numbers of callose papillae were quantified on inoculated leaves of 4-week-old Arabidopsis plants. Values are the mean number of callose spots per image ± SEM. Three independent assays were performed using three leaves harvested from different plants for each genotype. Asterisks indicate significant differences compared to Col at *P* < 0.05 (two-tailed Mann–Whitney *U* test).

(c) Analyses of *PR1* gene expression in leaves of WT (Col), the knockout mutant *cml9-1*, and *OE-CC-5* syringe-infiltrated with 10^7 cfu mL⁻¹ *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ and harvested at 0, 12 and 24 h post-inoculation. The fold changes relative to the mock treatment were determined by real-time PCR. Values are means ± SD of four independent experiments. The asterisk indicates a significant difference compared to Col at *P* < 0.05 (ANOVA).

The expression pattern of the defence-associated marker gene *PR1* indicates that the *PR1* gene is induced in the *cml9-1* genotype, with significant up-regulation 24 h post-inoculation in comparison to WT or over-expressing lines (Figures 4c and S4b). These data clearly indicate an opposite regulation of *PR1* gene expression in *cml9* genotypes (knockout versus over-expressing lines) when inoculated with virulent *Pto* DC3000 or a ‘disarmed’ strain (TTSS-deficient).

Collectively, these results indicate that responses observed with *Pto* DC3000 are TTSS-dependent and therefore may involve the activity of bacterial effectors in plant cells. Thus, CML9 restricts susceptibility to virulent *Pto* DC3000, but has a less discernible effect on resistance to *Pto* DC3000 mutants that cannot deliver effectors.

For further analysis, we used *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (*Pph*), a phytopathogenic bacterium of bean (*Phaseolus vulgaris*) that is unable to efficiently suppress defence reactions in *A. thaliana* (Arnold *et al.*, 2011). Using a QTL approach, Forsyth *et al.* (2010) established that the major determinant of non-host resistance to *Pph* in *A. thaliana* is FLS2. Therefore, the pathosystem *A. thaliana*–*Pph* is considered a classical model to study FLS2-mediated defences and PTI. We examined the behaviour of *cml9* genotypes upon inoculation with the *Pph* 1448a WT strain. Significantly enhanced bacterial growth was observed in the over-expressing transgenic lines compared to WT (Figures 5a and S3C). This is consistent with the behaviour of over-expressing transgenic lines observed with the *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ strain because *Pph* is unable to efficiently suppress the basal defence established by the Arabidopsis plants. As non-host resistance against *Pph* is mainly dependent on flagellin perception, we tested whether the behaviour of *cml9* is determined by activation of the flagellin signalling pathway

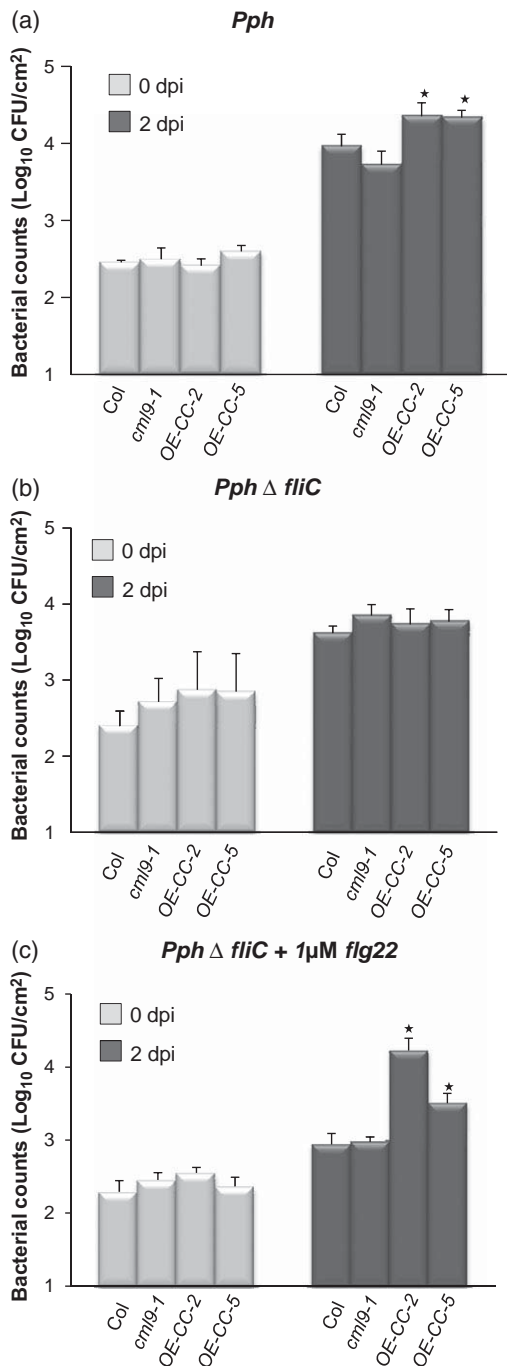


Figure 5. The *cml9* susceptibility to *P. syringae* pv. *phaseolicola* is related to the flagellin pathway.

(a, b) Leaves of 4-week-old plants of the various Arabidopsis genotypes were syringe-infiltrated with 5×10^6 cfu mL⁻¹ of the non-host strain of *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) (a) or a strain in which the *fliC* gene, which encodes a flagellin subunit, has been deleted (*Pph* Δ*fliC*) (b).

(c) Experiment performed as in (b) but the leaves were co-infiltrated with *Pph* Δ*fliC* (5×10^6 cfu mL⁻¹) and the flg22 peptide (1 μM).

Three independent biological repeats were performed with similar results, and *in planta* bacterial growth were quantified on five plants of each genotype. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney *U* test. Asterisks indicate significant differences compared to Col at *P* < 0.05. Error bars represent SEM.

by using a *Pph* strain harbouring a *fliC* mutation (*Pph* Δ*fliC*). When the *Pph* Δ*fliC* strain was inoculated into WT and *cml9* knockout or over-expressing genotypes, the increase in bacterial growth displayed by the *Pph* 1448a strain in the expressing transgenic lines was no longer observed (Figures 5b and S3C). To check that the flagellin pathway was responsible for these phenotypes, we co-inoculated the flg22 peptide and the *Pph* Δ*fliC* strain. Under these conditions, the phenotype is reverted (Figure 5c), indicating that the increase in *Pph* growth detected in the over-expressing lines depends on the flagellin signalling pathway.

***cml9* transgenic plants exhibit altered cellular and molecular responses to flagellin application**

Finally, to confirm the function of CML9 in a flagellin-dependent signalling pathway, we used several assays to evaluate both early and late physiological phenotypes associated with PAMP-induced events (Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Zeng and He, 2010). PAMP-induced production of extracellular ROS was first evaluated. As expected, treatment of WT (Col) by flg22 produces a transient increase in ROS that is not observed in the *fls2* mutant (Figure S5). Tissues of *cml9* and over-expressing lines produce similar levels of ROS as the WT. This indicates that flg22-induced ROS production was not altered in knockout or over-expressing genotypes (Figure S5). Because PAMP treatments also induce formation of callose papillae (defence-associated cell-wall thickenings) (Bestwick *et al.*, 1995), phenotypic assays for flg22-induced callose responses were performed on *cml9* genotypes (Clay *et al.*, 2009; Saijo *et al.*, 2009). Aniline blue staining was used to detect callose deposits on the cotyledons of Arabidopsis seedlings treated with 1 μM flg22 (lower panel, Figure 6a). Mutants lacking the functional flagellin receptor (*fls2*) did not respond to flg22 treatment and callose deposition was completely abolished compared to WT (Figure 6a,b). Quantitative and statistical analyses on *cml9* genotypes exposed to these treatments indicated that transgenic lines over-expressing *CML9* exhibited a significant lower number of callose spots 12 h after flg22 application (Figure 6a,b) but no significant difference was observed between the WT ecotype and the mutants (Figure 6b). These results show that flg22-induced callose deposition is altered in the over-expressing lines, suggesting a contribution of CML9 to the production and/or deposition of callose.

The perception of flagellin by plant cells also leads to important changes in gene expression (Navarro *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004). Quantitative RT-PCR analyses were performed using mRNA from seedlings of Col, *cml9-1* and over-expressing lines prepared at various time points before and after 1 μM flg22 treatment. Several genes known to display early and late flg22-mediated induction were monitored (Figure 7). As expected, all transcripts selected for quantitative PCR analyses increased in Col seedlings after

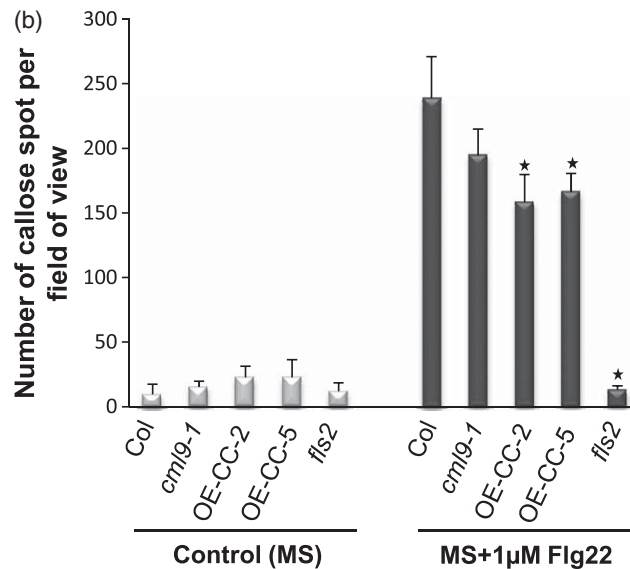
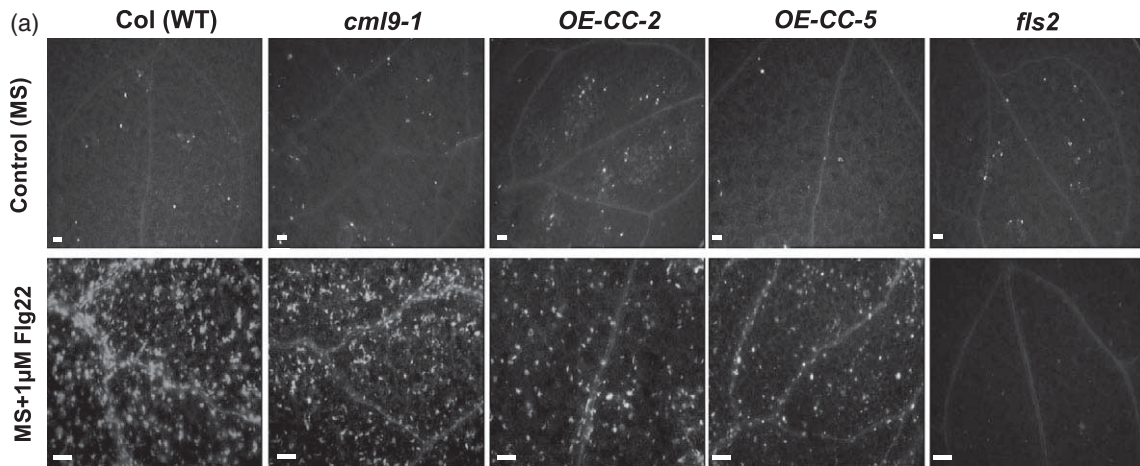


Figure 6. Callose deposition upon flg22 treatment is altered in transgenic lines over-expressing the *cml9* gene.

(a) Detection of callose papillae on cotyledons of seedlings (Col, *cml9-1*, *CML9* over-expressing lines and the *fls2* mutant) treated with flg22 (1 μM) (lower panel) or mock-treated (upper panel). Scale bars = 100 μm.

(b) Histograms illustrate the numbers of callose papillae deposited on cotyledons of 10-day-old Arabidopsis seedlings. The experiments were performed using three independent biological replicates, and each histogram represents the mean number of callose spots per cotyledon (\pm SEM) analysed using 30 independent cotyledons per genotype. Statistical differences between the genotypes are detected by ANOVA analysis followed by Tukey's HSD test. Asterisks indicate significant differences compared to Col at $P < 0.05$.

flg22 elicitation in an FLS2-dependent manner, confirming that these genes are PAMP-responsive. Figure 7 presents data for three representative genes. Transcript accumulation of *WRKY29*, a gene that exhibits early induction in response to flagellin (Asai *et al.*, 2002) is similar in mutant and over-expressing lines and the WT ecotype after flg22 treatment (from 0 to 3 h) (Figure 7a). We also monitored the expression of late flg22-responsive genes at 12 and 24 h post-treatment, such as *ICS1*, which encodes the isochorismate synthase involved in SA production (Figure 7b). *ICS1* expression was flg22-induced at 12 h in the Col ecotype (Figure 7b), but this induction was not observed in the *fls2*

mutant, the *cml9-1* knockout mutant or *OE-CC-5* (Figure 7b). In contrast, expression of *PR1*, a well-known defence marker gene was highly altered in *cml9* genotypes compared to the WT (Figure 7c). *PR1* gene expression exhibited a significant increase in the *cml9-1* mutant compared to WT and the opposite effect was observed in the over-expressing line, with a lower level of induction at 12 and 24 h post-treatment (Figures 7c and S6).

All these analyses confirm that CML9 acts in a flagellin-dependent signalling pathway to modulate both cellular and molecular processes that may be associated with plant defence processes during PTI.

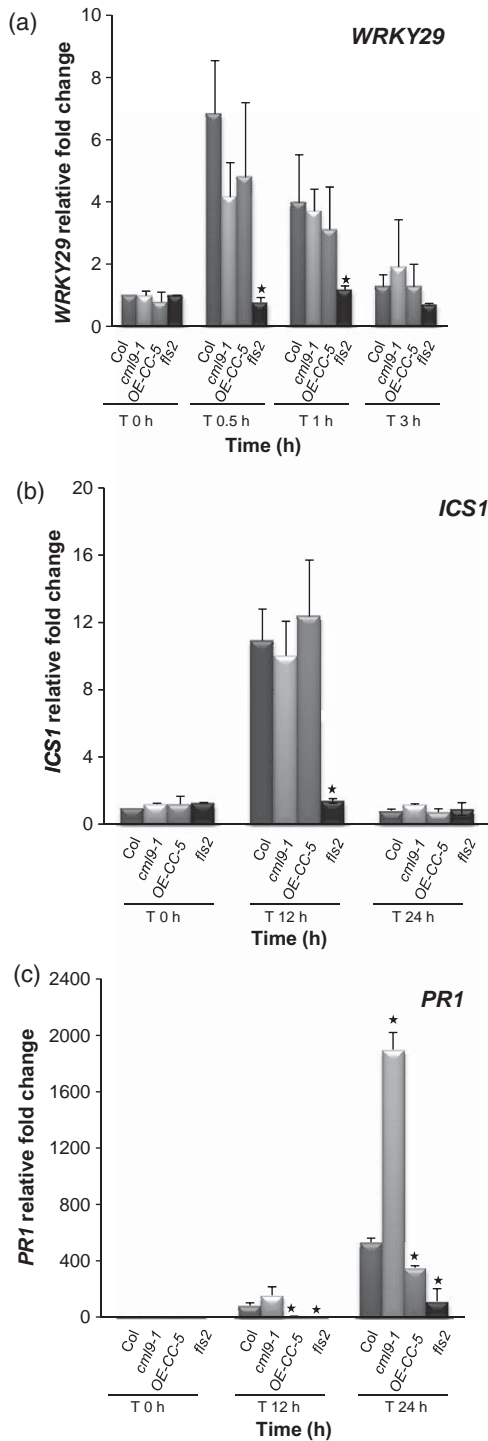


Figure 7. Expression analysis of flg2-associated marker genes in *cml9* genotypes. Analyses of gene expression levels for (a) *WRKY29*, (b) *ICS1* and (c) *PR1* in various genetic backgrounds. The WT accession Col, the knockout mutant *cml9-1*, and *OE-CC-5* seedlings cultivated in liquid medium were elicited using 1 μ M flg22, and harvested at 0, 0.5, 1 and 3 h for *WRKY29* and at 0, 12 and 24 h for *ICS1* and *PR1*. The fold changes relative to water-treated samples were determined by real-time PCR. Values are means \pm SD of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences compared to Col at $P < 0.05$ (ANOVA).

DISCUSSION

In addition to well-known Ca^{2+} sensors such as CaM and Ca^{2+} -dependent protein kinases, CMLs extend the repertoire of Ca^{2+} sensors in plants. In this study, we present a functional analysis of CML9 that highlights the involvement of CML9 in plant defence responses to phytopathogenic bacteria. The data reported suggest a role for AtCML9 in PTI through a flagellin-dependent signalling pathway.

CML9 is transcribed in response to PAMP and phytopathogenic bacteria

The *CML9* gene was described to be mainly expressed in leaves and vegetative tissues throughout the development of *A. thaliana* (Magnan *et al.*, 2008). This expression pattern was shown to be finely controlled by environmental factors such as abiotic stress and also by abscisic acid (Magnan *et al.*, 2008). We show here that regulation of *AtCML9* gene expression also takes place in response to phytopathogenic bacteria and PAMP treatment (flagellin). The up-regulation of *AtCML9* is dependent on SA production and also on a functional FLS2 receptor following plant inoculation with *P. syringae*. Moreover, according to de Torres *et al.* (2003), data from Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008), and experiments performed by our group, expression of the *AtCML9* gene is also induced by avirulent strains of *Pto* or the non-host bacteria *Pph*. All these data are consistent with the over-representation of W-boxes (six) in the *AtCML9* promoter (Figure S7). The W-box (TTGACC/T) is a WRKY transcription factor binding site that is mainly found in plant defence-responsive genes (Eulgem and Somssich, 2007). These W-boxes are over-represented in the *CML9* promoter region (four in the 500 bp upstream of ATG) as statistical analyses estimate the frequency of occurrence of W-boxes in the Arabidopsis genome to be 1.1 copies per promoter (Maleck *et al.*, 2000).

AtCML9 contributes to plant immunity

The expression profile of the *AtCML9* gene leads to the hypothesis that CML9 contributes to plant defence reactions. The involvement of Ca^{2+} decoding proteins in plant immunity is an emerging theme (Defalco *et al.*, 2010), and recent studies have established the contribution of Ca^{2+} -dependent protein kinases (Boudsocq *et al.*, 2010) and some CaM-binding partners to SA homeostasis or signalling (Galon *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Using a reverse genetics approach, we established that CML9 acts as a positive regulator of plant defence in response to various strains of *P. syringae* (pv. *tomato* or *maculicola*). The two allelic knockout mutants exhibit higher levels of susceptibility than WT to *P. syringae* inoculations, and, conversely, *CML9* over-expressing transgenic lines exhibit fewer discernible symptoms and a significantly lower level of bacteria development compared to WT and knockout plants.

To evaluate the contribution of CML9 in PTI, the behavior of the knockout *cm19* mutants and *CML9* over-expressing lines to the fully virulent strain *Pto* DC3000 or a disarmed (*Pto* DC3000 *hrcC*⁻) mutant strain was analysed. The *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ mutant does not possess a functional TTSS, so this bacterium is unable to block the first barriers of defence due to the activity of injected effectors in plant cells. The *CML9* over-expressing lines exhibit enhanced susceptibility upon inoculation with *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ compared to WT and knockout mutant lines. These differences may be explained, at least in part, by the fact that these transgenic lines exhibit reduced callose deposition or *PR1* gene expression (see Figure 4). In contrast, loss of CML9 function leads to an opposite tendency, as indicated by the enhanced *PR1* gene expression. These results support the hypothesis that CML9 participates in defence mechanisms that restrict the susceptibility of plants to virulent *Pseudomonas* species. To validate the data obtained with *Pto* DC3000 *hrcC*⁻, the non-host pathosystem *A. thaliana*-*Pph* was used. This model is a good tool to explore the PTI-dependent processes because (i) the resistance of *A. thaliana* accessions to this bacterium was shown to be mainly FLS2-dependent through perception of flagellin, and (ii) because this bacterium does not possess the full repertoire of effectors required to efficiently block PTI (Forsyth *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2011). In this context, we show that the *CML9* over-expressing lines exhibit enhanced susceptibility upon inoculation with *Pph* that appears to be dependent on flagellin perception (Figure 5).

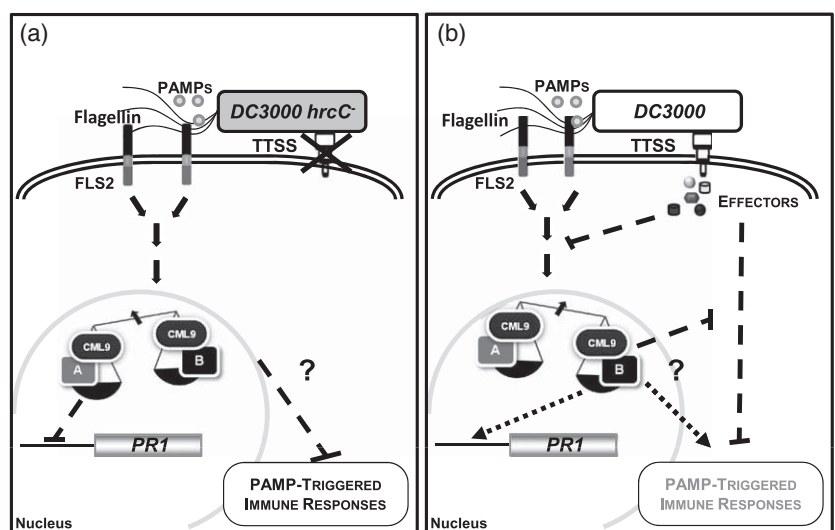
Collectively, these results illustrate the involvement of CML9 in the PAMP signalling pathway leading to plant defence processes. This was confirmed by *in vitro* experiments and use of the flg22 peptide. We show that over-expression of *CML9* altered both callose production and defence gene expression in response to flg22 application. However, CML9 do not participate in ROS production and

expression of early-induced genes such as *WRKY29* in response to flg22 application, suggesting that CML9 acts preferentially on later defence responses. Indeed, the *PR1* gene, which is known to be induced 12 and 24 h after flg22 treatment, exhibits a significantly higher level of expression in the knockout mutant *cm19-1*. This indicates that CML9 negatively regulates this defence marker gene. Apart from the *PR1* gene expression patterns, weak differences were observed between the WT and knockout mutants in response to flg22 applications. Because CML9 belongs to a large multigenic family (McCormack *et al.*, 2005), and although *CML9* is one of the CML induced by flg22 application, we cannot exclude some functional redundancies between CML9 and other CMLs.

How might CML9 contribute to plant defence mechanisms?

Based on the data obtained, CML9 appears to have a dual role. On the one hand, CML9 may act as a negative regulator of the flagellin signalling pathway as indicated by callose deposition and *PR1* gene expression in response to exogenous application of flg22 or in the *Pto* DC3000 *hrcC*⁻ mutant strain (Figure 8a). On the other hand, under more natural conditions, CML9 acts as a positive regulator of plant defence during interaction with a fully *Pto* virulent strain (Figure 8b). To better understand the contribution of CML9 to plant immunity, the cellular processes controlled by this CML must be identified. It is well known that CaM typically acts as a Ca²⁺ sensor relay by interacting and modulating the activity of target proteins that may ultimately participate in multiple functions (Bouche *et al.*, 2005). Experimental evidence demonstrated the functionality of predicted EF hands in CML9 (Kohler and Neuhaus, 2000), which, under certain conditions, fulfils the role of CaM in yeast (Zielinski, 2002). Therefore, as shown in Figure 8, CML9 may fine-tune plant defence processes

Figure 8. Hypothetical model for the contribution of CML9 to plant basal immunity during *Pto* DC3000 infection of susceptible Arabidopsis. Depending on the physiological context, CML9 may have a dual role that may rely on fine-tuning of the activity of the CML9-interacting partners 'A' and 'B'. (a) During interaction with a TTSS-deficient *Pto* mutant (*hrcC*⁻) or in response to flg22 application, PTI responses are activated. In this particular context, CML9 acts as a negative regulator of the response by limiting the intensity of the PTI. (b) In a plant–bacteria interaction in which PTI is established but rapidly counteracted by the action of TTSS effectors of *Pto* DC3000, it is proposed that CML9 potentiates resistance by unknown mechanisms that may act either by limiting the effectors' activity on targeted functions or by enhancing defence processes.



through the balance of interacting partners and also calcium homeostasis. Thus, the diversity of CML9-interacting partners may also contribute to various physiological responses such as plant defence against pathogens or abiotic stress (Magnan *et al.*, 2008).

Work by Perochon *et al.* (2010) and Popescu *et al.* (2007) identified CML9-interacting proteins. These authors established that CaM and CML may share common targets but also possess their own specific repertoires of interacting proteins. It was reported that several transcription factors interact *in planta* with CML9 (Popescu *et al.*, 2007; Perochon *et al.*, 2010), and this is consistent with the nucleo-cytoplasmic location of CML9 protein in plant cells (Perochon *et al.*, 2010) (Figure 8). Interestingly, among these nuclear interacting partners, the TGA3, TGA2 and WRKY53 transcription factors were shown to be involved in plant defence (Kesarwani *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2007). *wrky53* knockout mutants are more susceptible to *P. syringae* DC3000 infection (Murray *et al.*, 2007), and *tga3-1* mutants are defective in basal pathogen resistance, displaying a significantly higher bacterial titre than WT when inoculated with a virulent strain of *Pma* (ES4326) (Kesarwani *et al.*, 2007). The interactions between TGA3, WRKY53 and CML9 were validated *in planta* (Popescu *et al.*, 2007), but questions remain as to the role of CML9 in the activity of these transcription factors. In this study, we showed that de-regulation of *PR1* gene expression occurs in *cml9* genotypes, and several reports have clearly demonstrated that TGA3 positively regulates this gene (Johnson *et al.*, 2003; Kesarwani *et al.*, 2007), whereas TGA2 and WRKY53 have a negative effect (Murray *et al.*, 2007; Boyle *et al.*, 2009).

The next challenge will be to unravel the biological significance of these interactions related to plant defences, and to determine the precise role of CML9 and calcium on the activity of these targets. A given Ca²⁺ signal or different Ca²⁺ signatures may have different biochemical consequences as a result of CaM/CML isoform-dependent selective activation/inhibition of particular target proteins.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana accessions Columbia (Col-8) and Wassilewskija (Ws4) were used in this study. The T-DNA knockout mutants *cml9-1* and *cml9-2* of *AtCML9* (*At3g51920*) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre and the Institut National de la Recherche Agronomique (Versailles, France), respectively. These mutants were previously characterized by Magnan *et al.* (2008). Transgenic plants over-expressing the *AtCML9* coding sequence under the control of the CaMV 35S promoter were generated using the pMDC32 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003). Two independent homozygous lines were used in this study and named *OE-CC-2* and *OE-CC-5*. These over-expressing lines exhibit no morphological or developmental defects under normal plant growth conditions. Molecular characterization of these transgenic lines indicates that *OE-CC-2* and *OE-CC-5* exhibit

four- and 10 fold induction of the *AtCML9* gene, respectively (Figure S2). Arabidopsis mutants in the Columbia ecotype Col-0 altered in SA metabolism (*sid1* and *sid2*), the JA pathway (*jar1*), perception of ethylene (*ein2*), flagellin (*fls2*) and EF-Tu (*efr*) were purchased from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre and used for gene expression analyses or as a control in bioassays. Plants were grown on peat (Jiffy[®], Puteaux SA, Les Clayes ss Bois, France) and kept in a growth chamber under a light period of 9 h at 20°C and relative humidity of 70% for 3 or 4 weeks before use. For axenic growth, seeds were surface-sterilized and sown either on solid medium (1% agar) that contained MS salts (0.5× MS, pH 5.7) or under liquid culture conditions in 12- or 24-well plates containing 0.5× MS, 0.5 g L⁻¹ MES, 1% sucrose at pH 5.7. Then the plates were transferred to a growth chamber at 20–22°C with a 16 h light/8 h dark photoperiod.

Plant inoculations and *in planta* bacterial growth determination

The *P. syringae* strains used in this study were grown at 29°C on LB medium supplemented with the appropriate antibiotics: 50 µg mL⁻¹ rifampicin (*Pto* DC3000 and *Pma*) or 50 µg mL⁻¹ rifampicin and 34 µg mL⁻¹ chloramphenicol (*Pto* DC3000 *hrcC*⁻). The Arabidopsis non-host pathogen *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a and its corresponding Δ *fliC* mutant were grown at 29°C on LB medium supplemented with 20 µg mL⁻¹ kanamycin (*Pph* Δ *fliC*). The *Pph* Δ *fliC* mutant strain was generated by allelic exchange using a plasmid containing a fragment including approximately 500 bp of each of the 5' and 3' regions flanking the *fliC* gene. These two fragments flanking the *nptII* gene (which confers resistance to kanamycin) formed the knockout allele used to replace the functional copy of the *fliC* gene in the genome of *Pph*. Generation of the knockout vector and the allelic exchange process were performed as previously described (Zumaquero *et al.*, 2010). Lack of motility was confirmed for the resulting knockout mutant. WT-like growth in LB medium was also shown for the knockout mutant using an *in vitro* competitive index assay (Figure S8) (Macho *et al.*, 2007).

Four-week-old Arabidopsis plants used for bacterial inoculations were kept at high humidity for 12 h before inoculation with a bacterial suspension at the indicated densities using a blunt syringe on the abaxial side of the leaves. Quantification of *in planta* bacterial growth was performed as previously described (Lorrain *et al.*, 2004). In the case of *Pph* Δ *fliC*, the experiment was also performed by co-infiltration of the mutant strain (5 × 10⁶ cfu mL⁻¹) and the flg22 peptide (1 µM).

Seedling culture and treatments for gene expression analyses

Treatments with flg22 peptide were performed as described by Denoux *et al.* (2008) on WT (Col) and *fls2* mutant seedlings cultivated in liquid medium. Seedlings were grown for 11 days; on the 9th day, the medium was replaced with fresh MS medium with or without flg22 (1 µM). To analyse gene expression upon exogenous SA or JA application, 2-week-old seedlings cultivated on solid MS medium were sprayed with 100 µM of these compounds or H₂O (mock treatment), and plants were harvested at various times for RNA extraction.

Gene expression analyses

For quantitative RT-PCR, total RNA was extracted using the Nucleospin RNA plant kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using 2.5 µg RNA and Superscript reverse transcriptase II

(Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France). Actin was used as an internal standard. Quantitative PCR was performed using a LightCycler system (Roche, Meylan, France). To test the suitability of the primer sets, the specificity and identity of the RT-PCR products were monitored by melting-curve analysis. As expression of *AtCML9* is influenced by circadian rhythm (Harmer *et al.*, 2000), the expression level of *AtCML9* was also measured at each point of the control kinetics. Each measurement is the mean of three biological replicates, and the experiment was repeated twice for each biological repetition. Because no significant changes in the transcript level of the control gene (actin) were observed, the values obtained for this gene were used for data standardization. The primer sets used in the experiments are listed in Table S1.

Expression analyses of flg22-induced marker genes were performed by quantitative PCR using the Fluidigm Biomark[®] technology (Fluidigm France SARL, Les Ulis, France) available at Genomic GenoToul (Toulouse, France). A set of gene-specific primers for quantitative PCR were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche) to produce PCR products of approximately 80–100 bp in length (Table S1). First-strand cDNA templates were pre-amplified using TaqMan PreAmp Master Mix (Invitrogen), specific primers were selected and reactions were performed using a Fluidigm Biomark[®] BMK-M-96.96 plate according to the manufacturer's recommendations. Relative gene expression values were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method described by Livak and Schmittgen (2001). The expression analysis data illustrated are the mean of four independent replicates. No significant change in the transcript level of *PP2A* was observed, and the values obtained for this reference gene were used for data standardization. WT (Col) was used as the reference sample.

Detection and quantification of callose papillae

Leaves of 4-week-old plants were collected 12 h post-infiltration with *Pto* DC3000 or *hrcC*⁻, and stained with aniline blue as previously described (Hauck *et al.*, 2003). Experiments were repeated three times on at least five plants after inoculation with *Pto* strains or mock control. For flg22-induced callose deposition on the cotyledons of *in vitro* cultivated seedlings, the experiment was performed as described by Clay *et al.* (2009). Three independent biological assays were performed, and the number of callose spots was determined on 30 independent cotyledons per genotype. Aniline blue staining was viewed using a Leica DMIRBE microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) under UV illumination with a broad-band DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) filter. Quantification of callose deposits was performed on a leaf area of 3.6 mm² for *Pto* experiments or the full cotyledon surface for flg22-treated seedlings using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Salicylic acid quantification

Salicylic acid was determined on three biological replicates consisting of a minimum of five infected or mock-treated leaves from five plants. Samples were collected at appropriate times and frozen immediately in liquid nitrogen. Tissue was then ground to a powder and hormones were extracted as described by Forcat *et al.* (2008) with internal standard SA^{D6} (CDN Isotopes, Quebec, Canada) added to the extraction buffer. Samples were analysed by HPLC using a Waters ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization MS/MS system using a Waters Micromass Q-TOF mass spectrophotometer (waters, Guyancourt, France). The MS was operated in the negative mode using WATERS MASSLYNX software. Analyses by MS/MS were performed following mass transitions of SA and correlating the ion peak area of the compounds with their internal standards.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using STATGRAPHICS CENTURION XV software (SigmaPlus, <http://www.sigmaplus.fr>).

ACKNOWLEDGEMENTS

The University of Toulouse and the Centre National de la Recherche Scientifique supported this work. L.-J.L. is a fellow of the French Ministry of National Education and Research. We thank Martine Charpentreau and Yann Aubert for their contribution to the characterization of the transgenic lines, and the technical services of the laboratory (LRSV) for plant material and technical assistance. We also thank Thomas Kroj (UMBR BGPI) and Claudine Balagué (LIPM, UMR CNRS-INRA 441) for helpful discussions, and Christian Mazars for critical reading of the manuscript. This work was performed in laboratory UMR5546 of the 'Laboratoire d'Excellence' (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

SUPPORTING INFORMATION

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

Figure S1. Expression profiles of *PR1* and *PDF1* marker genes in response to exogenous applications of SA and MeJA.

Figure S2. Characterization of the two transgenic lines over-expressing the *AtCML9* gene.

Figure S3. Behavior of the *cm19-2* mutant upon *P. syringae* infection.

Figure S4. Expression profiles of the *PR1* marker gene in leaves of *OE-CC-2* inoculated with *Pto* DC3000 or a TTSS-deficient strain.

Figure S5. Quantification of ROS production in *cm19* genotypes after flg22 elicitation.

Figure S6. Expression profile of the *PR1* marker gene in *OE-CC-2* transgenic plants after flg22 treatment.

Figure S7. Bioinformatic search for *cis*-elements in the *AtCML9* gene promoter.

Figure S8. Characterization of the *P. syringae* pv. *phaseolicola* Δ *fliC* mutant strain.

Table S1. List of primers used for quantitative PCR.

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

- Arnold, D.L., Lovell, H.C., Jackson, R.W. and Mansfield, J.W. (2011) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 617–627.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977–983.
- Aslam, S.N., Erbs, G., Morrissey, K.L., Newman, M.A., Chinchilla, D., Boller, T., Molinaro, A., Jackson, R.W. and Cooper, R.M. (2009) Microbe-associated molecular pattern (MAMP) signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 375–387.
- Bestwick, C.S., Bennett, M.H. and Mansfield, J.W. (1995) *Hrp* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* **108**, 503–516.
- Bittel, P. and Robatzek, S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 335–341.
- Boller, T. and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.

- Bouche, N., Yellin, A., Snedden, W.A. and Fromm, H. (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 435–466.
- Boudsoq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. and Sheen, J. (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*, **464**, 418–422.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H.L., Murmu, J., Chu, J.Y., Fobert, P.R. and Despres, C. (2009) The BTB/POZ domain of the *Arabidopsis* disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *Plant Cell*, **21**, 3700–3713.
- Chiasson, D., Ekengren, S.K., Martin, G.B., Dobney, S.L. and Snedden, W.A. (2005) Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Mol. Biol.* **58**, 887–897.
- 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.
- 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.
- 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.
- Defalco, T.A., Bender, K.W. and Snedden, W.A. (2010) Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J.* **425**, 27–40.
- Delk, N.A., Johnson, K.A., Chowdhury, N.I. and Braam, J. (2005) CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol.* **139**, 240–253.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M. and Dewdney, J. (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol. Plant*, **1**, 423–445.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S. and Poovaliah, B.W. (2009) Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, **457**, 1154–1158.
- Eulgem, T. and Somssich, I.E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 366–371.
- Forcat, S., Bennett, M.H., Mansfield, J.W. and Grant, M.R. (2008) A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods*, **4**, 16.
- Forsyth, A., Mansfield, J.W., Grabov, N., de Torres, M., Sinapidou, E. and Grant, M.R. (2010) Genetic dissection of basal resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in accessions of *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 1545–1552.
- Galon, Y., Nave, R., Boyce, J.M., Nachmias, D., Knight, M.R. and Fromm, H. (2008) Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **582**, 943–948.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **5**, 1003–1011.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**, 251–256.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 277–284.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. and Mansfield, J. (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **23**, 441–450.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, **290**, 2110–2113.
- Hauck, P., Thilmony, R. and He, S.Y. (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 8577–8582.
- Heo, W.D., Lee, S.H., Kim, M.C. *et al.* (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 766–771.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. and Zimmermann, P. (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics*, **2008**, 420747.
- Johnson, C., Boden, E. and Arias, J. (2003) Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of *trans*-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 1846–1858.
- Kesarwani, M., Yoo, J. and Dong, X. (2007) Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **144**, 336–346.
- Kohler, C. and Neuhaus, G. (2000) Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **471**, 133–136.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*, **38**, 527–538.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* **171**, 249–269.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balague, C. and Roby, D. (2004) VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, **16**, 2217–2232.
- Ma, W., Smigel, A., Tsai, Y.C., Braam, J. and Berkowitz, G.A. (2008) Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.* **148**, 818–828.
- Macho, A.P., Zumaquero, A., Ortiz-Martin, I. and Beuzon, C.R. (2007) Competitive index in mixed infections: a sensitive and accurate assay for the genetic analysis of *Pseudomonas syringae*–plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 437–450.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpentreau, M., Sotta, B., Galaud, J.P. and Aldon, D. (2008) Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J.* **56**, 575–589.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangel, J.L. and Dietrich, R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**, 403–410.
- McCormack, E. and Braam, J. (2003) Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol.* **159**, 585–598.
- McCormack, E., Tsai, Y.C. and Braam, J. (2005) Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* **10**, 383–389.
- Murray, S.L., Ingle, R.A., Petersen, L.N. and Denby, K.J. (2007) Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 1431–1438.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**, 1113–1128.
- Park, C.Y., Heo, W.D., Yoo, J.H. *et al.* (2004) Pathogenesis-related gene expression by specific calmodulin isoforms is dependent on NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance. *Mol. Cells* **18**, 207–213.
- Perochon, A., Dieterle, S., Pouzet, C., Aldon, D., Galaud, J.P. and Ranty, B. (2010) Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 747–751.
- Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J.P. and Ranty, B. (2011) Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*, **93**, 2048–2053.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308–316.
- Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z., Seay, M., Gerstein, M., Snyder, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2007) Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 4730–4735.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. and Scheel, D. (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence

- responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* **68**, 100–113.
- Ranty, B., Aldon, D. and Galaud, J.P.** (2006) Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal Behav.* **1**, 96–104.
- Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajeroska-Mukhtar, K., Haweker, H., Dong, X., Robatzek, S. and Schulze-Lefert, P.** (2009) Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO J.* **28**, 3439–3449.
- de Torres Zabala, M., Bennett, M.H., Truman, W.H. and Grant, M.R.** (2009) Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host–pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J.* **59**, 375–386.
- de Torres, M., Sanchez, P., Fernandez-Delmond, I. and Grant, M.** (2003) Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in RPM1-mediated resistance. *Plant J.* **33**, 665–676.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D. and Katagiri, F.** (2008) Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J.* **53**, 763–775.
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J.D., Katagiri, F. and Glazebrook, J.** (2009) *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000301.
- Yuan, J. and He, S.Y.** (1996) The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the production and secretion of multiple extracellular proteins. *J. Bacteriol.* **178**, 6399–6402.
- Zeng, W. and He, S.Y.** (2010) A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **153**, 1188–1198.
- Zielinski, R.E.** (2002) Characterization of three new members of the *Arabidopsis thaliana* calmodulin gene family: conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. *Planta*, **214**, 446–455.
- Zipfel, C.** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 414–420.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 353–360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764–767.
- Zumaquero, A., Macho, A.P., Rufian, J.S. and Beuzon, C.R.** (2010) Analysis of the role of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a in interaction with the plant. *J. Bacteriol.* **192**, 4474–4488.

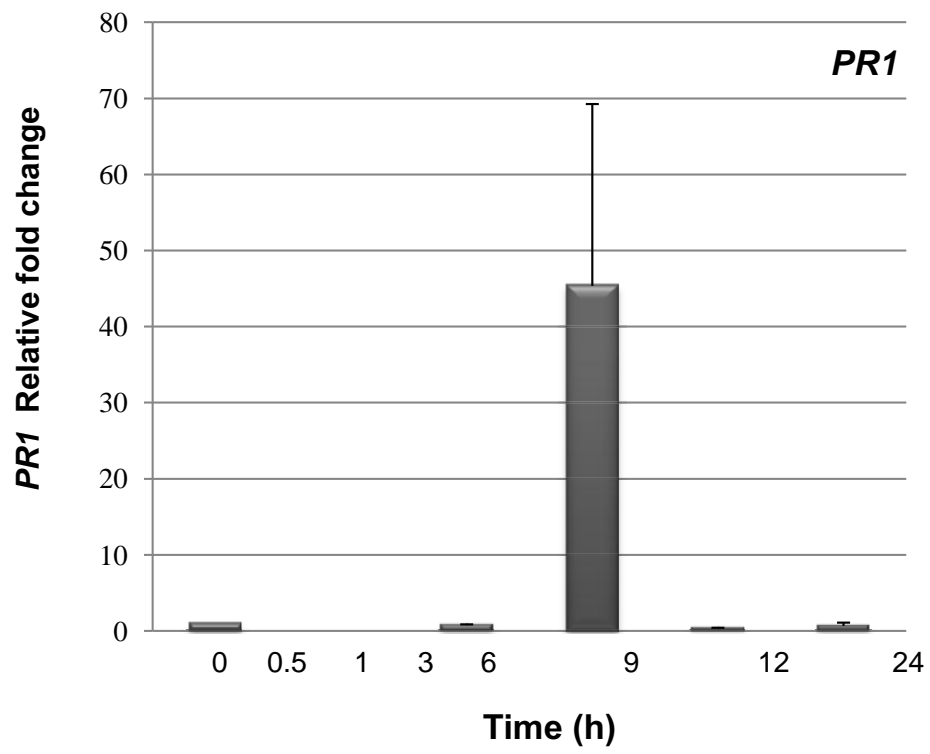


Figure S1

(a) **OCC: Over-expression of *CML9* in *Col8***
(*pMDC32*)

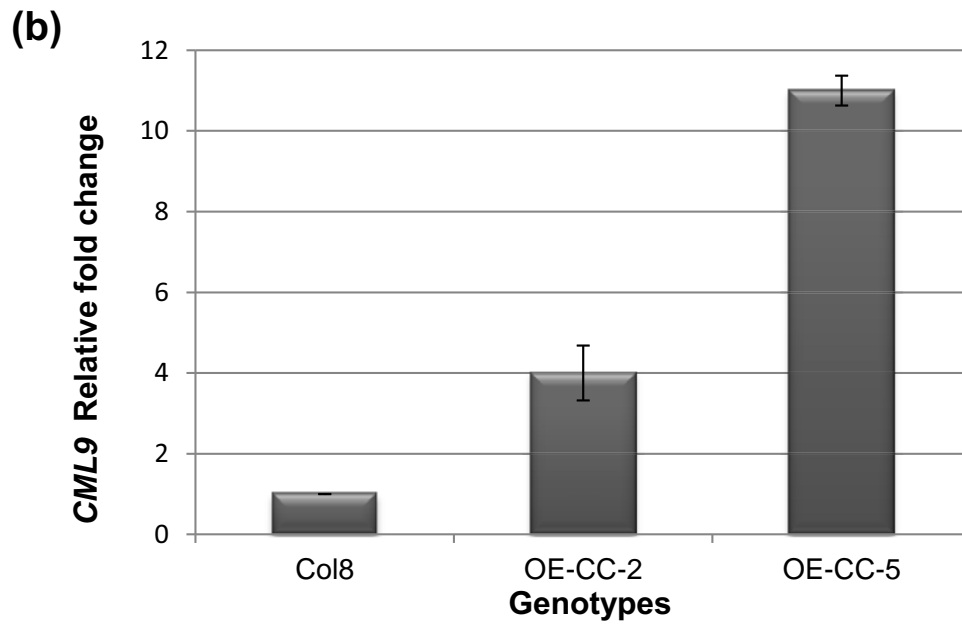


Figure S2

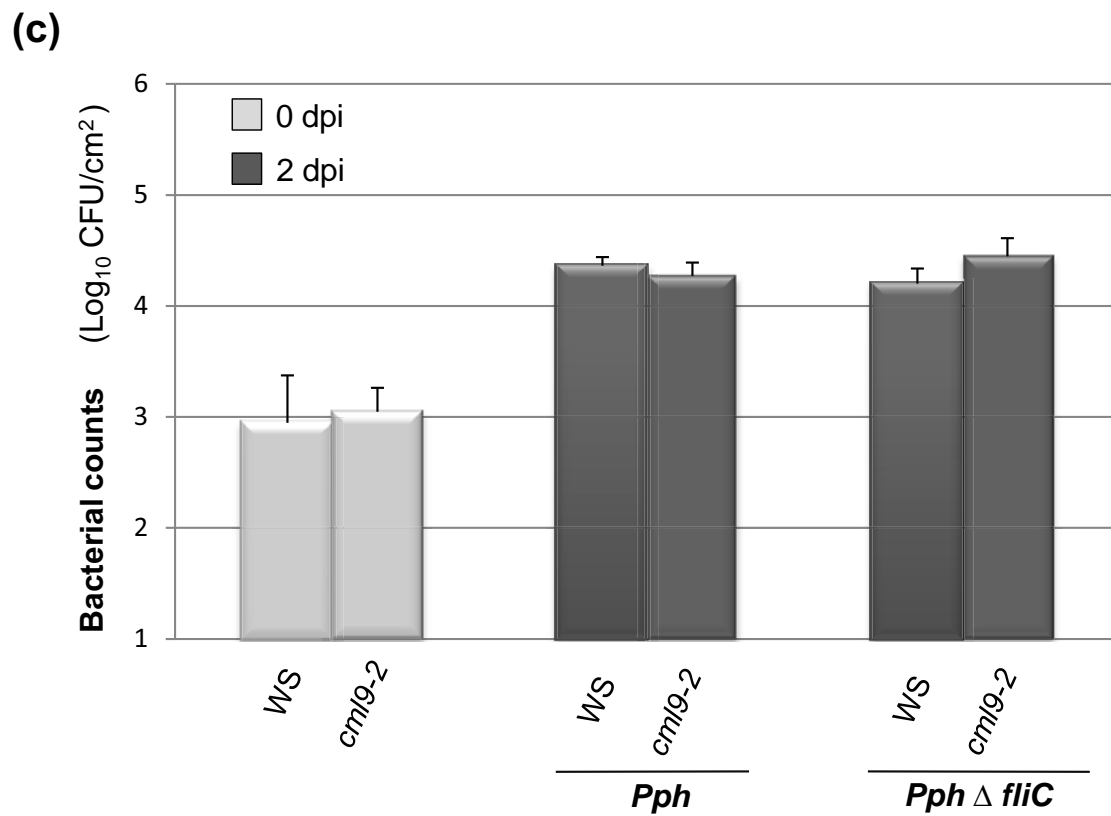
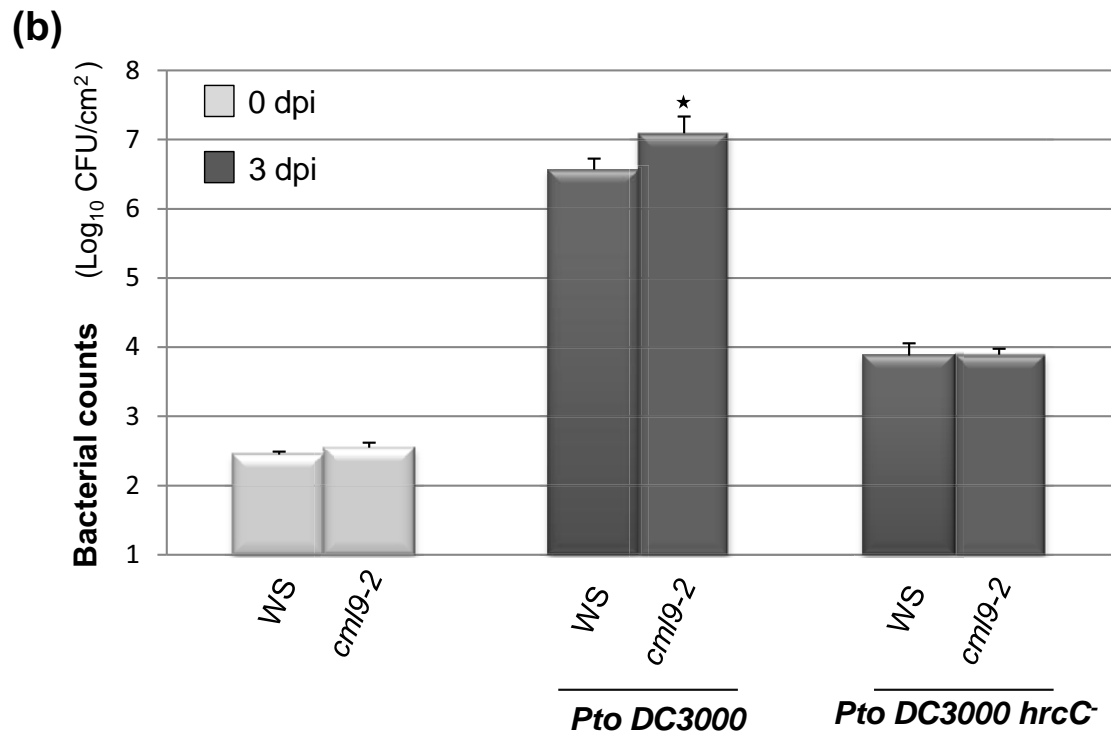


Figure S3

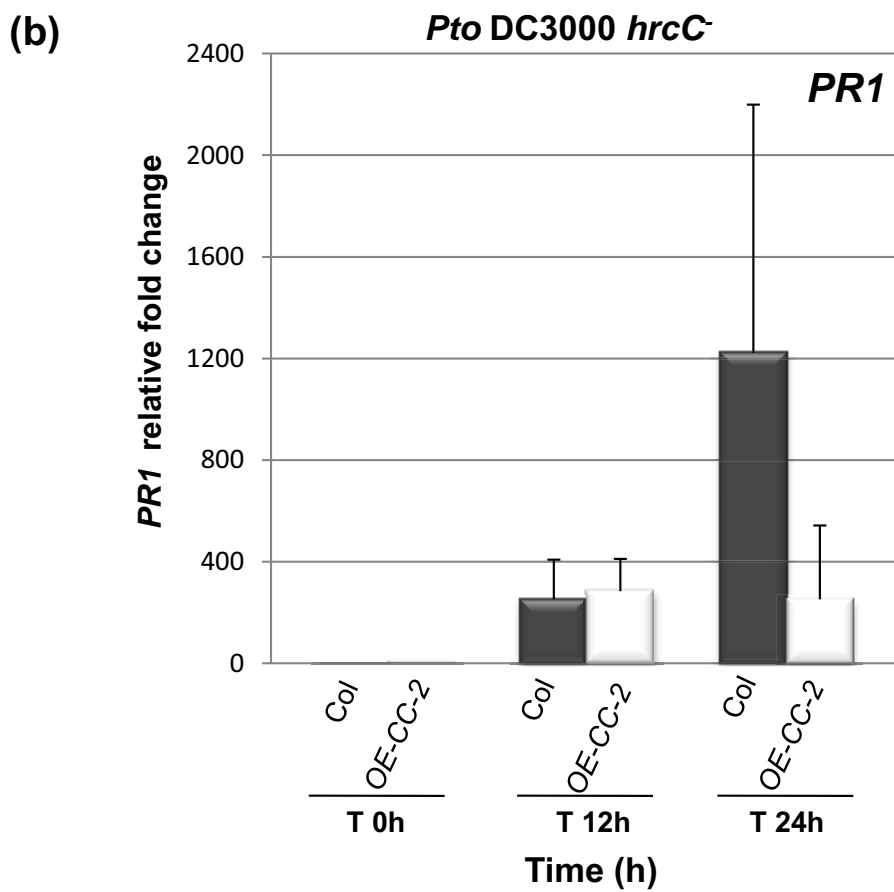
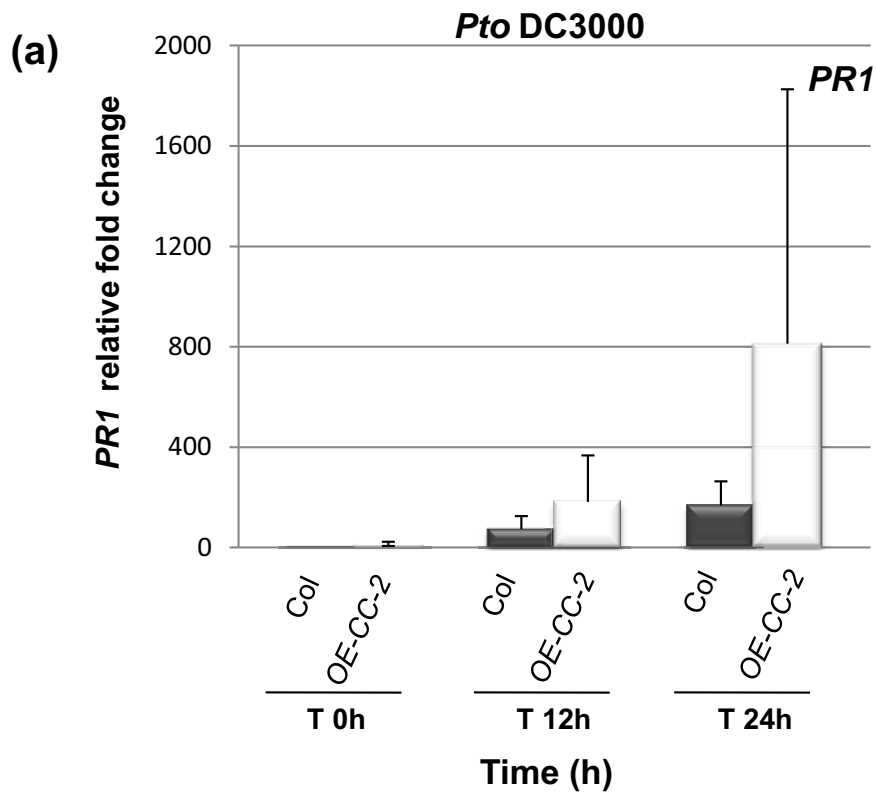


Figure S4

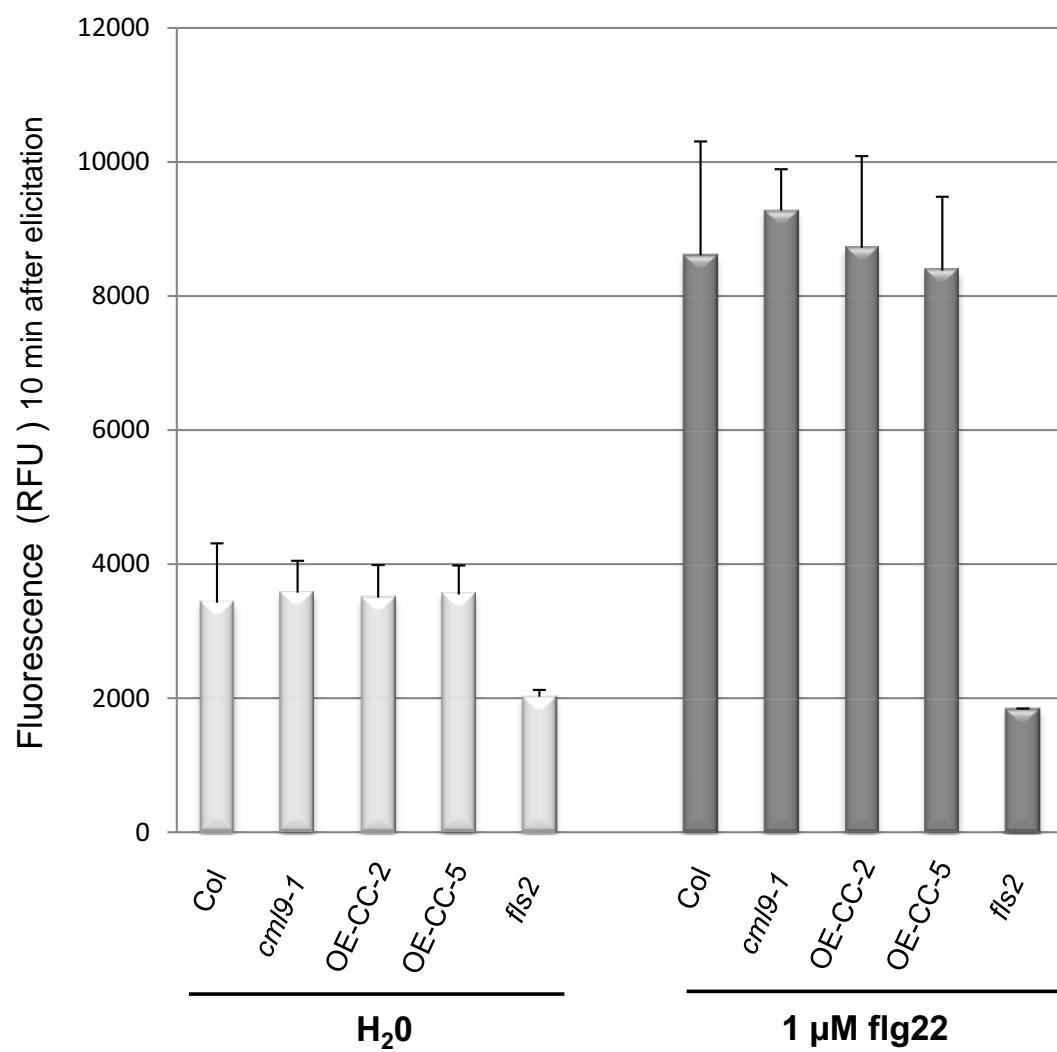


Figure S5

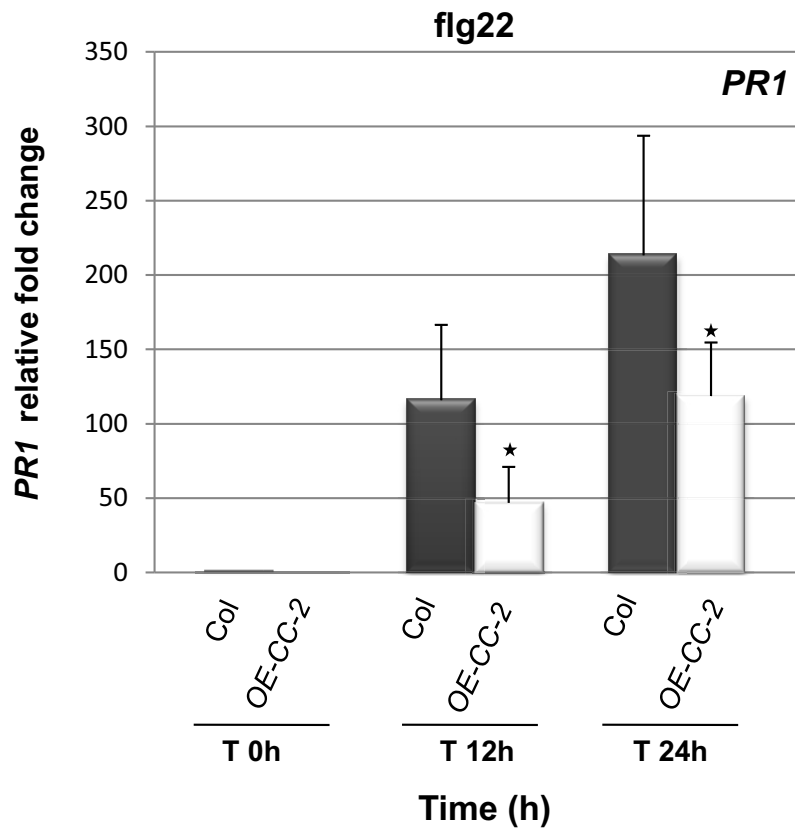


Figure S6

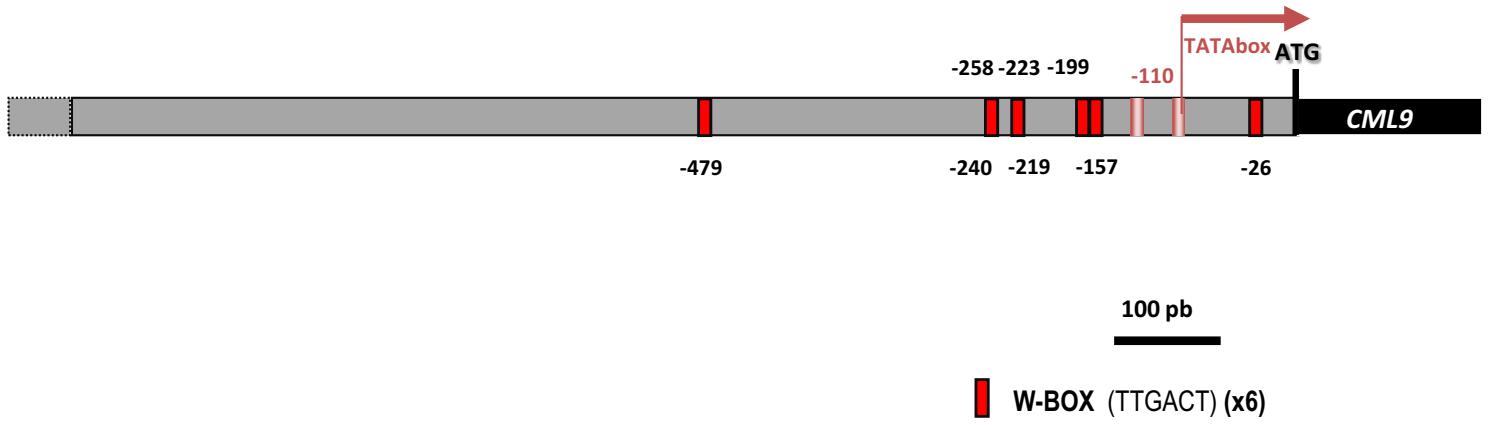
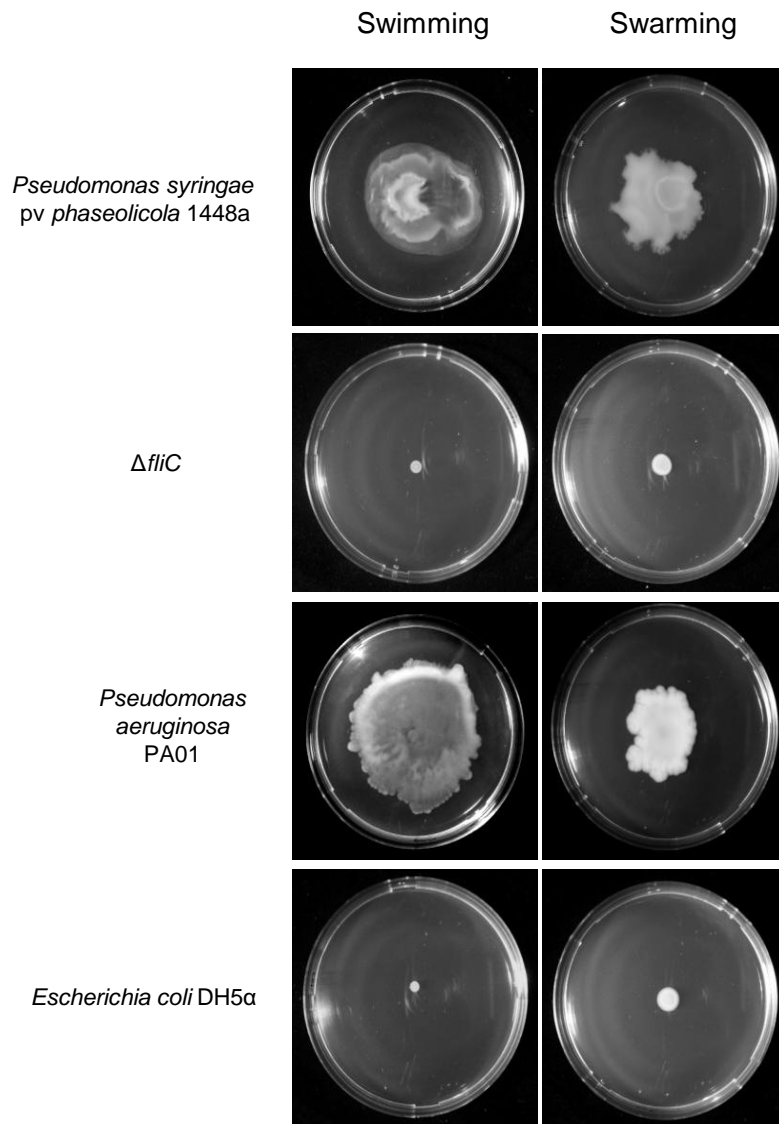


Figure S7



$LB_{CI}: 1.079 \pm 0.179$

Figure S8

Table S1: Primers used for quantitative PCR

Name	Sequence	
<i>ACTIN</i>	5'-CACCCGAGAGGAAGTACAGTG-3'	Forward
	5'-CATACTCTGCCTTAGAGATCCACA-3'	Reverse
<i>PR1</i>	5'-ATGTGCCAAAGTGAGGTGTAA-3'	Forward
	5'-TTCACATAATTCCCACGAGCA-3'	Reverse
<i>CML9</i>	5'-TCATAGACAAAGATTCCGATGG-3'	Forward
	5'-GCAGTTGTTCCGCCTTG-3'	Reverse
<i>PP2A</i> (AT1G13320)	5'-CCGTGAAGCTGCTGCAAACAATC-3'	Forward
	5'-TGCCCATTGAGGACCAAACTCTTC-3'	Reverse
<i>WRKY29</i>	5'-AAGGATCTCCATACCCAAGGA-3'	Forward
	5'-GGGTTTTGAGGATTTCTTTCG-3'	Reverse
<i>ICS1</i>	5'-GCAGGGAGACTTACGAAGGA-3'	Forward
	5'-TGCTTCTTCTGCTGGAAGC-3'	Reverse

FIGURE LEGENDS – Supplemental data

Figure S1: Expression profile of *PR1* marker gene in response to the exogenous application of SA

Two-week-old seedlings (ecotype Col) cultivated on MS medium were sprayed either with SA (100 μ M) or water (mock). Plant material was harvested at 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 hours post-treatments. The results are expressed as a fold change relative to mock treatment. The data illustrate the averaged values \pm standard deviation of three independent experiments.

Figure S2: Characterization of two transgenic lines overexpressing the *AtCML9* gene (*OE-CCs*)

(a) Scheme of the construct used to generate the *CML9* overexpressing lines. The cDNA was made of the coding sequence of *CML9* and introduced in a pMDC32 vector under the control of the constitutive double p35S promoter **(b)** The relative levels of *CML9* gene expression in *OE-CC-2* and *OE-CC-5* compared to WT (Col) in normal plant growth conditions were determined by RT-qPCR analyses. **(c)** Observations of the WT (Col) and *OE-CCs* transgenic lines at vegetative or reproductive developmental stages development.

Figure S3: Phenotypic analyses of the second allelic mutant *cml9-2* upon *P. syringae* infection

(a) Disease symptoms in *Arabidopsis* ecotype *Wassilewskija* leaves (WT (Ws-4), *cml9-2*) caused by *Pto* DC3000 infection. 4-week-old plants of *Arabidopsis thaliana* leaves were syringe-infiltrated with 2×10^5 cfu/mL of *Pto* DC3000 and pictures were taken 5 days post-inoculation. Arrows indicate the half-leave inoculated. **(b)** Quantification of *in planta* bacterial growth. WT and *cml9-2* plant were inoculated with *Pto* DC3000 and *Pto* DC3000 altered in TTSS (*hrcC*) and a bacterial quantification was performed at 0 and 3 dpi. In these experiments, leaves were syringe-infiltrated with 10^5 cfu/mL of *Pto* DC3000 and 10^6 cfu/mL

for the *Pto* DC3000 *hrcC*. **(c)** *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (*Pph*) and *Pph* Δ *flic* infection. In these experiments, leaves were syringe-infiltrated with 5×10^6 cfu/mL.

All the data are representative of 5 replicates of three independent experiments. P values were calculated using the two-tailed Mann-Whitney U-test to indicate significant differences between the genotypes tested. Asterisks illustrate $p < 0.05$. Error bars represent SEM.

Figure S4: Expression profiles of *PR1* marker gene in leaves of the OE-CC-2 inoculated with *Pto* DC3000 or TTSS deficient strain.

Analyse of *PR1* marker genes in leaves of the WT (Col) and OE-CC-2 transgenic line syringe-infiltrated with 2×10^5 cfu/mL of *Pto* DC3000 **(a)** or with *Pto* DC3000 *hrcC* (10^7 cfu/mL) **(b)** and harvested at 0, 12 and 24 hours post-inoculation. The fold changes relative to the mock treatment were determined by real-time PCR. The values are means \pm standard deviation of four independent experiments.

Figure S5: ROS production in *cmI9* genotypes after flg22 elicitation

Leaf discs of 4mm diameter from four-week-old *Arabidopsis* plants (Col, *cmI9* mutant and OE-CCs) were treated either with 1 μ M flg22 or a mock control. ROS were measured as fluorescence emission at 10 minutes post-elicitation with an Amplex red hydrogen/peroxidase assay kit (Molecular Probes) following the manufacturer's instructions and detection performed as described by Lachaud *et al.* (2011). For each genotype 18 discs taken on 3 different plants are used, these experiments have been repeated 3 times in 3 biological independent repetitions.

Figure S6: Expression profile of *PR1* marker gene in the OE-CC-2 transgenic plant after flg22 treatment.

Analyse *PR1* gene expression levels in the WT accession Col and OE-CC-2 seedlings cultivated in liquid medium and elicited with 1 μ M flg22. The samples were harvested at 0, 12,

24 hours. The fold changes relative to water treated samples were determined by real-time PCR. The values are means \pm standard deviation of four independent experiments. The significance of *gene* inductions was tested with ANOVA ($P < 0.05$).

Figure S7: Scheme of the *in silico* analyses of the *AtCML9* gene promoter. The 1.5 kb sequence upstream the start codon of the *AtCML9* coding sequence was analysed using PlantCARE and PLACE databases. The locations of the predicted W-boxes are indicated in red.

Figure S8: Characterization of the *P. syringae pv phaseolicola fliC* mutant strain.

Images show the result of swimming and swarming motility assays carried out for *Pph* and *Pph ΔfliC*, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and *Escherichia coli* DH5 α were used as a positive control and negative controls, respectively. Bacterial growth of the *Pph ΔfliC* strain was confirmed to be as wild type by a competitive index assay. Since the competitive index (^{LB}CI) is defined as the mutant-to-wild type ratio after incubation divided by the mutant-to-wt ratio prior to incubation, a competitive index not significantly different to one by a T-Student test ($P = 0.05$), as the one obtained for the $\Delta fliC$ indicated that growth of the mutant is not significantly different from growth of the wild type strain.

Table S1: List of primers used for quantitative PCR

Reference:

Lachaud, C., Da Silva, D., Amelot, N., Béziat, C., Brière, C., Cotelle, V., Graziana, A., Grat, S., Mazars, C. and Thuleau, P. (2011) Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Mol Plant*, 4, 310-318.

Discussion...

L'ensemble des résultats présentés dans cet article démontre que **CML9 contribue aux réponses de défense contre l'agent pathogène bactérien *P. syringae*.**

L'analyse de la régulation transcriptionnelle du gène *CML9* a révélé que **l'expression de CML9 est contrôlée par la production de SA et par la présence de récepteurs FLS2 fonctionnels** en réponse à l'infection par *P. syringae*.

Nos résultats indiquent que la production d'hormones de défense, telles que le SA et le JA (résultats non illustrés), semble ne pas être altérée chez les génotypes *CML9* en réponse à *P. syringae*. Cependant, les perturbations moléculaires et cellulaires connus pour faire intervenir la signalisation SA et altérées chez les lignées *CML9* suggèrent fortement que CML9 puisse être impliqué dans une voie de signalisation dépendante du SA. Cet effet n'est peut être pas direct, mais résulte des relations croisées très complexes qui existent entre les voies de signalisation hormonales. En effet, il a été démontré auparavant au cours des travaux de Magnan (2008) que les mutants *KO cml9* présentent une plus grande sensibilité à l'ABA. L'ABA est bien connu pour exercer un rôle négatif sur les défenses post-invasives dépendantes du SA en réponse à *P. syringae* (Cao et al., 2011; Pieterse et al., 2012). En effet, en réponse à l'injection d'effecteurs et de toxines comme la coronatine par *P. syringae*, la production de JA et d'ABA augmente, ce qui a pour conséquence de diminuer les défenses dépendantes du SA du fait des relations antagonistes qui existent entre ces hormones (Pieterse et al., 2012). La plus grande sensibilité des mutants *cml9* à *Pst* DC3000 pourrait donc s'expliquer par leur plus grande sensibilité à l'ABA.

L'utilisation d'espèces non hôtes ou de souches dont le pouvoir pathogène est affecté par la mutation de certains effecteurs clefs a permis de mettre en évidence que **CML9 a un rôle versatile** au cours de l'infection par *P. syringae*. En effet, dans le cas d'un traitement flg22 ou en réponse à un mutant *Pst* DC3000 *hrcC-*, **CML9 agit comme un régulateur négatif de la résistance non-hôte en réponse à la flg22**. D'autres travaux réalisés au cours de la thèse de Leba (2011) montrent que les génotypes *CML9* présentent des perturbations de la croissance en réponse à une application exogène de flg22, ce qui renforce les données présentées ici.

A contrario, **CML9 agit comme un régulateur positif de la résistance basale** au cours de l'interaction avec une souche pleinement virulente de *Pst* DC3000. L'injection d'effecteurs impliqués dans le contournement des défenses associées à la perception des PAMPs semble donc essentielle à la fonction de CML9 en tant que régulateur positif de la défense à *Pst* DC3000.

Au cours des interactions *Arabidopsis-Pst* DC3000, la PTI est rapidement établie puis contrecarrée par l'action des effecteurs du pathogène. CML9 pourrait potentialiser la mise en place des défenses au cours de la résistance basale par un mécanisme inconnu qui limiterait l'activité inhibitrice des effecteurs sur les défenses. Peu de protéines sont décrites dans la littérature pour être des régulateurs négatifs de la PTI qui agissent comme régulateurs positifs de la résistance basale en réponse aux effecteurs du pathogène.

La protéine RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*) d'*Arabidopsis* agit aussi comme un régulateur négatif des réactions de défenses mises en place en réponse aux PAMPs avant même la sécrétion

d'effecteurs par le pathogène (Kim et al., 2005). Certains effecteurs vont interagir avec les fonctions de cette protéine afin d'augmenter la sensibilité des plantes à l'agent pathogène (Hoorn and Kamoun, 2008). Bien que ce contexte semble être profitable au pathogène, il a été démontré que la suppression de la PTI par les effecteurs va permettre de déclencher des réponses spécifiques de type ETI beaucoup plus efficaces et durables lorsque la plante possède les protéines de résistance adéquates pour contrecarrer l'effet des effecteurs. **En réponse à la souche virulente de *P. syringae*, CML9 pourrait aussi être impliqué dans une voie ciblée par des effecteurs.**

Certains facteurs de transcription de type WRKY par exemple agissent comme des suppresseurs des défenses associées à la PTI en réponse à des pathogènes bactériens. L'utilisation de suppresseurs de la PTI est une stratégie efficace développée par la plante pour pouvoir mettre en place plus rapidement l'ETI, plus forte et durable contre l'agent pathogène (Tameling and Takken, 2008). Pour cela, les protéines (R) de résistance qui conduisent à l'ETI interagissent directement avec les WRKYS et neutralisent leur activité. **L'effet «balance» exercé par CML9 sur les défenses pourrait être tributaire du recrutement de certaines protéines cibles à un moment précis au cours de l'infection par le pathogène.** Ainsi, au cours de la PTI, CML9 pourrait interagir préférentiellement avec certains partenaires qui exercent une régulation négative sur la résistance non-hôte en réponse à la flg22 et avec d'autres partenaires qui exercent une régulation positive sur les défenses recrutés spécifiquement en réponse à l'injection d'effecteurs au cours de la résistance basale.

Un *protein-chips* réalisée chez *Arabidopsis* a été élaboré afin d'identifier les protéines cibles de différentes CaM, CMLs dont CML9 (Popescu et al., 2007). Les protéines cibles déposées sur cette puce étaient majoritairement constituées de protéines de signalisation, de protéines kinases et de facteurs de transcription. Près de 113 protéines semblent interagir avec CML9. Bien qu'il faille valider la plupart de ces interactions *in planta*, certains partenaires ont été validés par co-immunoprécipitation. C'est le cas de deux facteurs de transcription TGA3 et WRKY53 qui régulent l'expression de gènes de défenses en réponse à un agent pathogène. TGA3 est connu pour interagir avec le facteur de régulation NPR1 et régule positivement l'expression du gène PR1 (Johnson et al., 2003; Zhou et al., 2000). L'analyse du comportement des mutants *tga3* et *wrky53* a montré que ces facteurs de transcription jouent respectivement un rôle positif et négatif dans la résistance à *Pst DC3000* (Kesarwani et al., 2007). WRKY53 agit comme régulateur positif de la défense à *Pst DC3000* mais comme régulateur négatif de l'expression de PR1 (Murray et al., 2007). Des tests d'activité transcriptionnelle menés par Perochon, (2010) n'ont pas permis de conclure quant à l'effet de CML9 sur l'activité de TGA3 et WRKY53. Ainsi, nous avons choisi de porter une attention plus particulière à un autre facteur de transcription PRR2, un partenaire de CML9 dont l'implication dans les réponses de défenses, et notamment dans les réponses de défense à *P. syringae* est décrite dans le **CHAPITRE II** de cette partie résultats.

CHAPITRE II: CONTRIBUTION DE PRR2 A L'IMMUNITE VEGETALE

Introduction

PRR2 fait partie des protéines associées au **système à deux composants** chez les plantes portant un motif **GARP** de liaison à l'ADN (Makino et al., 2000; Schaller et al., 2008). Ces facteurs de transcription possèdent un motif MYB de liaison à l'ADN nommé «GARP» d'après les initiales des protéines qui le portent: GOLDEN2, ARR-B et Psr1 (Wykoff et al., 1999). Il en existe une cinquantaine chez *Arabidopsis*, impliqués dans différents processus physiologiques. Parmi les mieux décrits, certains jouent un rôle au cours du développement, comme la protéine GOLDEN 2 du Maïs qui participe à la différenciation des cellules foliaires (Hall et al., 1998) et les GLKs (*Golden-like*) d'*Arabidopsis* à la biogénèse du chloroplaste (Waters et al., 2008; Waters et al., 2009). D'autres membres de cette famille sont impliqués dans les réponses à des signaux ou à des stress comme PCL1 (*PHYTOCLOCK 1*) qui régule le rythme circadien (Onai and Ishiura, 2005) et Psr1 et PHR1 qui sont impliqués dans la carence en phosphate chez *Chlamydomonas* et *Arabidopsis* respectivement (Wykoff et al., 1999 ; Rubio et al., 2001). Les ARR-B (*Authentic Response Regulator*) s'intègrent dans des systèmes de phosphorelais et permettent la transduction de signaux (Imamura et al., 1999).

Bien que ces facteurs de transcription soient peu connus pour leur contribution dans les réponses aux pathogènes, certains éléments dans la littérature indiquent que le régulateur de réponse ARR2 et les GLKs, pourraient jouer un rôle dans les réponses de défense aux pathogènes. En effet, des travaux ont révélé qu'ARR2 contribue spécifiquement à la résistance à *P. syringae* en réponse à un traitement par des cytokinines. Il a été démontré qu'ARR2 est capable de lier le facteur de transcription TGA3 et qu'une mutation des *cis* éléments de *PR1* reconnus par TGA3, abolit l'activation de *PR1* ARR2 dépendante (Choi et al., 2010). D'autres études ont démontré que la surexpression de *GLK1* confère la résistance à *Fusarium graminearum* et entraîne l'altération de l'expression de gènes de défense en réponse à cet agent pathogène (Savitch et al., 2007).

Contrairement aux autres membres du système à deux composants, **rien n'était décrit dans la littérature au début de ma thèse sur les fonctions biochimiques et biologiques de PRR2** et les travaux réalisés sur PRR2 dans le cadre de cette thèse illustrent pour la première fois l'implication d'un régulateur de réponse atypique dans les réponses des plantes à des agents pathogènes.

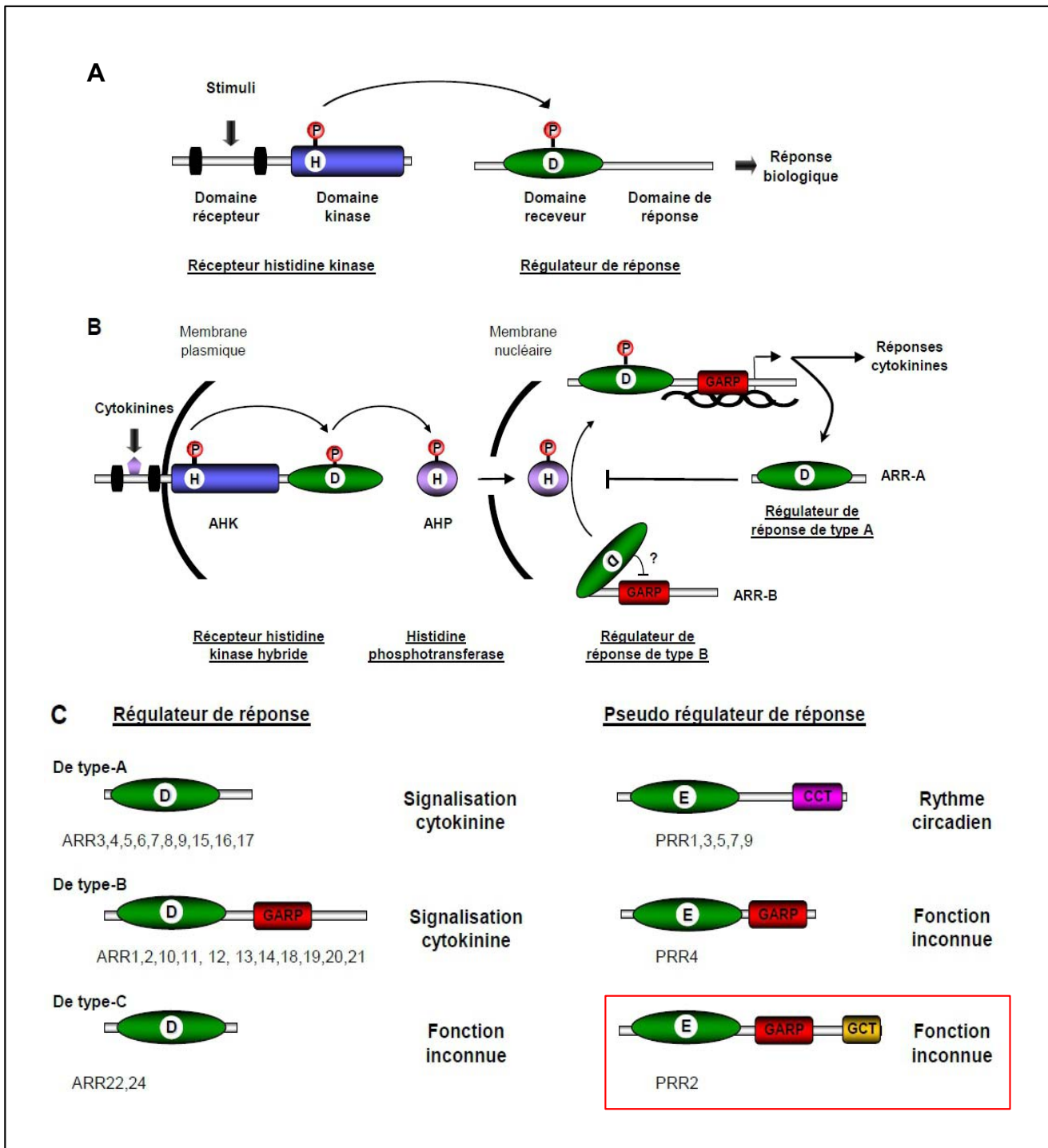


Figure II.1: Schéma du système à deux composants

(A) Système à deux composants employant un récepteur histidine kinase et un régulateur de réponse. Le domaine kinase (en bleu) porte le résidu histidine (H) qui s'autophosphoryle et transfère son phosphate sur le résidu acide aspartique (D) du domaine receveur (en vert) du régulateur de réponse. **(B) Système de phosphorelay à plusieurs étapes représenté par celui employé par *Arabidopsis* dans la signalisation cytokininique.** Les récepteurs des cytokinines (AHK), les histidines phosphotransférase (AHP), des régulateurs de réponse de type A (ARR-A) et B (ARR-B), impliqués dans la transduction du signal cytokininique sont représentés. **(C) Représentation schématique des domaines protéiques présents dans les éléments du système à deux composants chez *A. thaliana*.** En vert est représenté le domaine receveur où l'acide aspartique (D) conservé chez les authentiques régulateurs de réponse (ARR) est remplacé par un acide glutamique (E) chez les pseudo régulateurs de réponse (PRR). Les autres domaines sont représentés, en rouge le domaine de liaison à l'ADN de type GARP, en violet la boîte CCT et en or la boîte GCT.

I_PRR2, un facteur de transcription de type GARP impliqué dans les réponses aux pathogènes?

Le système à deux composants chez les plantes

Le **système à deux composants**, appelé aussi « *histidine-to-aspartate phosphorelay* » est un **mécanisme conservé de transduction du signal** impliqué dans une grande variété de réponses cellulaires liées à la perception de stimuli environnementaux et endogènes (Stock et al., 2000). Chez les procaryotes et chez certains eucaryotes dont les champignons et les plantes supérieures, ce système est **constitué par un récepteur histidine kinase (HK)** qui perçoit le signal d'entrée **et par un régulateur de réponse (ARR)** qui va le traduire en réponse biologique. Sous l'effet d'un stimulus, le récepteur HK s'autophosphoryle sur un résidu histidine (H), ce groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate (D) au niveau du domaine receveur de l'ARR (**Figure II.1.A**). Le régulateur de réponse activé par phosphorylation régule, *via* son domaine de réponse, différents processus cellulaires. **Ce mécanisme simple et direct** assure ainsi un couplage entre le stimulus et la réponse, qui dans la majeure partie des cas, **aboutit à la régulation de l'expression génique** (Gao and Stock, 2009). Comme décrit dans la signalisation cytokinine chez les plantes, une forme plus sophistiquée est retrouvée chez les eucaryotes avec un système de phosphorelais à plusieurs étapes (**Figure II.1.B**). En effet, les études génétiques et biochimiques montrent que la voie de signalisation cytokinine est un circuit de régulation positif qui requiert des récepteurs hybrides histidine kinases (AHK), des protéines Histidine phosphotransferase (AHP) et des régulateurs de réponse de type A et B (ARR-A, ARR-B) (Mizuno and Nakamichi, 2005; Müller and Sheen, 2007; Schaller et al., 2008). Les trois récepteurs des cytokinines (AHK2, AHK3, AHK4/CRE1) perçoivent le signal en liant directement les cytokinines. Une fois activés, ces récepteurs phosphorylent les protéines AHPs localisées dans le cytoplasme, qui vont alors migrer vers le noyau pour transmettre leurs phosphates aux régulateurs de réponse de type B. Ainsi, ces formes phosphorylées activeront une grande variété de gènes de réponse aux cytokinines. Parmi ces gènes, ceux codant des régulateurs de réponse de type A sont induits pour intervenir dans une boucle de rétrocontrôle négative dans cette voie de signalisation.

On distingue différents types de régulateurs de réponse chez les plantes. **Chez *A. thaliana*, on dénombre 23 ARR** qui se classent en **trois groupes (type A, B et C)**, basés sur les données de phylogénie et des données fonctionnelles (**Figure II.1.C**). Les ARR de type-A, sont des protéines qui possèdent un domaine receveur avec une petite extension C-terminale impliqués essentiellement dans la régulation de la signalisation cytokinine (Ren et al., 2009). Les ARR de type-B se caractérisent par l'addition d'une longue extension en C-terminal du domaine receveur, portant un domaine de liaison à l'ADN de type GARP qui agissent comme des facteurs de transcription dans la signalisation cytokinine (Ishida et al., 2008). Les ARR de type C, ARR22 et 24 se distinguent des autres ARR au niveau phylogénétique mais leur rôle dans la physiologie de la plante reste à préciser (Schaller et al., 2008).

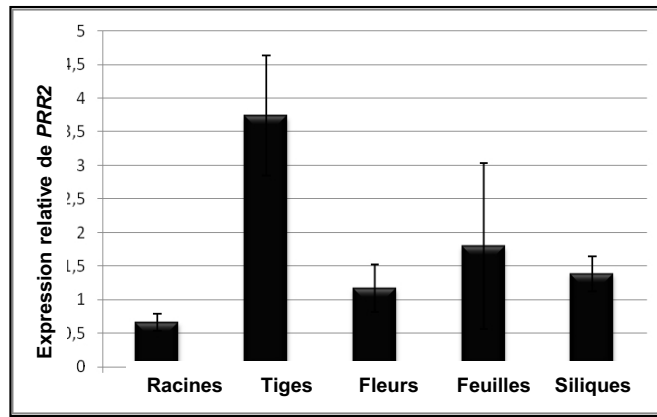


Figure II.2: Analyse du profil d'expression de *PRR2* dans différents organes de plantes adultes d' *A. thaliana*.

Analyse en RT-qPCR de l'expression de *PRR2* chez des plantes de 4 semaines d' *A. thaliana*. Le gène de l'actine est utilisé comme contrôle. Les résultats présentent le ratio d'induction du gène *PRR2* par rapport à l'actine. Les résultats ont été obtenus à partir d'une moyenne de 3 réplicats indépendants. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne.

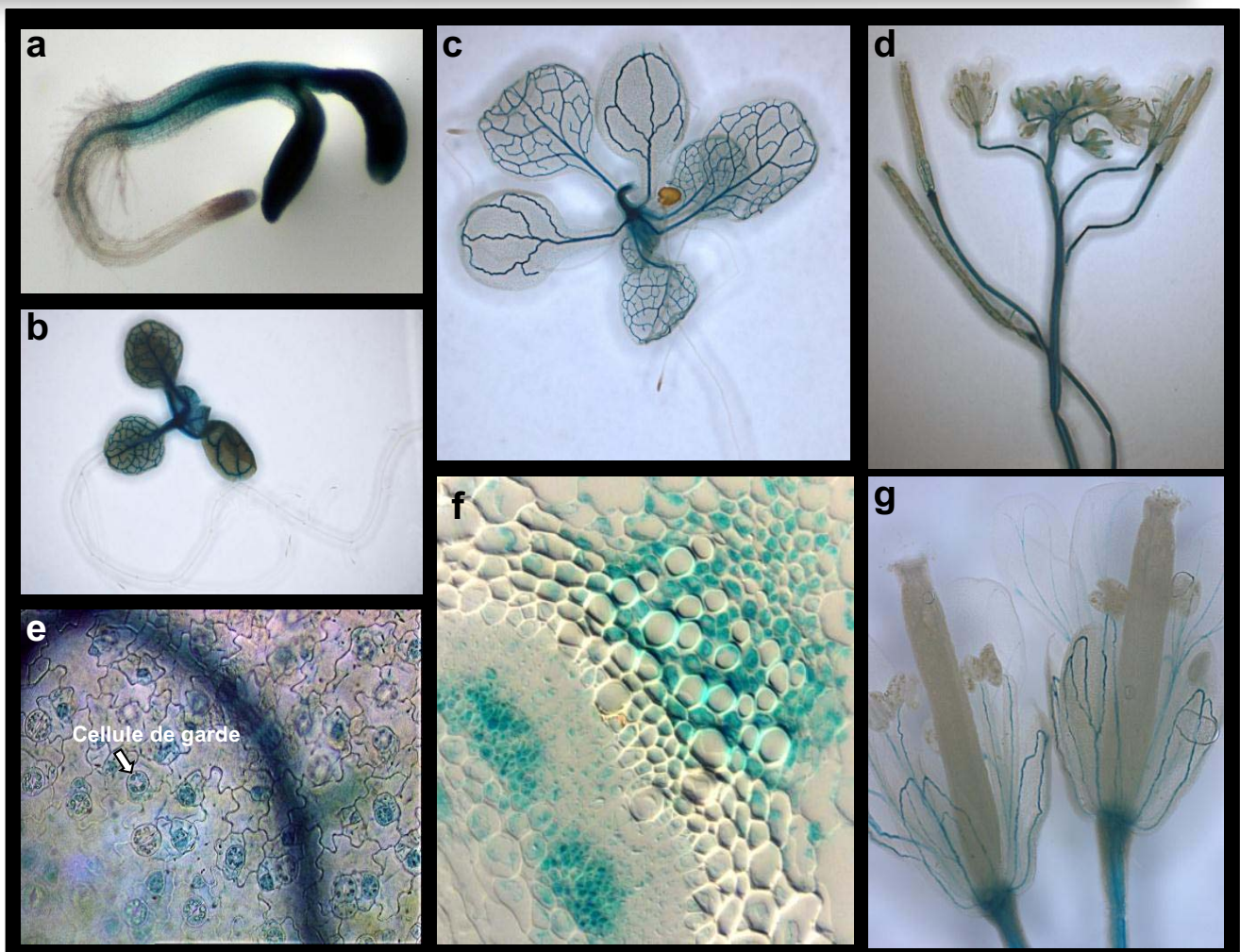


Figure II.3: Localisation spatiale de l'expression de *PRR2* dans différents organes de plantes adultes d' *A. thaliana*.

Détection histochimique de l'activité *gus* chez des plantes transgéniques (*promPRR2::uidA*) d' *Arabidopsis*.

Observation de (a) plantule de 2-3 jours (b) plantules de 6 jours (c) plantules de 10 jours (d) bouquet floral (e) stomates à la surface foliaire (f) coupe transversale de hampe florale et (g) fleurs.

Les plantes possèdent aussi des éléments du système à deux composants divergents qui n'ont plus la fonction de phosphorelais, car ils ont perdu un ou plusieurs résidus importants pour la phosphorylation (Figure II.1.C). On retrouve dans ces protéines des histidines kinases divergentes avec le récepteur à l'éthylène ETR2, et certains phytochromes dont PHYB, des protéines AHP divergentes, mais aussi des **régulateurs de réponse atypiques ou Pseudo-response regulators (PRRs)**. Ces derniers se caractérisent par la substitution du résidu aspartique (D) invariable du domaine receveur par un acide glutamique (E), empêchant d'accepter le transfert du groupement phosphate d'une protéine AHP (Makino et al., 2000). Contrairement aux régulateurs de réponse, les **PRRs pourraient être régulés par un autre mécanisme de contrôle, encore inconnu, que l'activation phospho-dépendante du domaine receveur**. Ces PRRs se divisent en deux sous-groupes, en fonction des domaines présents dans leur partie C terminale. **Le premier groupe est formé par les PRRs, qui possèdent un domaine basique conservé de la famille des protéines CONSTANS** (CCT abréviation représentant les protéines CONSTANS, impliqués dans la régulation du rythme circadien (Makino et al., 2000; Nakamichi et al., 2005). **Le deuxième groupe de PRRs est formé par PRR2 et PRR4 qui possèdent un domaine GARP de liaison à l'ADN.**

PRR2 et PRR4 se distinguent structurellement par leur partie C-terminale par la présence d'une **boîte GCT** au delà du domaine GARP, retrouvée dans les protéines de type GOLDEN et qui aurait pour fonction l'homodimerisation et l'hétérodimerisation des GLKs (Rossini et al., 2001). (Figure II.1.C). À côté de ces domaines, on trouve aussi dans la partie C-terminale une **région riche en proline** décrite dans la littérature pour leur implication dans l'activité transcriptionnelle ou dans les interactions protéines-protéines. La recherche d'homologie avec les séquences protéiques présentes dans les banques de données a révélé que **PRR2 est une protéine spécifique au règne végétal**, possédant de **nombreux homologues** uniquement dans différentes espèces de plantes **exclusivement de type dicotylédone**.

Jusqu'à maintenant, la fonction biologique de PRR2 n'était pas connue. Des travaux très récents chez la tomate ont démontré que PRR2 joue un rôle au cours de la maturation du fruit (Pan, 2013). Bien que la présence du domaine GARP de liaison à l'ADN suppose fortement que PRR2 puisse exercer une fonction de facteur de transcription, les fonctions biochimiques de PRR2 ne sont cependant pas encore connues. Afin de mieux comprendre le rôle de PRR2 dans la physiologie de la plante, nous avons commencé par réaliser le profil d'expression détaillé du gène *PRR2* au cours du développement et en réponse à des stress divers puis par des approches génétiques nous avons évalué le rôle de PRR2 au cours du développement et de différents types de stress.

1. Analyse du profil d'expression du gène *PRR2* au cours du développement et en réponse à des stress

1.1 Régulation du gène *PRR2* au cours du développement

Afin d'examiner l'expression du gène *PRR2* au cours du développement, nous avons dans un premier temps réalisé une analyse RT-qPCR globale à partir de différents organes de plantes d'*Arabidopsis* (Figure II.2). Les résultats de cette analyse indiquent que ***PRR2* apparaît exprimé au**

Infiltrating *Pseudomonas syringae*

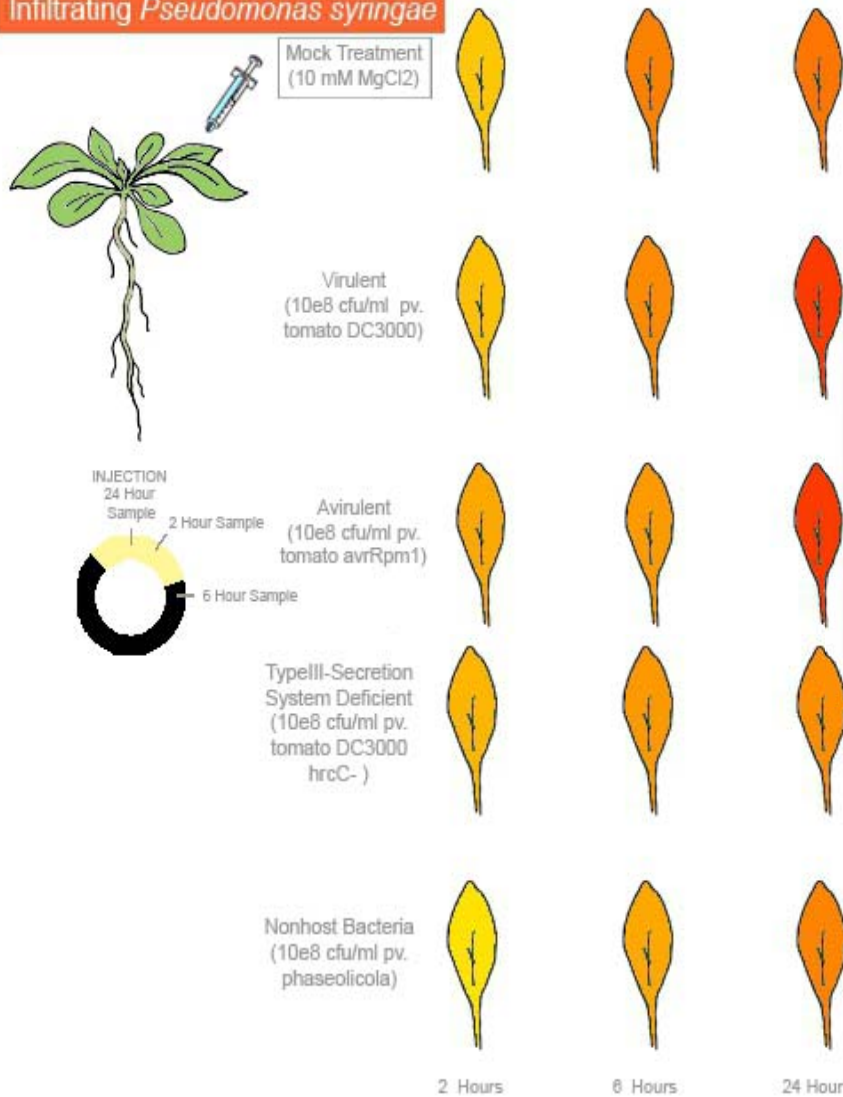


Figure II.4: Analyse du profil d'expression de *PRR2* chez *A. thaliana* en réponse à différentes souches de *P. syringae*.

Illustration d'après eFP Browser
(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>),

expression



point cinétique	traitement	expression
0 h	non traité	28,43
2 h	MgCl2	18,13
6 h	MgCl2	27,03
24 h	MgCl2	28,64
2 h	<i>Pst</i> DC3000	19,30
6 h	<i>Pst</i> DC3000	25,57
24 h	<i>Pst</i> DC3000	49,76
2 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> avrRpm1	22,57
6 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> avrRpm1	28,22
24 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> avrRpm1	39,30
2 h	<i>Pst</i> DC3000 hrcC-	19,80
6 h	<i>Pst</i> DC3000 hrcC-	24,77
24 h	<i>Pst</i> DC3000 hrcC-	25,25
2 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	15,70
6 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	22,17
24 h	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	26,40

Tableau I.2: Analyse du profil d'expression de *PRR2* chez *A. thaliana* en réponse à différentes souches de *P. syringae*.

Illustration d'après les données de Genevestigator, En vert: répression du gène, en noir: pas d'induction du gène, en rouge: induction du gène

expression



CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

niveau des tiges, et au niveau des autres organes aériens de la plante comme les feuilles, les fleurs et les siliques. L'expression de *PRR2* n'est quasiment pas détectée au niveau des racines.

Dans un deuxième temps, une analyse plus fine du profil d'expression de lignées transgéniques d'*Arabidopsis*, portant la région de 1.5kb en amont de la séquence codante du gène *PRR2* en fusion avec le gène rapporteur GUS, *promPRR2::uidA*, a été réalisée (Figure II.3). Après germination, dès l'apparition des cotylédons, *PRR2* est **exprimé dans tous les tissus végétatifs aériens** (cotylédons, hypocotyle) **mais n'est quasiment pas détecté dans les parties racinaires** (Figure II.3.a). Chez de jeunes plantules entre 3-10 jours (Figure II.3.b, c et d) et chez des plantes adultes (non illustré), l'expression de *PRR2* se maintient dans les organes aériens, localisée **au niveau du système vasculaire et des stomates**. Chez des plantes en fleurs, *PRR2* est transcrit **au niveau des tiges** (Figure II.3.e) et **au niveau des tissus conducteurs des pétales des fleurs** (Figure II.3.f). Des coupes réalisées au niveau des hampes florales ont permis de localiser plus précisément l'expression de *PRR2* **au niveau des cellules du phloème et des cellules compagnes ainsi qu'au niveau des cellules du parenchyme du xylème** (Figure II.3.g).

En conclusion, à différents stades de développement, l'expression de *PRR2* est localisée au niveau des tissus aériens et plus particulièrement au niveau de structures spécialisées comme les stomates et au niveau des tissus conducteurs. Les stomates sont des structures impliquées au cours de différents stress abiotiques et biotiques puisqu'elles permettent de réguler le flux hydrique et constituent le point d'entrée de nombreux pathogènes. De même, le système vasculaire permet le transport de métabolites en conditions de stress. Les tissus vasculaires sont par ailleurs souvent utilisés comme moyen de transport par de nombreux pathogènes pour infecter la plante hôte. Nous avons donc recherché si *PRR2* est induit en conditions de stress biotiques.

1.2 L'expression du gène *PRR2* est finement régulée au cours du stress biotique

La base de données eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), utilisant les données de Schmid *et al*, 2005, permet de visualiser le profil d'expression *in silico* d'un gène dans les différents organes de la plante au cours du développement et en réponse à différents types de stress.

L'analyse des données d'expression globales ont également permis de dresser le profil d'expression de *PRR2* en réponse aux pathogènes. La base de données EFP Browser permet de visualiser le profil d'expression *in silico* en réponse à un grand nombre de pathogènes biotrophes/nécrotrophes, bactériens/fongiques et à certains insectes. Il apparaît que **l'expression du gène *PRR2* est fortement induite en réponse au puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*)**, un aphide responsable de la transmission de nombreux virus et dont l'action provoque généralement le flétrissement des feuilles et une nécrose des tissus. Le gène *PRR2* est également induit **en réponse à des pathogènes biotrophes comme le champignon *Golovinomyces orontii***, responsable du «powdery mildew» chez des espèces dicotylédones. **Bien que ces données d'expression soient incomplètes et nécessitent d'être validées, elles suggèrent que l'expression de *PRR2* est induite en réponse à différents types de pathogènes.**

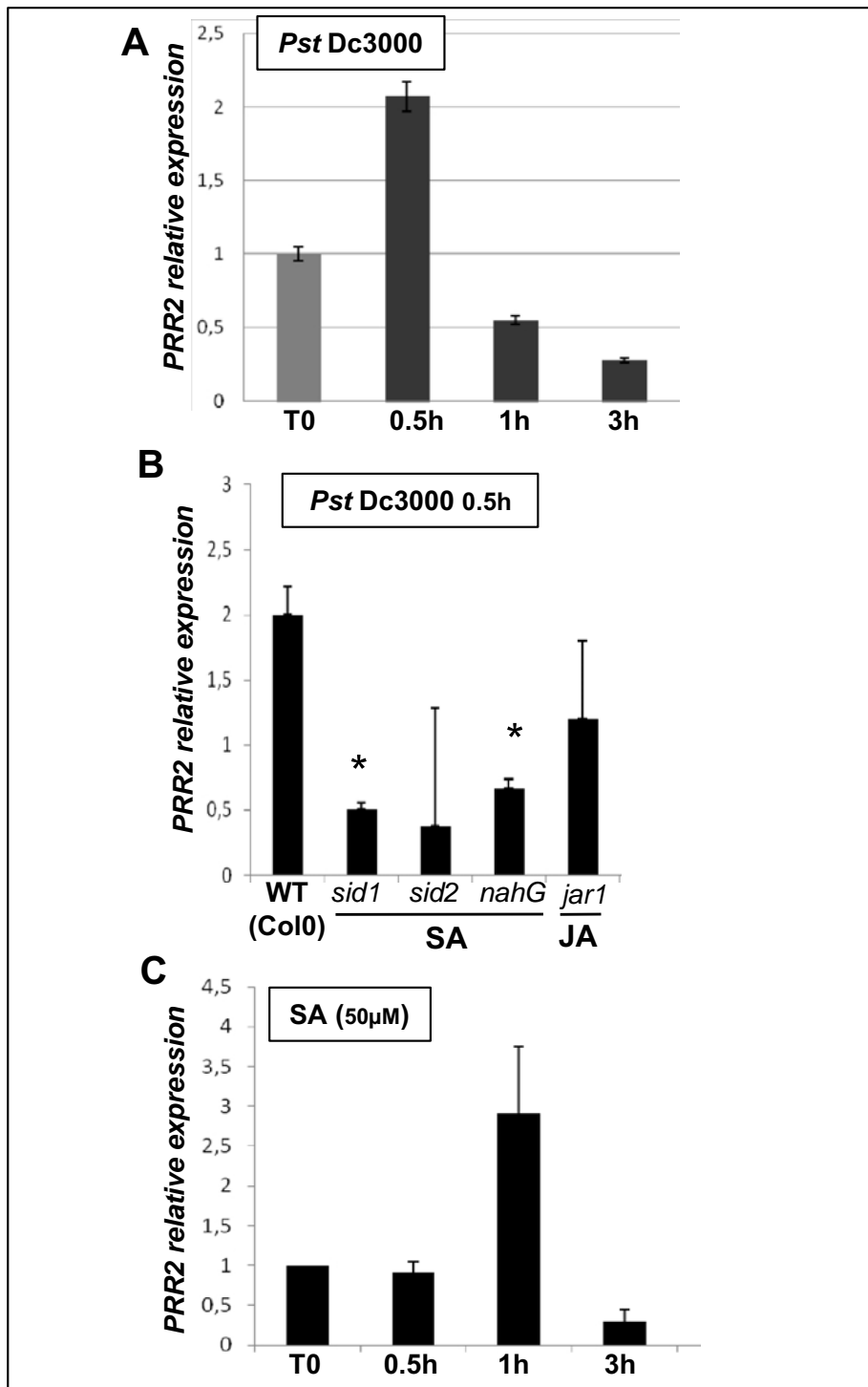


Figure II.5: Profil d'expression du gène *PRR2* en réponse au pathogène *P. syringae* et en réponse à l'application, exogène d'acide salicylique chez des plantes d' *A. thaliana*.

- A. Feuilles de 4 semaines de plantes d'écotype Col inoculées avec *Pst DC3000* à 10^7 cfu mL⁻¹. Les échantillons sont collectés à 0, 0.5, 1 et 3h post-infection et l'expression du gène *PRR2* est analysée par qRT-PCR.
- B. Expression du gène *PRR2* après infection par *Pst DC3000* chez des mutants de la voie SA (*sid1* et *sid2*) et JA (*jar1*). Les étoiles au-dessus des histogrammes (test de Tukey, p -value<0.05) indiquent des changements significatifs dans l'expression du gène *PRR2* dans ces fonds génétiques par rapport au Wt.
- C. Cinétique de l'expression du gène *PRR2* en réponse à une application exogène de SA (50µM). Tous les résultats illustrés représentent les ratios d'expression du gène par rapport à la condition témoin. Les résultats illustrent la moyenne de 3 réplicats biologiques indépendants, les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne. La quantification de l'expression a été effectuée par qRT-PCR et calculée d'après la méthode comparative des $2^{-\Delta\Delta CT}$ en utilisant le gène *actine8* comme référence.

1.3 Le gène *PRR2* est induit dans une voie de signalisation dépendante du SA en réponse à *Pst* DC3000

Etant donné que CML9 est un régulateur de la mise en place des réponses de défense à *P. syringae* (Partie résultats, Chapitre 1) nous avons examiné avec attention le profil d'expression de *PRR2* en réponse à ce pathogène. D'après les bases de données, l'expression de ce gène est également plus importante après infection par *P. syringae* (Figure II.4 et tableau I.2). En effet, le gène *PRR2* apparaît induit 24h après inoculation par une souche virulente de *P. syringae*, *Pst* DC3000 et par une souche avirulente de ce même agent pathogène, *Pst* AvrRPM1. Par contre, le gène *PRR2* n'apparaît pas induit en réponse à une souche non-hôte (*P. syringae* pv *phaseolicola*) ou en réponse à une souche altérée dans le système de sécrétion de type III (*Pst* DC3000 hrc-). Bien que ces données d'expression soient incomplètes et nécessitent d'être validées, elles suggèrent que l'expression de *PRR2* est induite en réponse à différents types de pathogènes et que, dans le cas de *P. syringae*, cette expression serait dépendante de l'injection d'effecteurs par l'agent pathogène.

Comme ces données nécessitent d'être validées, nous avons réalisé le profil d'expression détaillé de *PRR2* en réponse à *P. syringae* par RT-qPCR entre 0 et 3h post-infection (figure II.5.A). Dans nos conditions d'infection, ***PRR2* est exprimé de manière modérée mais significative, 30 min après infection par *Pst* DC3000.** Cette induction est transitoire et revient à un niveau basal entre 1h et 3h après infection. Etant donné que *PRR2* est exprimé de manière assez précoce en réponse à *Pst* DC3000 nous avons recherché si ce gène est aussi induit en réponse à la flg22, PAMP majeur de *Pst* DC3000 impliqués dans les réponses au pathogène. L'application de flg22 à 1µM sur des plantules d'*Arabidopsis* et la quantification de l'expression de *PRR2* entre 0 et 3h post-traitement n'a pas permis de mettre en évidence d'induction de *PRR2* (données non illustrées). **L'induction de *PRR2* en réponse à *Pst* DC3000 semble donc être indépendante de la flg22 aux temps examinés.**

Il est bien établi que le SA et le JA contribuent à la coordination des réactions de défense en réponse à *P. syringae*. Afin de mettre en évidence si le gène *PRR2* est régulé par ces composés hormonaux, le niveau d'expression de ce gène a été analysé chez des plantes sauvages dites «*Wild-type, Wt*» d'écotype *Columbia* ainsi que chez des mutants altérés dans les voies SA (*nahg*, *sid1*, *sid2*), JA (*jar1*) après infection par *Pst* DC3000 (figure II.5.B). Le niveau d'expression de *PRR2* n'est pas altéré chez le mutant *jar1* par rapport au Wt ce qui indique que **l'expression de *PRR2* n'est pas dépendante des voies de signalisation impliquant le JA.** Au contraire, chez les mutants de la voie SA *nahg* et *sid1*, l'expression de *PRR2* est significativement réduite par rapport au Wt, ce qui signifie que **l'expression de *PRR2* est modulée par la voie SA au cours de l'interaction entre *Pst* DC3000 et *Arabidopsis*.** Etant donné que l'expression de *PRR2* semble dépendante de la voie SA en réponse à *Pst* DC3000, nous avons examiné si l'expression de *PRR2* est altérée en réponse à un traitement par cette hormone (figure II.5.C). ***PRR2* est induit transitoirement 1h après traitement par le SA (50µM), alors qu'aucune expression du gène n'est observée en réponse à un traitement par le MeJA** (données non illustrées). Ces dernières données renforcent l'hypothèse que l'induction de *PRR2* peut être dépendante du SA dans la réponse à *P. syringae*.

En conclusion, l'expression de *PRR2* est finement régulée au cours de différents stress biotiques. Etant donné que CML9 est un régulateur de la mise en place des réponses de défense à *P.*

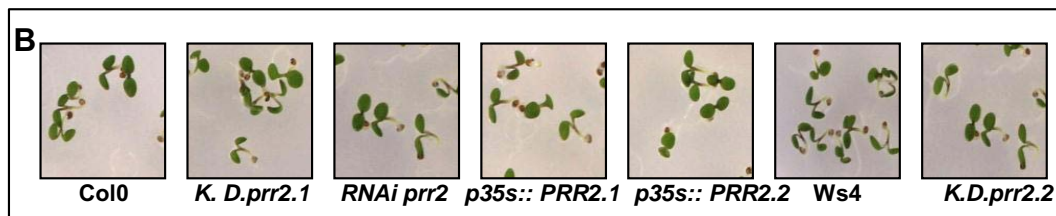
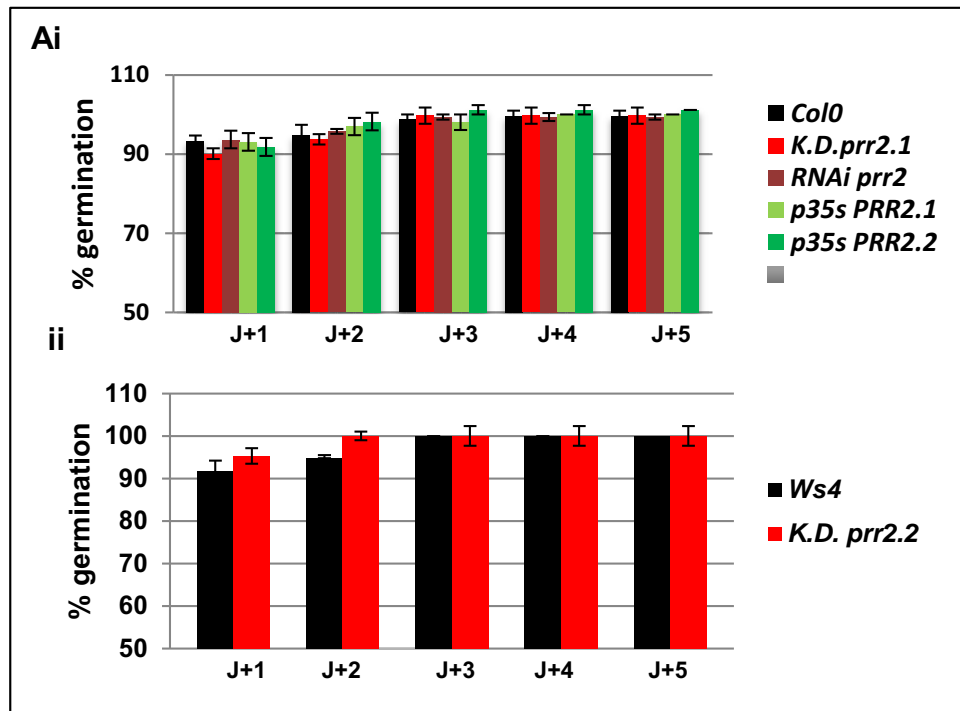


Figure II.6: Croissance et développement des lignées PRR2 en conditions standard de culture

A. Quantification de la capacité de germination sur milieu MS des différentes lignées *PRR2*. Les graines sont semées sur MS après imbibition puis placées à 4°C pendant 48h avant d'être transférées en salle de culture (conditions jours longs, 16h de lumière, 8h d'obscurité). Un comptage des graines germées (émergence de la radicule) est réalisé tous les jours pendant 5 jours. Les résultats ont été obtenus à partir d'une moyenne de 4 réplicats. Les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne (SEM) de ces 4 réplicats.

B. Observation de la croissance de plantules des différentes lignées *PRR2* de 4 jours cultivées sur MS. Dans ces conditions standard de culture *in vitro*, aucune différence n'est observée entre les différentes lignées.

C. Comparaison de la croissance et du développement de plantes adultes de 4 semaines des différentes lignées *PRR2* en conditions standard de culture (jours courts 8h de lumière, 16h d'obscurité). Aucune différence n'est observée concernant le nombre de feuilles et la taille des plantes à ce stade de développement.

syringae (Partie résultats, CHAPITRE 1), nous avons évalué par une approche génétique, la contribution de PRR2 au cours du développement, contribution pour laquelle nous n'avons pas de données chez *Arabidopsis*, puis son implication dans les réponses de défenses à différents pathogènes bactériens et plus particulièrement à *P. syringae*.

2. Implication de PRR2 au cours du développement et en réponse au stress biotique

2.1 Outils génétiques utilisés

Pour pouvoir étudier la fonction biologique de PRR2, nous avons utilisé différentes lignées d'*Arabidopsis* portant une insertion d'ADN-T dans le promoteur de PRR2 (K.D. *prp2.1* (écotype *Columbia*, Col0) et K.D. *prp2.2* (écotype *Wassilevskiya*, WS4) et une lignée RNAi (*RNAi prp2*) qui conduisent à une réduction du niveau d'expression de PRR2 (voir matériel et méthodes). Il faut noter qu'aucun mutant *knock-out* pour le gène PRR2 n'a pu être obtenu auprès des banques de mutants d'*Arabidopsis*, ce qui nous laisse supposer que ce gène exercerait une fonction essentielle au développement et/ou métabolisme de la plante et que son absence pourrait être létale. Nous avons aussi utilisé des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* (Col0) qui expriment la séquence codante de PRR2 sous le contrôle d'un promoteur 35S (*p35S::cdsPRR2-HA*). Deux lignées transgéniques indépendantes (*p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2*) qui présentent une expression constitutive du transgène vérifiées par l'accumulation de la protéine de fusion PRR2-HA ont été choisies (voir matériel et méthodes).

2.2 Croissance et développement des lignées PRR2

La croissance et le développement des lignées PRR2 a été suivi tout au long de leur cycle.

Les capacités de germination des graines des différents génotypes ont été mesurées en conditions standard de germination (figure II.6.A). **Aucune différence significative n'a pu être observée en terme de capacité ou de cinétique de germination** entre les lignées PRR2 et le Wt aussi bien dans l'écotype *Columbia* (figure II.6.Ai) que dans l'écotype *Wassilevskiya* (figure II.6.Aii).

Concernant le développement végétatif, nous avons suivi la croissance et le développement de plantules en culture *in vitro* (figure II.6.B) et de plantes adultes (figure II.6.C). Aucune différence significative n'a pu être observée entre les lignées PRR2 en terme de cinétique de croissance ou de taille, ce qui suggère que l'altération de l'expression de PRR2 n'a pas d'effet sur la morphogénèse au niveau macroscopique **tout au long du cycle de développement végétatif**.

Le passage du stade végétatif au stade reproducteur (apparition de la hampe florale, mise à fleur, efficacité de floraison et de fructification), a aussi été examiné en détail. Des différences claires ont été observées en terme d'apparition de la hampe florale entre les lignées PRR2 (figure II.7.A). En effet, les lignées mutantes (K.D.*prp2.1*, K.D. *prp2.2*) et *RNAi prp2* développent des hampe florales beaucoup plus précocement par rapport aux plantes WT (Col0 et Ws4). La précocité de floraison est bien marquée chez le K.D. *prp2.2* par rapport au Wt Ws4 (figure II.7.A). Ce développement est au contraire très tardif chez les lignées *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* (figure II.7.A). Le comptage du nombre de feuilles après apparition de la hampe florale est une méthode qui permet d'évaluer la cinétique de floraison. Plus le nombre de feuilles est important, plus la cinétique de floraison est

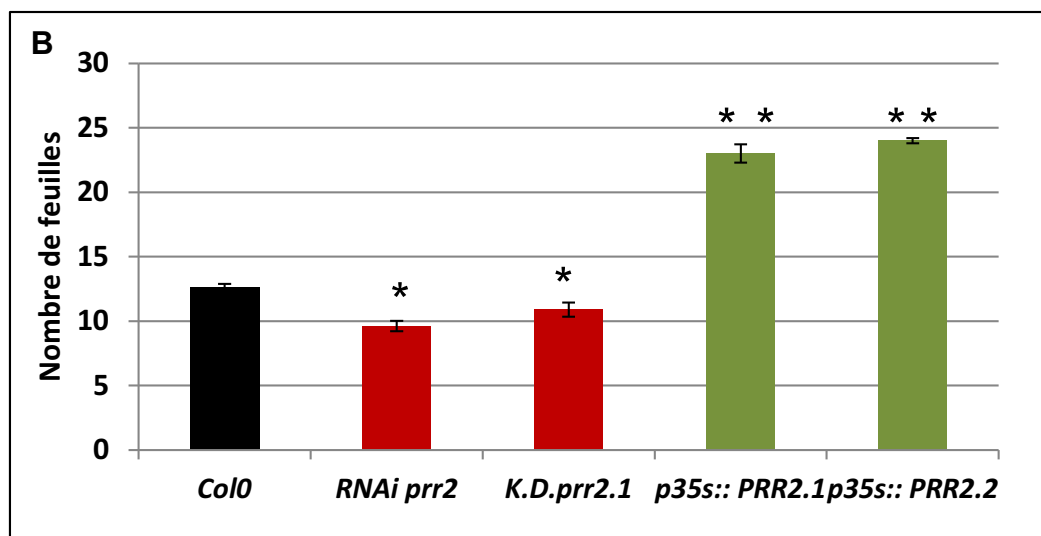
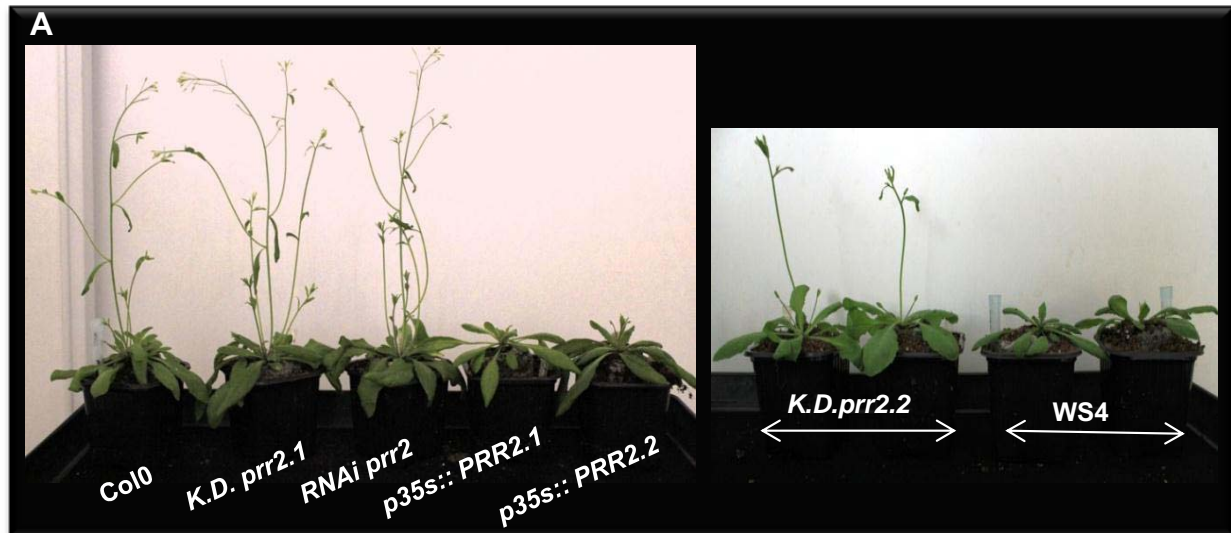


Figure II.7: Observation et évaluation de la cinétique de floraison des lignées PRR2 en jours longs.

A. Observation du développement de la hampe florale de plantes d'*Arabidopsis* de 4 semaines d'écotype *Columbia* et de 3 semaines d'écotype *Wassilevskiya* mises en culture en jours longs (photopériode :16h jours/8h nuit). Les clichés sont représentatifs d'au moins 3 réplicats biologiques indépendants ($n>25$).

B. Cinétique d'apparition de la hampe florale de plantes d'*Arabidopsis* d'écotype *Columbia* cultivées en jours longs. Le « délai de floraison » est exprimé comme le nombre de feuilles produites avant l'apparition de la première fleur quand la taille de la hampe florale ≥ 10 cm. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne de 3 réplicats biologiques indépendants (\pm SE; $n>25$). Les étoiles au-dessus des histogrammes indiquent des différences significatives par rapport à l'écotype Wt (test de Tukey, * p -value <0.05 , ** p -value <0.01).

retardée. Après comptage, le nombre de feuilles à l'apparition de la hampe florale est plus faible chez le *K.D.prr2.1* et le *RNAi prr2* alors qu'il est supérieur chez les lignées surexprimant *PRR2* (figure II.7.B). **PRR2 semble donc être un régulateur du passage de l'état végétatif à l'état reproducteur.** L'efficacité de reproduction, estimée par le rendement grainier, reste cependant tout à fait comparable entre les génotypes *PRR2* (données non illustrées).

2.3 Contribution de PRR2 à la résistance aux pathogènes

Au cours de ma thèse, j'ai eu la possibilité d'évaluer par des tests préliminaires le comportement des génotypes *PRR2* en réponse à différents agents pathogènes bactériens disponibles au laboratoire: le pathogène vasculaire *Xanthomonas campestris* et la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum* et la bactérie *Pseudomonas syringae*.

2.3.1 Comportement des génotypes PRR2 lors d'une inoculation racinaire par la bactérie *Ralstonia solanacearum*

La bactérie *Ralstonia solanacearum* est l'agent responsable du flétrissement bactérien des solanacées et est par exemple impliquée dans la maladie de moko du bananier. Cette bactérie est capable de provoquer la maladie sur une large gamme d'hôte dont *Arabidopsis thaliana* (Deslandes et al., 1998). En condition de laboratoire, pour réaliser des infections homogènes, des plantes âgées de 4 à 5 semaines sont inoculées en blessant le système racinaire et en le trempant dans une solution bactérienne à la concentration de 10^7 cfu/mL. Dans ces conditions, *R. solanacearum* peut coloniser le système vasculaire des plantes hôtes, s'y développer et provoquer le flétrissement de la plante. L'état plus ou moins avancé de ce flétrissement constitue chez *Arabidopsis thaliana* un élément permettant d'évaluer l'avancée de la maladie et un index de notation, allant de 0 à 4, a été mis en place (Deslandes et al., 1998). Cette échelle contient 5 niveaux, le zéro étant l'absence totale de symptômes et l'indice 4 constitue l'état de flétrissement total des plantes (Figure II.8.A). L'analyse du comportement des lignées *PRR2* à cet agent pathogène a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Y. Marco du laboratoire LIPM, en utilisant la souche GMI1000 de *R. solanacearum* capable d'infecter l'écotype Col d'*Arabidopsis thaliana*. Les résultats de ces expérimentations (2 répétitions biologiques sur 16 plantes/génotype) montrent que l'apparition des symptômes de flétrissement est homogène et débute 4 jours après l'infection et, aucune différence n'est observée dans le comportement des différents génotypes *PRR2* (Figure II.8.B). 5 jours après inoculation une augmentation nette des symptômes (index 3) apparaît et ce de façon similaire entre les génotypes. 6 à 7 jours après l'infection l'index maximal de la maladie (3.5) est observé, mais aucune différence majeure dans le comportement des différents génotypes n'est mise en évidence. Ces résultats nous indiquent que **PRR2 n'est pas impliqué dans les réponses de défense à l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum*.**

A

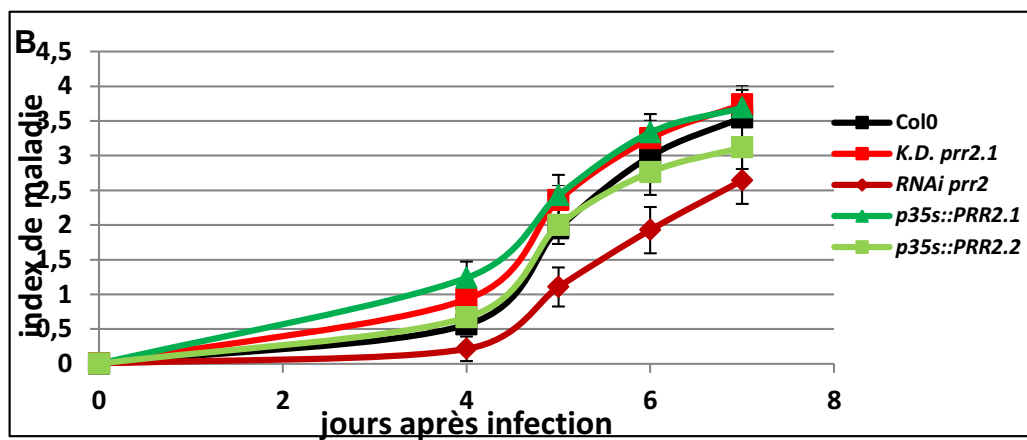


Figure II.8: Sensibilité des lignées *PRR2* à la bactérie *Ralstonia solanacearum*.

A. Echelle de notation utilisée pour la quantification de l'évolution de la maladie causée par la bactérie *Ralstonia solanacearum* chez *Arabidopsis thaliana*.

B. Quantification de l'évolution de la maladie chez des plantes âgées de 4 semaines des lignées *PRR2* après infection par la souche GMI1000 de la bactérie *Ralstonia solanacearum* (10^7 cfu/ml). 16 plantes sont utilisées par génotype pour réaliser la notation. Deux répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées et des résultats similaires ont été observés. Les barres d'erreurs représentent les SEM (erreur standard à la moyenne).

2.3.2 Comportement des géotypes PRR2 lors d'une inoculation foliaire par le pathogène *Xanthomonas campestris pv campestris*

Des tests ont été réalisés en réponse à un autre pathogène hémibiotrophe *Xanthomonas campestris pv campestris* en collaboration avec E. Lauber du Laboratoire LIPM. *Xanthomonas campestris pv campestris* est un pathogène qui pénètre au niveau des parties aériennes via les hydathodes et les blessures puis se multiplie au niveau vasculaire (Feng et al., 2012). L'expression de PRR2 au niveau des hydathodes et au niveau vasculaire a motivé le choix de l'étude de l'effet de ce pathogène sur les lignées PRR2. Dans un premier temps, une notation des symptômes a été effectuée après infection par le pathogène. Deux souches de *Xanthomonas campestris pv campestris* ont été utilisées: la souche sauvage (Wt) avirulente qui ne provoque pas de symptôme de maladie et la souche mutée pour l'effecteur XopAC ($\Delta xopAC$) qui provoque des symptômes de chlorose et de nécrose chez les plantes hôtes. Pour évaluer l'avancée de la maladie, une notation des symptômes est réalisée sur une échelle allant de 0 à 5 (Figure II.9.A) à 4 jours, 6 jours et 8 jours post-infection. Comme attendu, en réponse à la souche Wt de *Xanthomonas campestris pv campestris*, nous n'avons pas observé de symptômes de maladie chez le Wt et chez les lignées PRR2. Par contre, les lignées PRR2 se comportent de manière différente après inoculation par $\Delta xopAC$ (Figure II.9.B). En effet, dès 4 jours post-infection, les symptômes de chlorose sont plus étendus chez le mutant *K.D. prr2.1* et le *RNAi prr2*, et réduits chez les lignées transgéniques surexprimant PRR2 (Figure II.9.B.i) mais aucun symptôme de maladie n'est encore visible chez le Wt Col0. A 6 jours, les symptômes de nécrose sont plus étendus chez le mutant *K.D. prr2.1* et le *RNAi* et sont restreints chez les surexprimeurs PRR2 (Figure II.9.B.ii). Ces différences se maintiennent 8 jours après infection (Figure II.9.B.iii). Après 8 jours, la maladie est totalement installée, les feuilles entrent en sénescence et il n'est plus possible d'effectuer une notation de symptômes. Les différences cinétiques d'apparition de symptômes entre les différentes lignées nous indiquent que **PRR2 pourrait être impliqué dans la mise en place des défenses contre *Xanthomonas campestris***. Ces résultats préliminaires nécessitent d'être reproduits et une quantification de la croissance bactérienne *in planta* après infection par la souche Wt et la souche $\Delta xopAC$ devra être réalisée.

2.3.3 Comportement des géotypes PRR2 lors d'une infection par le pathogène *Pseudomonas syringae pv tomato DC3000*

Afin de déterminer s'il existe des différences de croissance bactérienne entre les géotypes PRR2, des inoculations par une souche virulente de *Pst* DC3000 ont été réalisées (Figure II.10). Les premiers symptômes observés sont un flétrissement des feuilles, dont les tissus collapseront au bout de 2 jours. Au bout de 5 jours, les feuilles des plantes Col0 et *prr2.1* présentent des « patchs » de coloration jaunâtre, symptômes de chlorose (Figure II.10.A). Ces symptômes sont plus marqués chez les plantes mutantes *prr2.1* et *RNAi prr2* que chez le WT (Col0). Par ailleurs, les plantes surexprimant PRR2, *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* présentent des symptômes de chlorose visiblement moins prononcés (Figure II.10.A). Le *K.D. prr2.2* dans l'écotype *Wassilevskiy*a présente aussi des symptômes de maladie plus prononcés par rapport au Wt (données non illustrées). La présence de symptômes de maladie plus développés chez des mutants *prr2* d'écotype différents et réduits chez les lignées transgéniques surexprimant PRR2 indique que PRR2 pourrait être responsable de ce délai dans l'apparition de la maladie au cours d'une interaction entre *Arabidopsis* et la souche virulente de

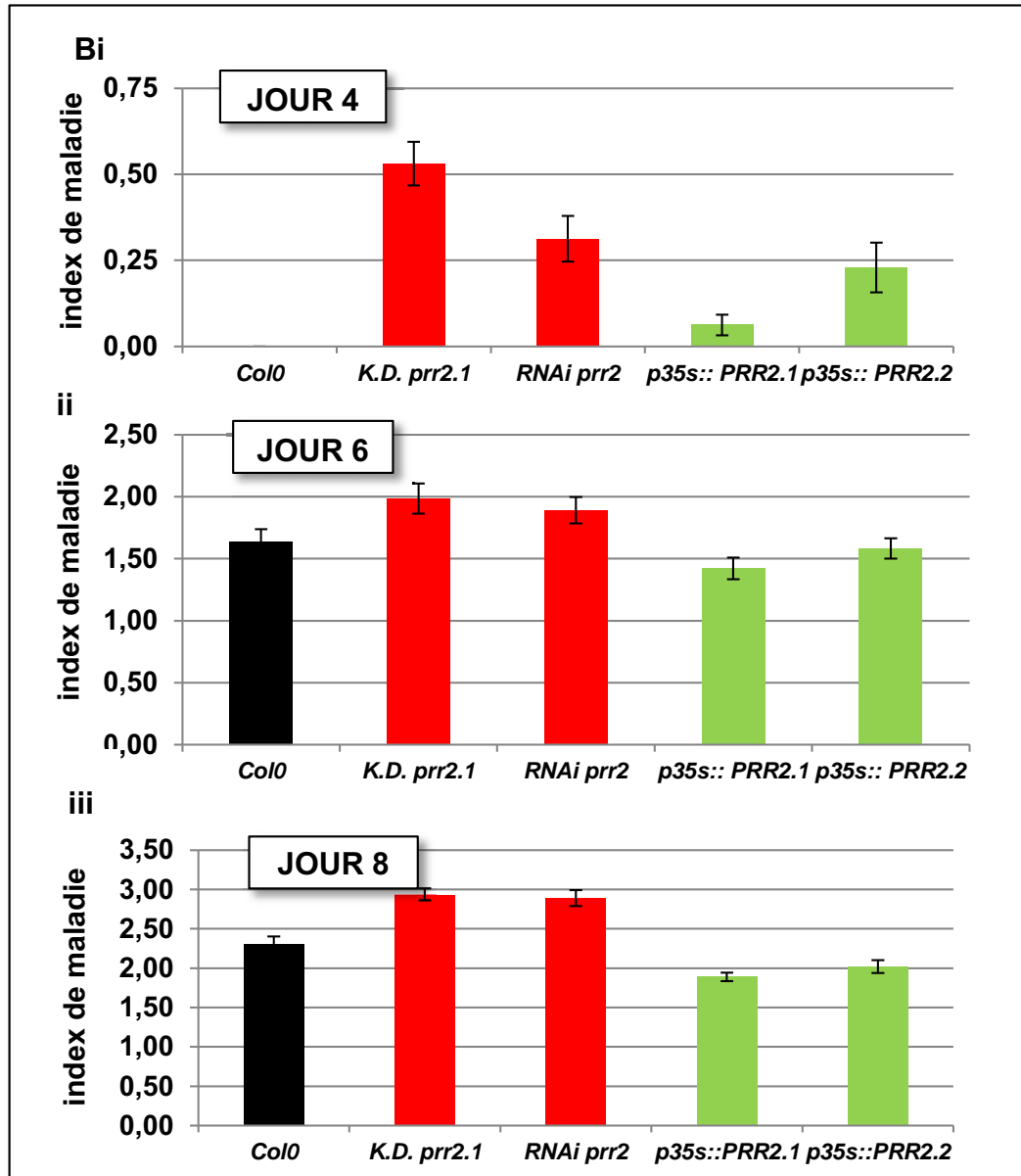
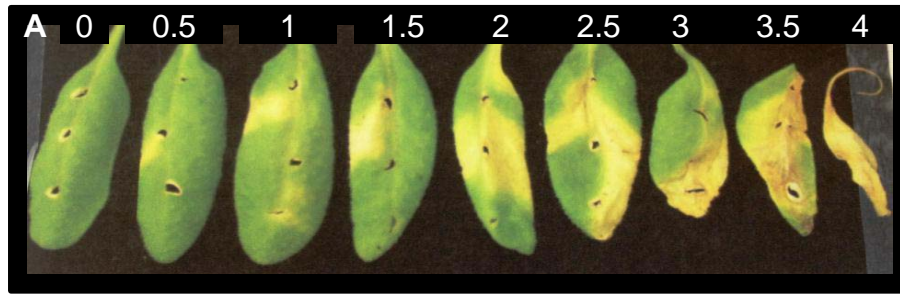


Figure II.9: Evaluation des symptômes de maladie après infection par *Xanthomonas campestris* pv *campestris* Δ xopAC

A. Index des symptômes de maladie observés avec *Xanthomonas campestris* pv *campestris* Δ xopAC. 0: pas de symptômes; 0.5:début de chlorose; 1: légère chlorose autour du site d'inoculation; 1.5:chlorose autour du site; 2: chlorose en V étendue à 2 sites d'inoculation; 3:nécrose localisée à l'extrémité de la feuille; 3.5: nécrose étendue; 4: chute de la feuille.

B. Des plantes de 4 semaines ont été inoculées par la bactérie à une concentration de 1×10^7 cfu/ml. Les symptômes de maladie ont été déterminés 4 jours (i) 6 jours (ii) et 8 jours (iii) après infection avec le pathogène. Les barres d'erreurs représentent le résultat de 2 réplicats expérimentaux.

Pseudomonas syringae. Afin de quantifier les différences observées, la numération bactérienne a été réalisée après inoculation à la seringue de la souche virulente *Pst* DC3000 (2×10^5 cfu/ml) à 12h (résultats non illustrés), 24h, (Figure II.10.B), et 48h (résultats non illustrés) après infection. À 12h et 24h la croissance bactérienne *in planta* est significativement moins importante chez les lignées transgéniques surexprimant PRR2 (*p35S:: PRR2.1* et *p35S:: PRR2.2*) par rapport au WT Col0, avec une différence d'un log (Figure II.10.B). Si la croissance bactérienne est supérieure chez les mutants K.D.*prrr2.1* et K.D.*prrr2.2*, aucune différence statistique significative n'a pu être mise en évidence chez la lignée RNAi *PRR2* par rapport au Wt d'après le Mann-Whitney U-test (Figure II.10.B). À 48h, la croissance bactérienne est équivalente pour l'ensemble des génotypes, et ce aussi bien dans l'écotype Col0 que dans l'écotype WS4. L'ensemble de ces résultats nous indique que **PRR2 pourrait contribuer à retarder la mise en place de la maladie en réponse à l'agent pathogène *Pst* DC3000.**

En résumé...

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre nous indique que PRR2 présente toutes les caractéristiques d'un facteur de transcription de type GARP dont l'expression est finement régulée au cours du développement et au cours du stress biotique. En effet, *PRR2* apparait fortement exprimé au niveau de structures spécialisées comme les stomates qui régulent les flux hydriques et constituent le point d'entrée de nombreux pathogènes. *PRR2* est aussi induit au niveau des tiges et plus particulièrement au niveau des cellules du phloème et des cellules compagnes ainsi qu'au niveau des cellules du parenchyme du xylème. Ces tissus conducteurs permettent le transport de métabolites mais représentent aussi le moyen de transport de nombreux pathogènes comme *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae* pour coloniser la plante. L'étude du profil d'expression détaillé de *PRR2* révèle que ce gène est induit en réponse à l'infection par différents pathogènes, et plus particulièrement en réponse à la souche virulente de *Pst* DC3000 dans une voie qui serait dépendante du SA. Par des approches perte et gain de fonction, nous avons montré que les lignées *PRR2* présentent des différences de sensibilité à l'infection par une souche virulente de *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae*. Nous avons choisi de poursuivre les travaux engagés sur la caractérisation de la fonction de PRR2 au cours de la résistance à *Pst* DC3000.

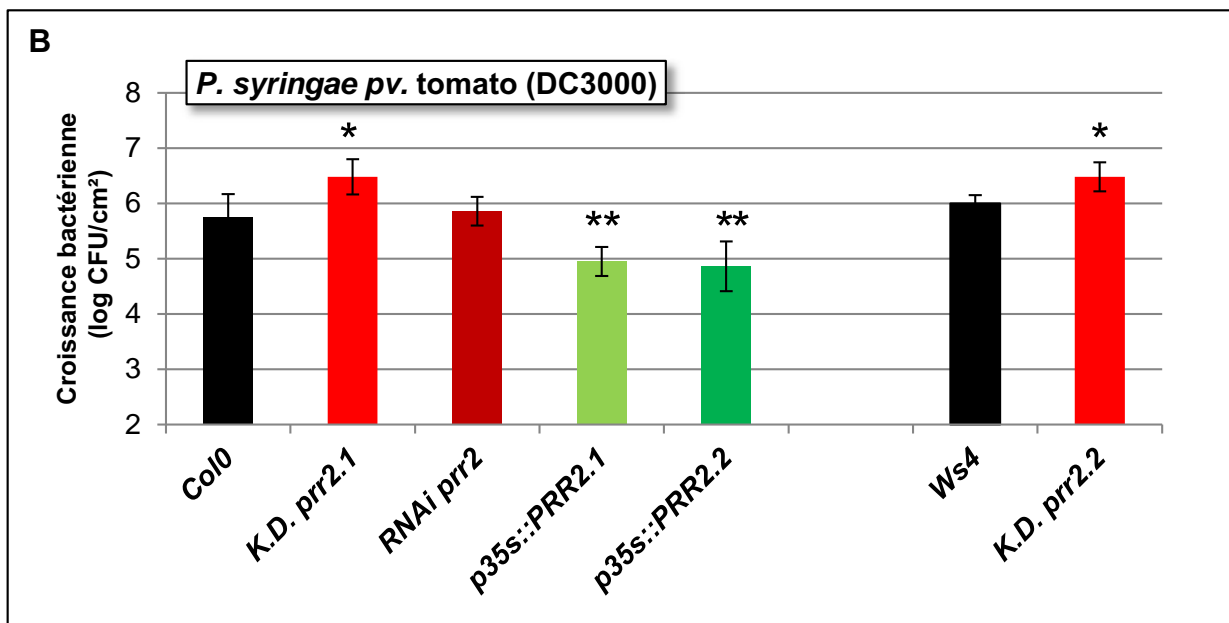
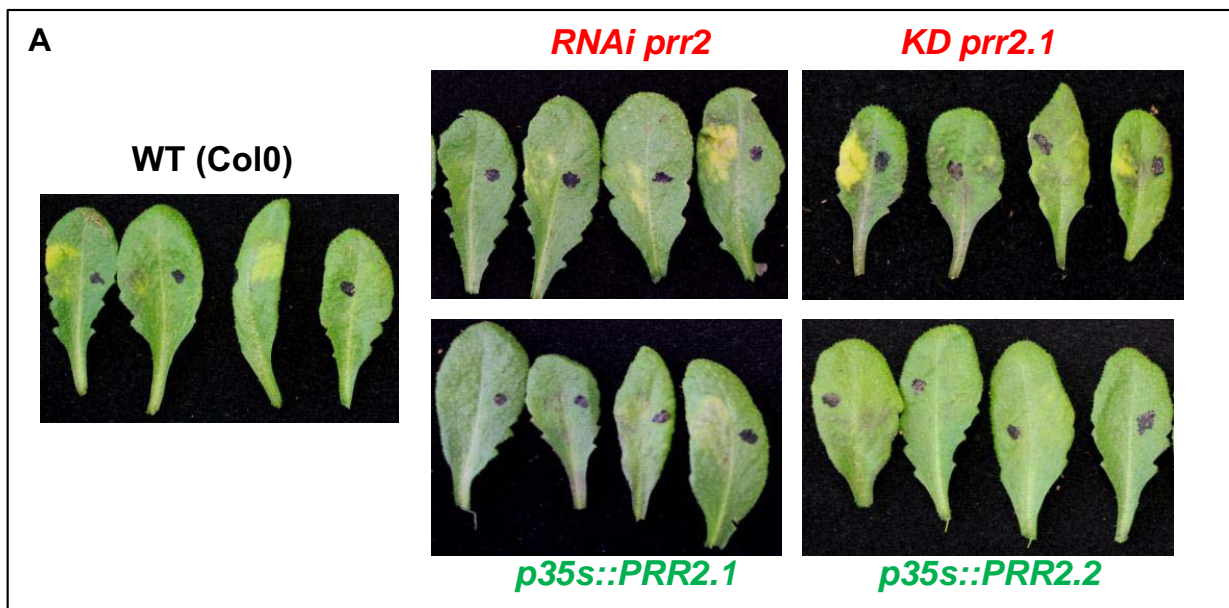


Figure II.10: Symptômes de maladie et quantification de la croissance bactérienne *in planta* en réponse à la bactérie virulente *Pst* DC3000

A. Des feuilles de plantes de 4 semaines, d'écotype *Columbia* et *Wassilevskiya*, cultivées en conditions standard de culture ont été inoculées par infiltration foliaire avec la souche virulente de *P. syringae* ($2 \cdot 10^5$ CFU/ml). Les symptômes de la maladie sont observés 5 jours après l'infection.

B. Croissance bactérienne de *Pst* DC3000 *in planta*. Des feuilles de plantes de 4 semaines ont été infectées par la bactérie à une concentration de $2 \cdot 10^5$ CFU/ml. La croissance bactérienne du WT (Col0 et Ws4) des plantes mutantes et des lignées transgéniques surexprimant *PRR2* a été déterminée 24h après infection avec *Pst* DC3000. Les barres d'erreurs représentent le résultat de 3 réplicats expérimentaux \pm SE ($n = 30$). Les étoiles indiquent une différence significative comparativement aux plantes WT d'après le Mann-Whitney U-test (* : p -value < 0.05, **: p -value < 0.01).

II_PRR2 un régulateur positif de la défense *impliqué dans la production de SA et la production de métabolites de défense en réponse à P. syringae*

❖ *PRR2: un régulateur des réponses de défense au cours de l'infection par Pst DC3000?*

1_ PRR2 serait impliqué dans l'immunité post-invasive en réponse à Pst DC3000

Etant donné que *PRR2* est exprimé au niveau des stomates et que l'on observe une induction rapide de l'expression du gène en réponse à *Pst* DC3000 **nous avons** dans un premier temps **recherché si PRR2 est impliqué dans l'immunité pré- ou post-invasive en réponse à cet agent pathogène**. De nombreux travaux ont mis en évidence que le mode d'infection par le pathogène en conditions de laboratoire impacte le développement de la maladie chez des mutants de signalisation (Melotto et al., 2008), c'est pourquoi nous avons réalisé différents tests d'infection afin de déterminer si le mode d'infection a un effet sur la contribution de PRR2 dans la résistance au pathogène. Des infections réalisées par inoculation à la seringue ont démontré que PRR2 se comporte comme un régulateur positif de la résistance à *Pst* DC3000 (**Figure II.10**).

Ainsi, des tests d'infection ont été réalisés soit en pulvérisant des plantes d'*Arabidopsis* avec un inoculum de *Pst* DC3000, soit en laissant des plantules de 8-12 jours cultivées *in vitro* en milieu liquide en contact avec un inoculum du pathogène. Il a été démontré en effet que les tests réalisés en spray évitent «l'effet blessure» et préviennent la rupture des barrières physiques de défense causées par les infections par infiltrations foliaires (Melotto et al., 2008). De plus, les tests d'infection réalisés en culture *in vitro* permettent non seulement d'éviter cet effet blessure mais aussi un meilleur contrôle des conditions d'infections (paramètres de culture des plantes, quantité d'inoculum appliqué etc ...)(Denoux et al., 2008).

1.1 Infection de plantules cultivées *in vitro* en milieu liquide

Des plantules des lignées *PRR2* cultivées en milieu liquide *in vitro* ont été infectées par un inoculum de *Pst* DC3000 (1.10^7 cfu/ml). Dans ces conditions de culture en milieu liquide nous ne pouvons pas observer de symptômes de maladie, c'est pourquoi nous avons choisi de réaliser ces tests en réponse à une souche de *Pst* DC3000 portant l'opéron luxCDABE capable d'émettre de la luminescence (**Figure II.11.A.i**). Lorsqu'on compare les génotypes *PRR2* au Wt, la luminescence apparaît plus importante chez le mutant K.D. *prr2.1* par rapport au Wt alors qu'elle semble être la même chez les

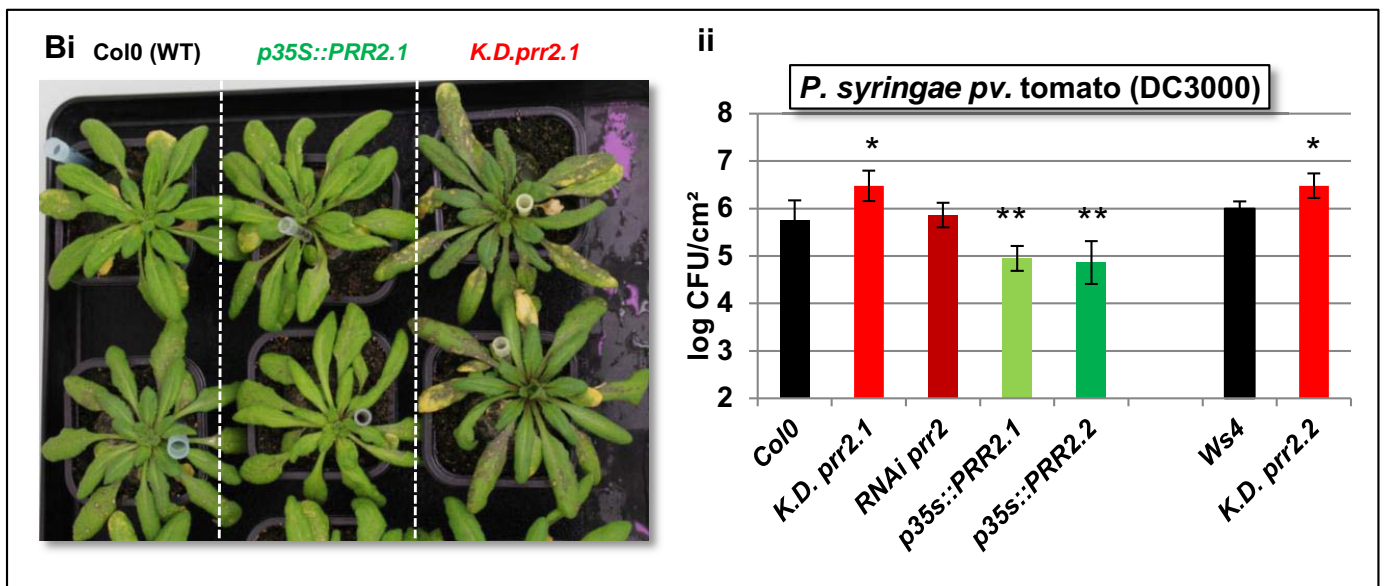
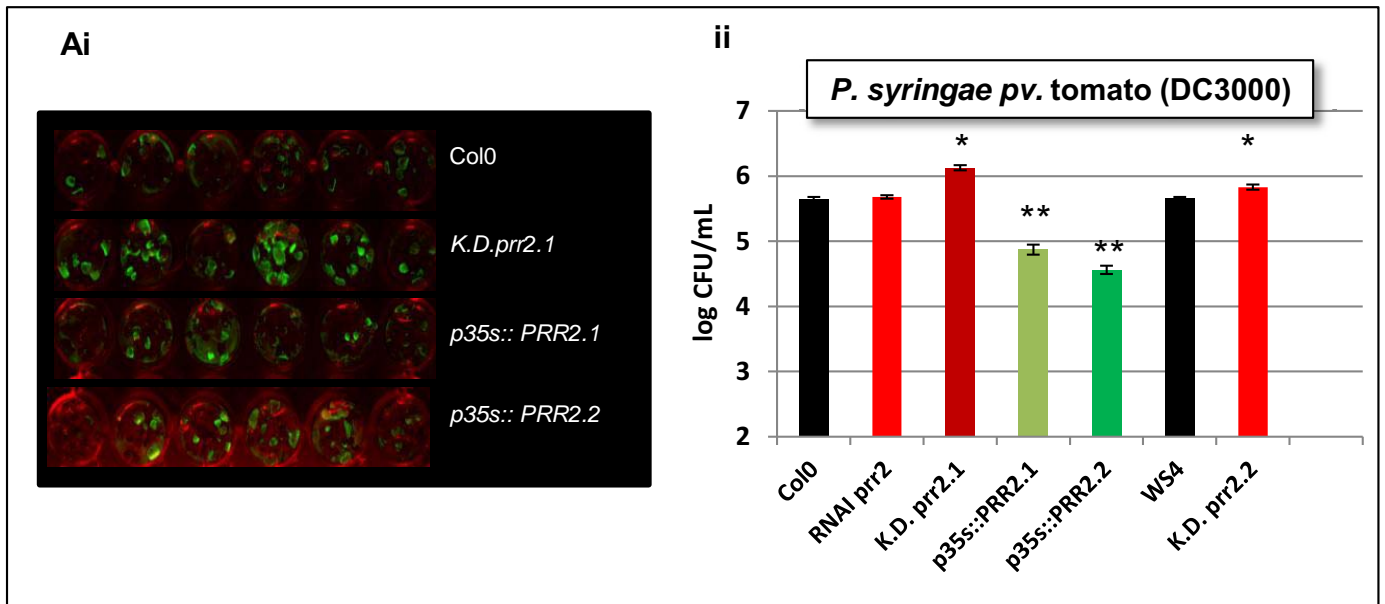


Figure II.11: Symptômes de maladie et quantification de la croissance bactérienne *in planta* en réponse à la bactérie virulente *Pst* DC3000

A. Des plantules de 12 jrs, d'écotype *Columbia*, cultivées en conditions standard de culture ont été immergées dans un milieu MS contenant la souche de *P. syringae* luminescente portant l'opéron *luxCDABE* (1.10^7 CFU/ml). La croissance bactérienne est visualisée (i) en luminescence et quantifiée par numération (ii) 24h après infection.

B. Des feuilles de plantes de 4 semaines, d'écotype *Columbia*, cultivées en conditions standard de culture ont été pulvérisées avec une souche de *P. syringae* (5.10^7 CFU/ml). Les symptômes de la maladie sont observés 7 jours après l'infection. (i) et la croissance bactérienne est quantifiée par numération bactérienne 24h après infection.

Les barres d'erreurs représentent le résultat de 3 réplicats expérimentaux \pm SE ($n = 30$). Les étoiles indiquent une différence significative comparativement aux plantes WT d'après le Mann-Whitney U-test (* : p -value < 0.05, ** : p -value < 0.01).

surexpressesurs *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* par rapport au WT. Ces observations ont été validées par une quantification de la croissance bactérienne *in planta* (Figure II.11.A.ii). Entre 12h et 24h après infection, la croissance bactérienne apparaît légèrement mais significativement supérieure chez le mutant *K.D. prr2.1* par rapport au Wt Col0. Aucune différence statistique cependant n'est observée entre le Wt Col0 et la lignée *RNAi prr2*. Par contre, les lignées surexprimant *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* présentent une croissance bactérienne significativement inférieure au Wt (Figure II.11.A.ii). 48h après infection, aucune différence n'est observée dans la croissance bactérienne de l'ensemble des géotypes. L'ensemble de ces résultats nous indiquent que **dans ces conditions d'infection, PRR2 contribue de manière transitoire à la résistance d'*Arabidopsis* contre *Pst* DC3000.**

1.2 Infection de plantes par pulvérisation

Des sprays ont été effectués avec un inoculum de *Pst* DC3000 (5.10^7 cfu/ml) sur des plantules en culture *in vitro* et sur des plantes adultes.

Quand des plantes de 4 semaines d'*Arabidopsis* sont pulvérisées avec l'inoculum bactérien (5.10^7 cfu/ml), les géotypes PRR2 présentent aussi des différences en termes de développement de symptômes chlorotiques au bout de 6-7jours (Figure II.11.B.i). Le mutant *prr2.1* et la lignée *RNAi prr2* présentent des spots chlorotiques dont le nombre et la taille sont beaucoup plus importants par rapport au Wt. Au contraire, les surexpressesurs *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* présentent des symptômes de chlorose réduits et un comportement beaucoup plus proche du Wt (Figure II.11.B.i). Concernant l'écotype Ws4, les symptômes de chlorose sont plus marqués chez le Wt Ws4 par rapport au Wt Col0, ce qui était attendu dans la mesure où l'écotype Ws4 présente un récepteur à la *flg22* muté (données non illustrées). De ce fait, cet écotype se retrouve plus sensible à l'attaque par *P. syringae*. Lorsqu'on s'intéresse aux différences entre les géotypes, le mutant *prr2.2* apparaît aussi plus sensible au pathogène comparativement au Wt Ws4 (Figure II.11.B.ii). Des quantifications de la croissance bactérienne ont aussi été réalisées sur les géotypes PRR2 de l'écotype Col, 24h après pulvérisation. Le mutant *K.D. prr2.1* et la lignée *RNAi prr2* présentent une croissance bactérienne légèrement supérieure au Wt et significativement différente dans le cas du *K.D. prr2.1*. Les surexpressesurs PRR2 dans le fond Col présentent une croissance bactérienne significativement réduite par rapport au Wt (Figure II.11.B.ii). En réponse à une infection par pulvérisation, PRR2 se comporte donc comme un régulateur positif de la résistance à *Pst* DC3000.

L'ensemble de ces résultats nous indique que **quelque soit le mode d'infection, la sensibilité des lignées PRR2 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 est la même.** L'absence de différences observées dans la croissance bactérienne des lignées PRR2 en réponse à ces différentes méthodes d'infection indique que **PRR2 serait impliqué dans l'immunité post-invasive en réponse à *P. syringae*.** L'étude de la fermeture stomatique en réponse à des PAMPs comme la *flg22* nous permettrait de confirmer ces observations.

Niveau de virulence

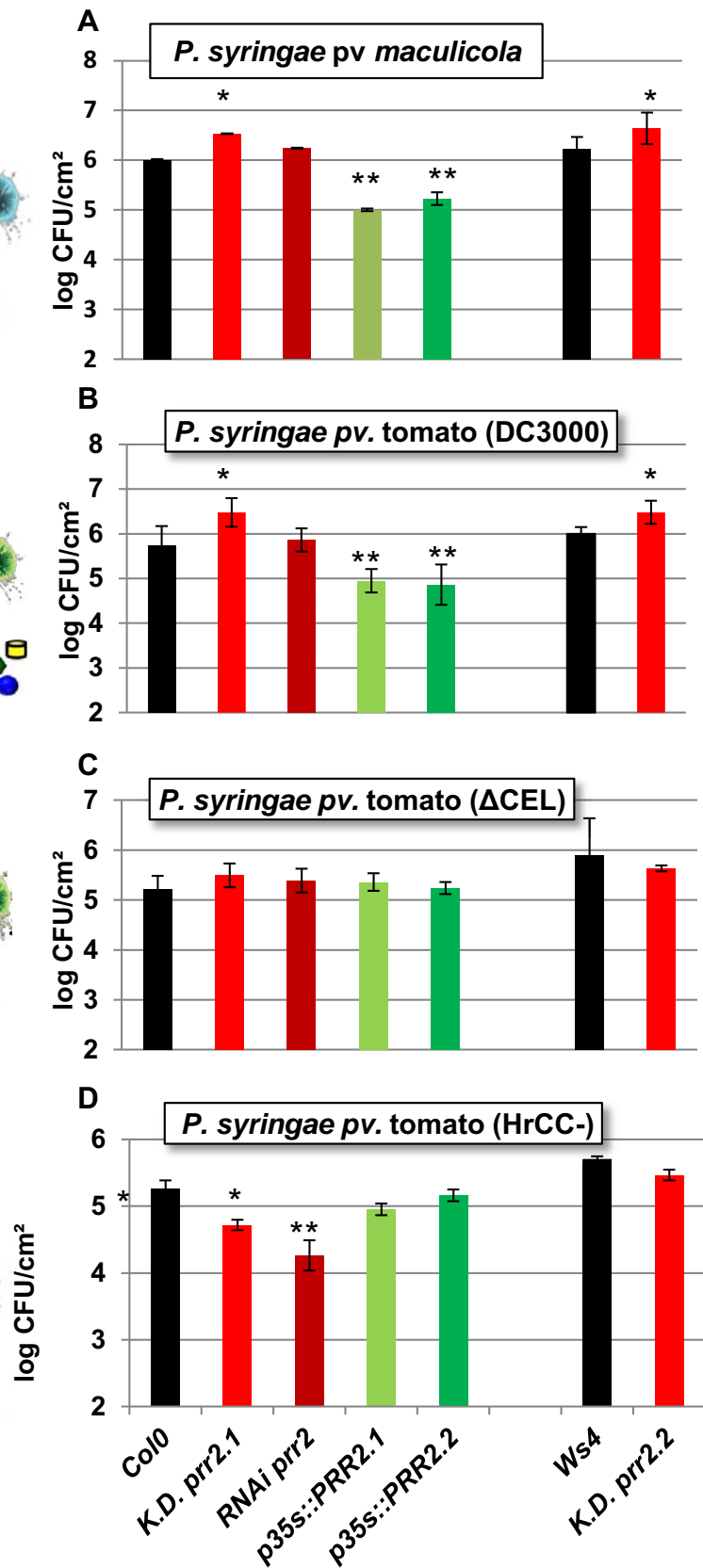
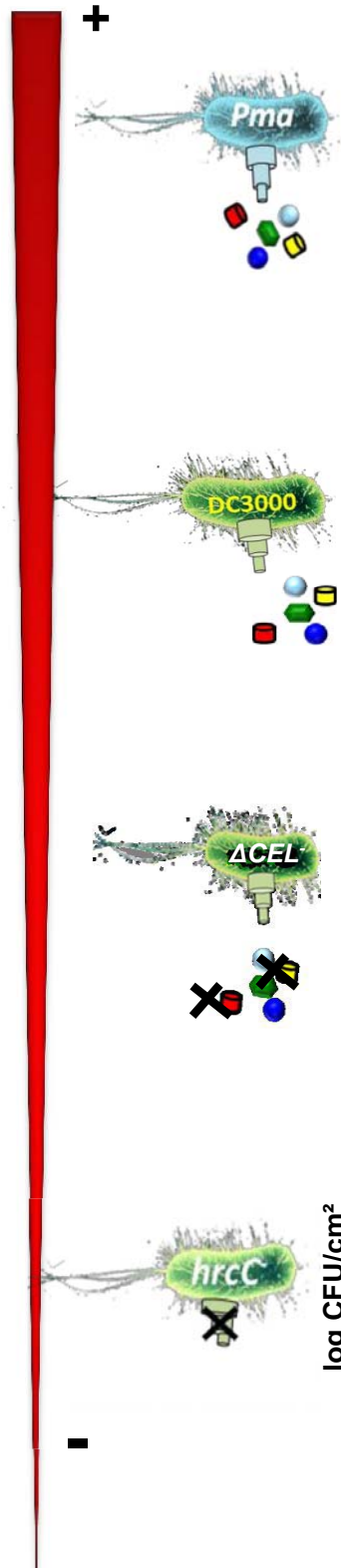


Figure II.12: Sensibilité des lignées PRR2 en réponse à l'infection par différentes souches de *P. syringae*

Quantification de la croissance bactérienne in planta 24h après infection par Pst DC3000. Des feuilles de 4 semaines de plantes ont été pulvérisées avec un inoculum à 5.10⁷ CFU/cm² de *P. syringae* pv maculicola (A) Pst DC3000 (B) Pst DC3000 ΔCEL (C) et Pst DC3000 HrcC (D). Les barres d'erreurs représentent le résultat de 3 réplicats expérimentaux ± SE (n = 30). Les étoiles indiquent une différence significative comparativement aux plantes WT d'après le Mann-Whitney U-test (* : p-value < 0.05, **: p-value < 0.01).

2_ La contribution de PRR2 à la résistance d'*Arabidopsis* à *P. syringae* est dépendante de l'injection d'effecteurs de type III

Il est bien connu que la voie de signalisation SA est particulièrement impliquée dans les réponses à des souches virulentes de *P.syringae* capables d'injecter des effecteurs. Etant donnée que l'expression de *PRR2* apparait être dépendante du SA en réponse à ce pathogène, nous avons testé si le comportement des lignées *PRR2* est aussi dépendant de l'injection d'effecteurs par *P.syringae*. Pour cela nous avons testé dans un premier temps deux types de souches, une souche particulièrement virulente *P. syringae* *pv. maculicola*, (**Figure II.12.A**) qui est responsable de l'activation des mécanismes de défenses dépendants du SA chez *Arabidopsis* et une souche HrCC- (**Figure II.12.D**) dépourvue de système de sécrétion de type III et de ce fait, incapable d'injecter des effecteurs. Les tests ont été réalisés en culture *in vitro* et en pulvérisation, les figures illustrent ici uniquement les résultats des tests en pulvérisation car les mêmes tendances ont été obtenues *in vitro*.

En réponse à la souche virulente *P.syringae* *pv maculicola*, la croissance bactérienne est fortement réduite chez les surexprimeurs *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* 24H post-infection (**Figure II.12.A**). Bien qu'aucune différence significative n'est observée entre la lignée *RNAi prr2* et le Wt, on observe également que le *knock-down prr2.1* présente une croissance bactérienne supérieure au Wt après infection, cette différence reste discrète mais significative. Les mêmes résultats ont été obtenus chez le mutant *prr2.2* dont la croissance bactérienne est légèrement supérieure au Wt Ws4 (**Figure II.12.A**). Au-delà de 24h après infection, nous n'observons plus de différences entre les génotypes *PRR2* (données non illustrées). **PRR2 contribue donc à réduire la sensibilité à *P. syringae* *pv maculicola***. Il faut noter que l'utilisation d'une souche qui cible la voie SA comme *P.syringae* *pv maculicola*, accentue légèrement les différences de croissance bactérienne entre les lignées *PRR2*. De manière générale chez l'ensemble des lignées Wt et perte et gain de fonction pour *PRR2*, la croissance bactérienne est supérieure en réponse à l'infection par *P. syringae* *pv maculicola* en comparaison de celle effectuée en réponse à *Pst DC3000* (**Figure II.12.B**).

De manière intéressante, en réponse à la souche HrCC- incapable d'injecter des effecteurs, le comportement des lignées *PRR2* est inversé par rapport à celui observé en réponse à *Pst DC3000*. En effet, entre 12h et 24h post-infection, le mutant *prr2.1* et la lignée *RNAi prr2* présentent une croissance bactérienne réduite par rapport au Wt Col0 alors que les surexprimeurs *PRR2* présentent une croissance bactérienne équivalente au Wt (**Figure II.12.D**). Ces différences se maintiennent à 24h post-infection, au-delà de ce temps, aucune différence significative n'est observée entre les lignées *PRR2*. **Ainsi, en l'absence d'effecteurs, PRR2 n'est plus capable de réduire la sensibilité à *P. syringae***.

Nous avons dans un deuxième temps réalisé des quantifications de la croissance bactérienne avec la souche Δcel dont les effecteurs affectent des réponses SA-dépendantes (DebRoy et al., 2004). En réponse à cette souche, aucune différence significative n'a pu être observée entre 0 et 48h après infection (**Figure II.12.C**). De ce fait, **en l'absence des effecteurs qui ciblent la voie SA, PRR2 semble donc ne pas être capable de réduire la sensibilité à *P. syringae***.

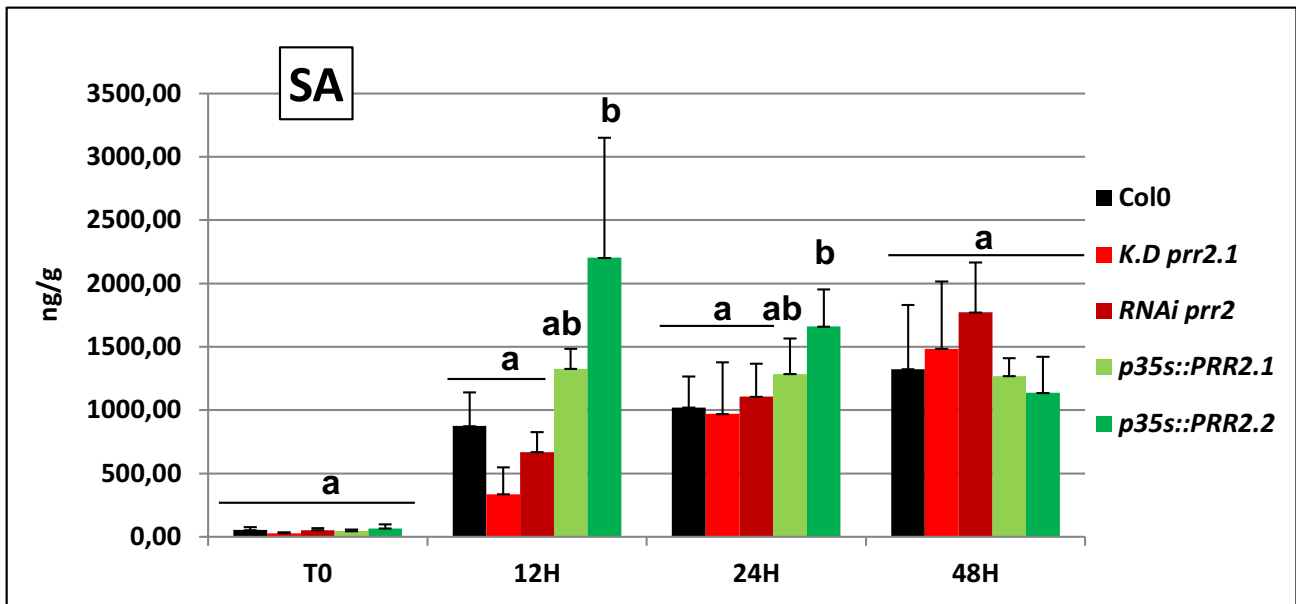


Figure II.13: Quantification de la production de SA au sein des différents génotypes PRR2 lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation de SA a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne. Les lettres au dessus des histogrammes permettent de regrouper les génotypes qui présentent le même comportement (test de Dunnett, p-value < 0.01).

L'ensemble de ces résultats nous indique que **la sécrétion d'effecteurs de type III dans les cellules végétales est nécessaire pour que PRR2 participe à la résistance au pathogène**. De plus, PRR2 est capable de restreindre la virulence à *Pst* DC3000 **quand les effecteurs du locus CEL qui ciblent la voie SA sont présents**. Ces résultats nous indiquent que la voie SA joue un rôle essentiel dans la capacité de PRR2 à réduire la sensibilité à *P.syringae*.

En conséquence, afin de mieux comprendre la contribution de PRR2 dans la résistance à *P. syringae*, la production de SA et de JA et d'ABA qui interfèrent avec le SA en réponse à *Pst* DC3000 (Pieterse et al., 2012) ont été étudiés chez les génotypes *PRR2*. De plus, nous avons évalué si les barrières de défense classiquement mises en place en réponse à *Pst* DC3000, à savoir, la production de camalexine, de glucosinolates et de callose est altérée en réponse à ce pathogène.

3_ PRR2 est impliqué dans la production de SA en réponse à *Pst* DC3000

Etant donné qu'il existe des interactions très fines entre les voies hormonales au cours de l'infection par *Pst* DC3000 (Pieterse et al., 2012), nous avons recherché si les composés hormonaux bien connus pour être impliqués dans les réponses à *Pst* DC3000 comme le SA, le JA et l'ABA s'accumulent différemment entre les lignées *PRR2*. Un dosage de la production d'ABA et de la production des différentes formes précurseurs, actives et dégradées du JA (JA, JA-Ile, cis-OPDA, COOH-JA-Ile) ainsi qu'un dosage des différentes formes de glucosinolates (aliphatiques et indoliques) a été réalisé en collaboration avec A. Mithofer au *Max Planck Institute for Chemical Ecology* (Jena).

3.1 L'accumulation de SA est altérée en réponse à *Pst* DC3000 chez les lignées *PRR2*

Afin de mettre en évidence si la production et/ou l'accumulation de SA est altérée chez les lignées *PRR2*, nous avons dosé le SA par UPLC-ESI-MS/MS dans des feuilles de rosette à 0, 12h, 24h et 48h après infection par *Pst* DC3000 (**Figure II.13**).

Comme attendu, la quantité de SA augmente au cours du temps après infection par le pathogène par rapport au témoin non infecté. En effet, la quantité de SA est 16 fois supérieure chez Col0 12h après infection. Ce niveau de SA augmente au cours du temps et devient 20 fois supérieur 24h post-infection et 25 fois supérieur 48h post-infection.

Malgré des taux de SA similaires entre les génotypes *PRR2* non infectés, la quantité de SA est supérieure chez les surexprimeurs *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* par rapport au Wt 12h et 24h post-infection. Ces différences sont significatives à 12h et 24h mais sont transitoires puisque 48h après infection aucune différence n'est observée entre les génotypes *PRR2*. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que **PRR2 est un régulateur positif de l'accumulation de SA après infection par le pathogène *Pst* DC3000**.

3.2 La production du JA n'est pas perturbée en réponse à *Pst* DC3000 chez les lignées *PRR2*

Le dosage a été effectué à différents points cinétiques (12h, 24h, 48h) après inoculation de feuilles d'*Arabidopsis* de 3-4 semaines par le pathogène *Pst* DC3000 ou en conditions contrôles (*mock*). La quantité de chacune des formes dosées est ramenée en ng/g de matière fraîche. La forme précurseur

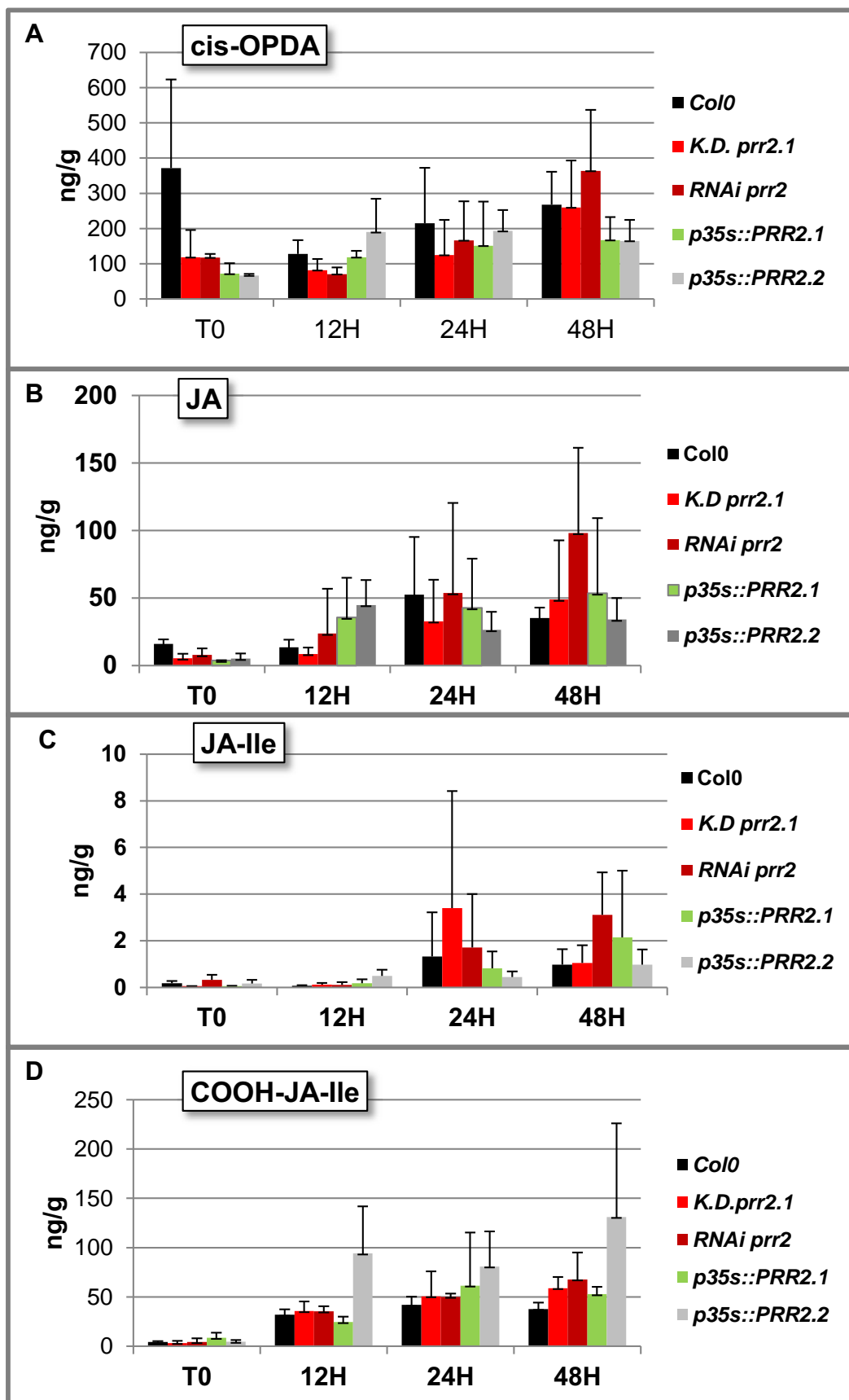


Figure II.14: Quantification de la production des différentes formes de JA au sein des différents génotypes *PRR2* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation de cis-OPDA (A), JA (B), JA-Ile (C) et COOH-JA-Ile (D) a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

du JA, cis-OPDA a été dosée. De fortes variabilités entre les réplicats biologiques ne nous permettent pas cependant de déterminer s'il y a des différences dans l'accumulation de ce composé au cours de l'infection et si des différences existent entre les génotypes *PRR2*. La quantité de JA (**Figure II.14.B**) atteint son maximum à 24h (environ 50ng/g) en réponse au pathogène chez le Wt Col0, ce qui est cohérent avec les données présentées dans la littérature (Pieterse, 2009). Aucune différence significative n'est cependant observée entre les lignées *PRR2* pour l'accumulation de ce composé hormonal. Concernant la forme active JA-Ile (**Figure II.14.C**), les teneurs évaluées restent faibles (entre 2-4 ng/g) et ce, pour tous les génotypes *PRR2* qui présentent les mêmes teneurs. La forme dégradée du JA, COOH-JA-Ile augmente chez tous les génotypes de la même façon en réponse à l'infection par la pathogène (autour de 50ng/g, **Figure II.14.D**). L'ensemble de ces résultats nous indique que **la production du JA, de ses principales formes active, dégradée ou de son précurseur n'est vraisemblablement pas affectée par la perte ou le gain de fonction de PRR2.**

3.3 La production d'ABA n'est pas perturbée en réponse à *Pst* DC3000 chez les lignées *PRR2*

Le dosage de l'ABA a été effectué de la même façon que celui des différentes formes de JA (voir paragraphe ci-avant). La quantité d'ABA augmente fortement entre 24h et 48 *post*-infection par *Pst* DC3000, ce qui est en accord avec les données publiées (**Figure II.15**). Etant donné la variabilité assez importante entre les réplicats biologiques, aucune différence significative dans l'accumulation de ce composé n'a été montrée entre les génotypes étudiés entre T0 et T48h. L'ensemble de ces résultats indique que **la production d'ABA n'est pas affectée par la perte ou le gain de fonction de PRR2.**

4_ PRR2 est impliqué dans la production de composés antimicrobiens en réponse à *Pst* DC3000

4.1 PRR2 est un régulateur positif de la production de camalexine en réponse à *Pst* DC3000

La camalexine étant un composé majeur de défense associé aux réponses de défense à *Pst* DC3000, nous avons recherché si les lignées *PRR2* sont altérées dans la production de ce métabolite. L'accumulation en camalexine a été quantifiée à 0, 12h, 24h et 48h après infection par *Pst* DC3000 (**Figure II.16**). Comme attendu, en réponse à *Pst* DC3000 la quantité de camalexine augmente fortement à 24h (20 fois plus importante) et 48h (60 fois plus importante). Cette augmentation est significativement plus importante chez les surexprimeurs *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* à 24h. Au contraire, le mutant *prr2.1* et la lignée *RNAi prr2* présentent une quantité de camalexine environ 100 fois moins importante à 48h en comparaison du Wt (**Figure II.16**). Ces données révèlent que **PRR2 est un régulateur positif de l'accumulation de camalexine en réponse à *Pst* DC3000.**

4.2 PRR2, un régulateur de la production de glucosinolates en réponse à *Pst* DC3000?

La quantification de l'accumulation de glucosinolates aliphatiques (3MSOP:3-methylsulfinylpropyl glucosinolate, 7MSOH :7-Methylsulfinylheptyl glucosinolate, 4MTB: x, 4MSOB :4 methylsulfinylbutyl

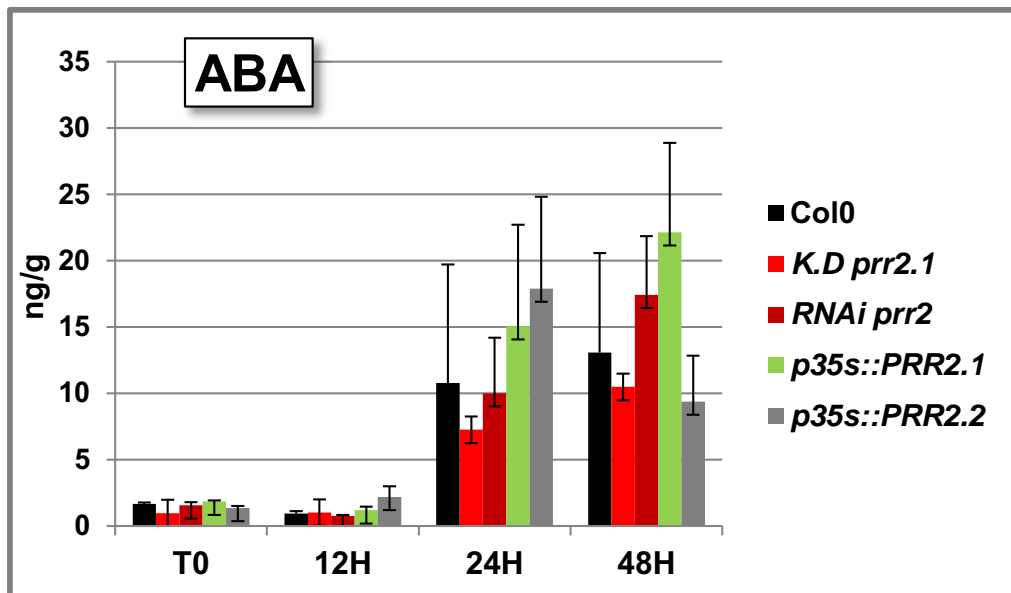


Figure II.15: Quantification de la production d'ABA au sein des différents génotypes d'*Arabidopsis* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation d'ABA a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

glucosinolate, 8MSOO: 8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate, 5MSOP :5- methylsulfinylbutyl glucosinolate) et de glucosinolates indoliques (I3M: Indol-3-ylmethyl glucosinolate , 4MOI3M :4 Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate, 3MOI3M : 3-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate) a été effectué chez les génotypes *PRR2* à différents points cinétiques (12h, 24h, 48h) après inoculation de feuilles d'*Arabidopsis* de 3-4 semaines par le pathogène *Pst* DC3000 ou en conditions contrôles (*mock*). Pour chaque temps cinétique et chaque génotype, le détail du dosage de chaque composé appartenant aux glucosinolates aliphatiques est donné dans la **Figure S1** (données supplémentaires) et ceux appartenant aux glucosinolates indoliques dans la **Figure S2** (données supplémentaires).

La **figure II.17** représente la quantité totale de glucosinolates aliphatiques et de glucosinolates indoliques accumulés chez les génotypes *PRR2* en fonction du temps après infection par *Pst* DC3000. Lorsqu'on s'intéresse à l'accumulation de ces différentes formes de glucosinolates en fonction du temps, on remarque que l'accumulation de ces composés augmente de manière générale au cours du temps et atteint son maximum à 48h chez tous les génotypes. A T0 et 24h, aucune différence entre les lignées *PRR2* n'est observée pour l'accumulation de ces composés. Néanmoins, 12h après infection par le pathogène, nous remarquons que l'accumulation de glucosinolates indoliques est supérieure chez le Wt par rapport aux autres génotypes *PRR2*. Etant donné que les mutants et les surexprimeurs de *PRR2* présentent le même comportement à 12h, il semble peu probable que ces résultats soient la conséquence directe de *PRR2*. Lorsqu'on s'intéresse au temps 48h, on remarque que l'accumulation de glucosinolates indoliques est légèrement plus importante chez les surexprimeurs en comparaison de la lignée Wt et des lignées mutantes. Les différences existantes étant très discrètes nous ne pouvons cependant pas conclure que *PRR2* exerce un rôle majeur dans l'accumulation des glucosinolates totaux en réponse à *Pst* DC3000. Lorsqu'on regarde en détail les composés indoliques accumulés en réponse à *Pst* DC3000 (**figure S2**), on remarque qu'effectivement à 48h l'accumulation de I3M semble plus importante chez les deux surexprimeurs (**figure S2**), et l'accumulation de 1MOI3M est très significativement plus importante pour l'un des surexprimeurs (*p35S::PRR2.1*, **figure S2**). **Ces résultats permettent de conclure que *PRR2* pourrait moduler la production de glucosinolates indoliques en réponse à *Pst* DC3000.**

4.3 *PRR2* est un régulateur de l'accumulation de papilles de callose en réponse à la flg22

La formation de papilles de callose a été évaluée chez les génotypes *PRR2*. Les traitements ont été effectués à partir de 1 μ M de flg22 qui correspond à une concentration décrite dans la littérature comme efficace pour induire les réponses de défense (Felix, 1999). Des plantules d'*Arabidopsis* de 8-10 jours ont été cultivées *in vitro* puis transférées en présence ou non de flg22 pendant 12h avant d'être colorées au Bleu d'Anilline pour visualisation et quantification de la callose en fluorescence. Comme attendu, en l'absence de traitement flg22, nous n'observons que très peu de dépôts de callose, et aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les génotypes *PRR2*. Après application de flg22, les plantules présentent des papilles de callose de très petite taille, réparties de manière homogène sur l'ensemble de la surface des cotylédons. Le nombre de papilles de callose est inférieur chez les lignées *KD prr2.1* et *RNAi prr2* par rapport au Wt (Col0) et au contraire plus important chez les lignées surexprimant *PRR2* par rapport au Wt (**figure II.18**). Différents paramètres qualitatifs et quantitatifs d'analyse de ces dépôts de callose (nombre de dépôts, surface moyenne des dépôts, tailles de papilles) ont été évalués à l'aide du logiciel imageJ

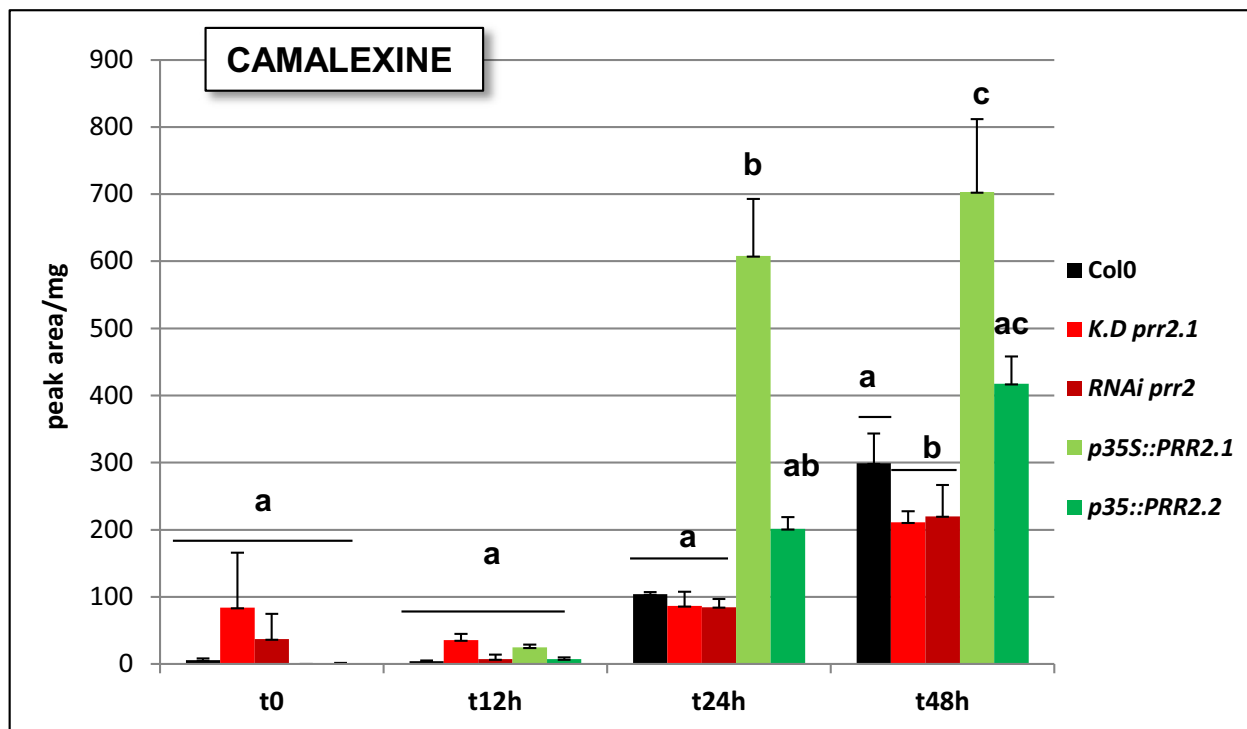


Figure II.16: Quantification de la production de camalexine au sein des différents génotypes *PRR2* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation de camalexine a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne. Les lettres au dessus des histogrammes permettent de regrouper les génotypes qui présentent le même comportement (test de Dunnett, p -value <0.01).

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Le traitement statistique des données indique qu'il existe effectivement une différence significative entre les différentes lignées en terme de surface moyenne de papilles de callose (**figure II.18**), de nombre moyen de papilles (**Figure S3a, données supplémentaires**) et en terme de taille des papilles (**Figure S3b, données supplémentaires**). La surface moyenne de papilles de callose formées par cotylédon chez les lignées *p35S::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* est deux à cinq fois significativement plus importante en comparaison au Wt Col0 (**figure II.18**). Les lignées *K.D. prr2.1* et *RNAi prr2* présentent *a contrario* une surface moyenne en papilles de callose environ deux fois moins importante par rapport au Wt. Le nombre et la taille des papilles de callose est significativement supérieur chez la lignée *p35S::PRR2.2* en comparaison au Wt. Le nombre de papilles de callose chez le *K.D. prr2.1* est identique au Wt alors que la taille inférieure chez le *K.D. prr2.1* par rapport au Wt. **Ces résultats nous indiquent de ce fait que PRR2 contribue à la mise en place de papilles de callose en réponse à la flg22.**

En résumé, l'ensemble de ces résultats indique que PRR2 n'est pas un régulateur de la production d'ABA et de JA mais un régulateur de la production de SA en réponse à l'infection par *Pst* DC3000. De plus, il a été démontré que PRR2 contribue à l'accumulation de composés anti-microbiens comme la camalexine en réponse à *Pst* DC3000 mais pas uniquement puisque la quantification de l'accumulation de glucosinolates et de callose a montré que PRR2 semble réguler positivement l'accumulation de ces composés. **L'ensemble des résultats de ce travail suggère que PRR2 est un régulateur de la production de métabolites secondaires impliqué dans une voie de signalisation hormonale dépendante du SA.**

❖ *PRR2: un régulateur de l'expression de gènes de défense en réponse à Pst DC3000?*

1. Est-ce que les lignées altérées dans l'expression de PRR2 présentent des altérations majeures de l'expression génique en réponse à Pst DC3000?

Il est bien établi que la production hormonale en SA/JA/ABA est fortement corrélée à l'induction de l'expression des gènes intervenant dans la biosynthèse de ces composés en réponse à *Pst* DC3000 (de Torres-Zabala et al., 2007). Nous avons donc recherché si l'expression des gènes majeurs de production hormonale et de production de métabolites secondaires sont dérégulés chez les lignées *PRR2* en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 par une approche Fluidigm.

Cette étude a été réalisée sur les 3 génotypes Col0, *Knock Down (K.D.) prr2.1* et *p35S::PRR2.2* à différents temps (T0, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h et 24h) après infection par la bactérie *Pst* DC3000. L'analyse réalisée sur 90 gènes impliqués dans les processus cités ci-avant montre que 44 gènes présentent un profil d'expression altéré en réponse au pathogène. Une classification hiérarchique des données d'expression obtenues a été réalisée à partir du logiciel *HCE3.5*. Les résultats sont représentés dans la **figure II.19** sous forme d'un dendrogramme hiérarchique qui regroupe les gènes ayant des profils d'expressions similaires. Le descriptif des gènes est donné dans la **table S1** (données supplémentaires). Ce dendrogramme a été réalisé à l'aide de la méthode UPGMA en considérant le

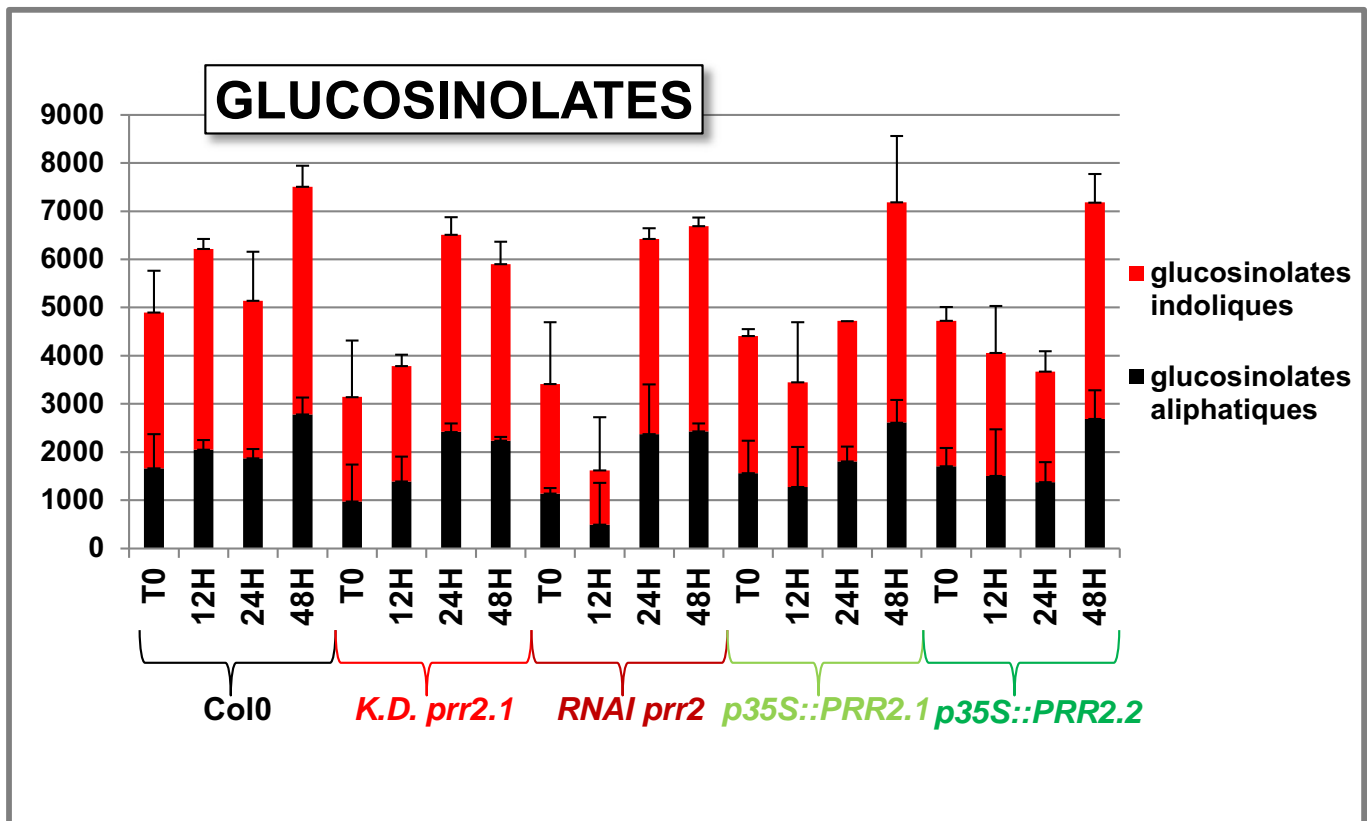


Figure II.17: Quantification de la production de glucosinolates aliphatiques et indoliques au sein des différents génotypes d'*Arabidopsis* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation des glucosinolates indoliques (en rouge) et aliphatiques (en noir) a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type à la moyenne.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

coefficient de corrélation de Bravais Pearson comme indice de similarité entre les gènes et entre les génotypes (figure II.19). Cette classification donne une vue d'ensemble des gènes altérés chez les différentes lignées et permet de mettre en évidence 8 sous groupes de gènes (figure II.19, I à IIX). De plus, les génotypes qui présentent un comportement similaire ont été rassemblés en 6 groupes (figure II.19 a à f).

Concernant le regroupement des génotypes, les **groupes a, b et c** rassemblent les trois génotypes étudiés respectivement à 1h, 3h et 6h. Cela signifie que pour des temps cinétiques précoces, il existe peu de différences dans le profil d'expression des gènes étudiés entre les génotypes *PRR2*. Lorsqu'on s'intéresse plus en détail à ces gènes, on remarque effectivement que chez les 3 génotypes du groupe **a**, tous les sous-groupes de gènes présentent un profil d'expression similaire entre les génotypes *PRR2*, mis à part le sous-groupe III. Dans le sous groupe III, les gènes *FLS3* (impliqué dans la production de flavonoïdes), *NDR1*, *ICS2* et *CAMTA3* (impliqués majoritairement dans la voie SA) sont induits chez le mutant *K.D. prr2.1* et réprimés chez le sauvage Col0 et le surexprimeur *P35S::PRR2.2* à 1h. On note également une induction plus importante du gène *WRKY70* de sénescence chez le mutant comparativement au Wt et au surexprimeur. Pour le groupe **b**, aucune différence significative n'est observée dans le profil d'expression des gènes IV à IIX. On note cependant des gènes plus fortement exprimés chez le surexprimeur *PRR2* et le Wt par rapport au mutant tels que les gènes des voies A/ET : *NPR3*, *EDS5*, *ACS2*, *PR1* (groupe I), *AOC2*, *MYB75* et *PR2* (groupe II) et des gènes de la voie SA ou associés à la sénescence plus fortement exprimés chez le surexprimeur uniquement par rapport aux deux autres génotypes tels que *WRKY54*, *ICS2* et *CAMTA3*. Dans le groupe **c**, il apparaît qu'un grand nombre de gènes sont plus fortement exprimés chez le mutant par rapport aux deux autres génotypes, c'est le cas de tous les gènes des groupes II, III, VI et IIX et de la majorité des gènes des autres groupes. Ainsi, entre 1h et 3h après infection par le pathogène, les génotypes *PRR2* présentent des profils d'expression relativement similaires mis à part pour certains gènes principalement impliqués dans les voies de signalisation hormonale. A 6h, il semblerait qu'un grand nombre de gènes impliqués de manière générale dans les processus de défense et dans les voies de signalisation hormonale sont induits chez le mutant en réponse à *Pst* DC3000.

Lorsqu'on s'intéresse à des points cinétiques tardifs, on obtient des différences plus marquées entre les profils d'expressions des génotypes *PRR2* qui se retrouvent dans des groupes différents. Le groupe **d** rassemble uniquement les profils d'expression de Col0 à 9h et 12h qui présentent de fortes similarités, avec une induction des gènes qui est parfois plus forte à 12h pour certains gènes, ce qui est cohérent avec les données d'expression publiées dans la littérature. Le **groupe e** rassemble les profils d'expression des gènes dérégulés chez le mutant à 9h, 12h et 24h après infection et ceux du surexprimeur à 12h post-infection. A 12h *PRR2* n'aurait donc pas d'effet majeur sur la régulation de l'expression génique puisque le mutant et le surexprimeur présentent le même comportement. Le **groupe f** est constitué de des génotypes Col à 24h et du génotype *p35S::PRR2.2* à 9h et 24h. Certains profils d'expression de gènes sont donc similaires entre le Wt et le surexprimeur à des temps tardifs après infection par *Pst* DC3000 .

Nous nous sommes intéressés aux gènes les plus distants entre les génotypes pour le point cinétique 9h. On remarque qu'un certain nombre de gènes des voies hormonales SA/ET sont fortement induits chez le surexprimeur par rapport au mutant et au Wt, c'est le cas notamment des gènes *TRHX5*, *NPR3*, et *ACS2*. D'autres transcrits au contraire s'accumulent préférentiellement chez le mutant, c'est

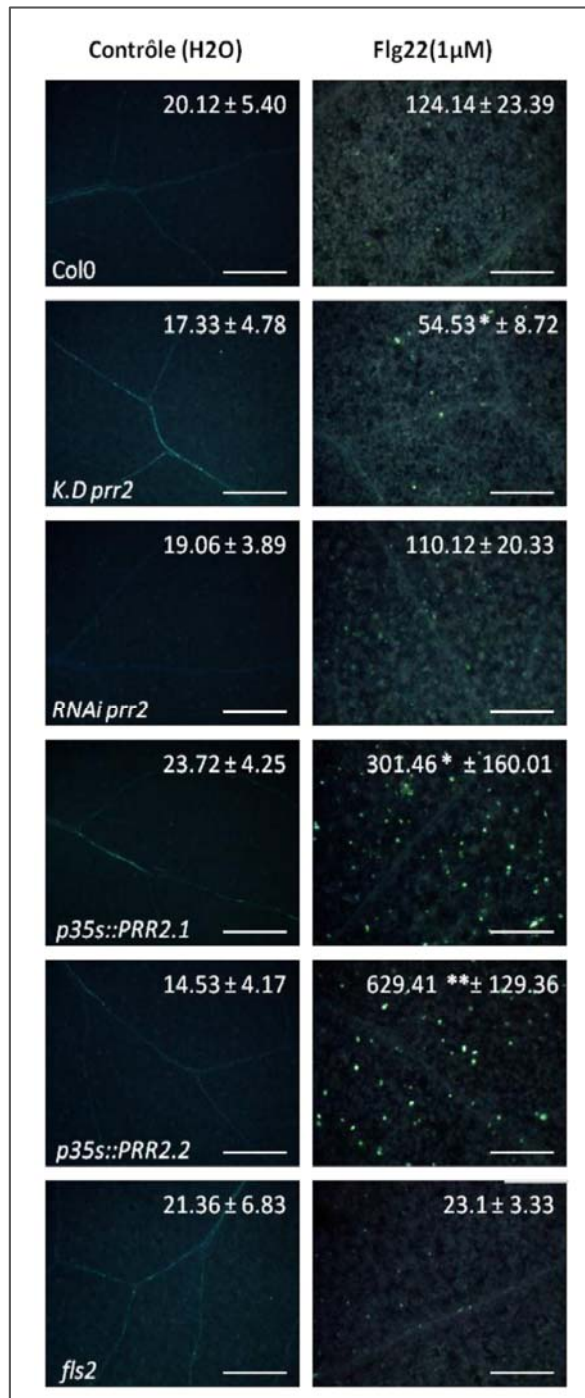


Figure II.18: Accumulation de papilles de callose en réponse à la flagelline (flg22) chez les lignées transgéniques PRR2

Les photographies ci-dessus présentent les différences morphologiques et quantitatives entre les papilles de callose de cotylédons de plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* non traitées (à gauche) et après 12h de traitement flg22 à 1µM (à droite). Les dépôts de callose apparaissent fluorescents après coloration des cotylédons au bleu d'Aniline et visualisation sous filtre DAPI. Les valeurs indiquent la surface moyenne de callose par cotylédon (\pm SEM) quantifiée à l'aide du logiciel image J. Les quantifications ont été réalisées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants par génotype (contrôle et traitement flg22, $n > 10$ pour chaque réplicat indépendant). Les étoiles (*) représentent les différences significatives dans l'accumulation de dépôts de callose entre le Wt (Col0) et les lignées transgéniques PRR2. Les différences significatives ont été déterminées d'après une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Newman-Keuls (*) indique une différence significative en comparaison au Wt pour une p -value < 0.05 , ** indique une différence significative en comparaison au Wt pour une p -value < 0.01). Echelle: 190,3 µm.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

le cas pour les gènes impliqués dans des voies hormonales (*TGA6*, *WRKY54*), dans les réponses de défense (*DEFL*, *PMR4*) et dans les réponses au stress de manière générales (*DFR*).

Après d'12H d'infection par l'agent pathogène bactérien, on relève uniquement deux gènes, impliqués dans des voies hormonales dépendantes du SA/JA, qui sont induits très fortement chez le surexprimeur *PRR2* et réprimés chez le mutant (*TRHX5*, *CYP81D11*). On remarque aussi qu'un certain nombre de gènes des voies SA/JA (*COI1*, *JAR1*, *TGA3*) et des gènes de défense (*DEFL*, *EFR*, *BIK1*) sont induits à la fois chez le mutant et le surexprimeur et réprimés chez le Wt.

Lorsqu'on s'intéresse aux gènes dérégulés 24h après infection, un grand nombre de gènes de la voie du SA apparaissent induits plus fortement chez le surexprimeur et le Wt comparativement au mutant (*TRHX5*, *NPR3*, *ACS2*, *EDS5*, *TGA3*, *SAG101*). A l'inverse, les gènes des voies SA/JA (*CYP82C2*, *COI1*, *JAR1*, *NIMIN1*, *ICS1*, *TGA2*) et certains gènes de stress et de défense (*DFR*, *FRK1*) sont induits plus fortement chez le mutant à 24h.

En conséquence, l'ensemble de ces données nous a permis de mettre en évidence que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme hormonal est considérablement affectée par la perte ou la surexpression de *PRR2* en réponse à *Pst* DC3000. Il apparaît difficile cependant à la vue de cette analyse de déterminer avec précision l'effet (positif ou négatif) de *PRR2* sur la régulation de l'expression des gènes de la voie SA/JA en réponse à *Pst* DC3000. Ces résultats étaient attendus dans la mesure où il est bien connu que l'interaction plante-bactérie phytopathogène génère de profonds bouleversements du métabolisme de base de la plante hôte. Pour pouvoir étudier plus en détail l'effet de *PRR2* sur la régulation des gènes de défense et de réponse au SA/JA, nous avons donc choisi de réaliser un transcriptome en conditions simplifiées par un traitement utilisant la flagelline. Les travaux réalisés en réponse à la flagelline sont présentés dans la partie suivante.

2. Est-ce que les lignées altérées dans l'expression de *PRR2* présentent des altérations majeures de l'expression génique en réponse à la flg22 ?

2.1 Les génotypes *PRR2* présentent des altérations de l'expression de gènes marqueurs de la voie flg22 en réponse à un traitement par ce PAMP

La perception de la flg22 entraîne des altérations à l'échelle cellulaire mais aussi à l'échelle moléculaire qui se manifestent par des changements majeurs de l'expression génique (Zipfel et al., 2004; Denoux et al., 2008). Afin de savoir s'il est pertinent de réaliser une analyse transcriptomique, des tests préliminaires ont été menés sur des gènes connus pour être induits en réponse à la flg22. Des analyses de RT-PCR quantitative ont ainsi été réalisées à partir de plantules des génotypes *PRR2* à différents temps après traitement, et ce pour plusieurs gènes dont l'expression est bien connue pour être altérée de manière FLS2 dépendante en réponse à la flg22 (**figure II.20**), comme *FRK1* et *WRKY29*, qui sont décrits comme étant dérégulés rapidement en réponse à une application exogène de flg22. Il apparaît que *FRK1* est induit fortement et transitoirement entre 3h et 12h, avec une expression particulièrement forte 6h post-traitement flg22 chez le Wt Col0 (**figure II.20a**). Chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*, *FRK1* est exprimé fortement et transitoirement comme le Wt mais plus

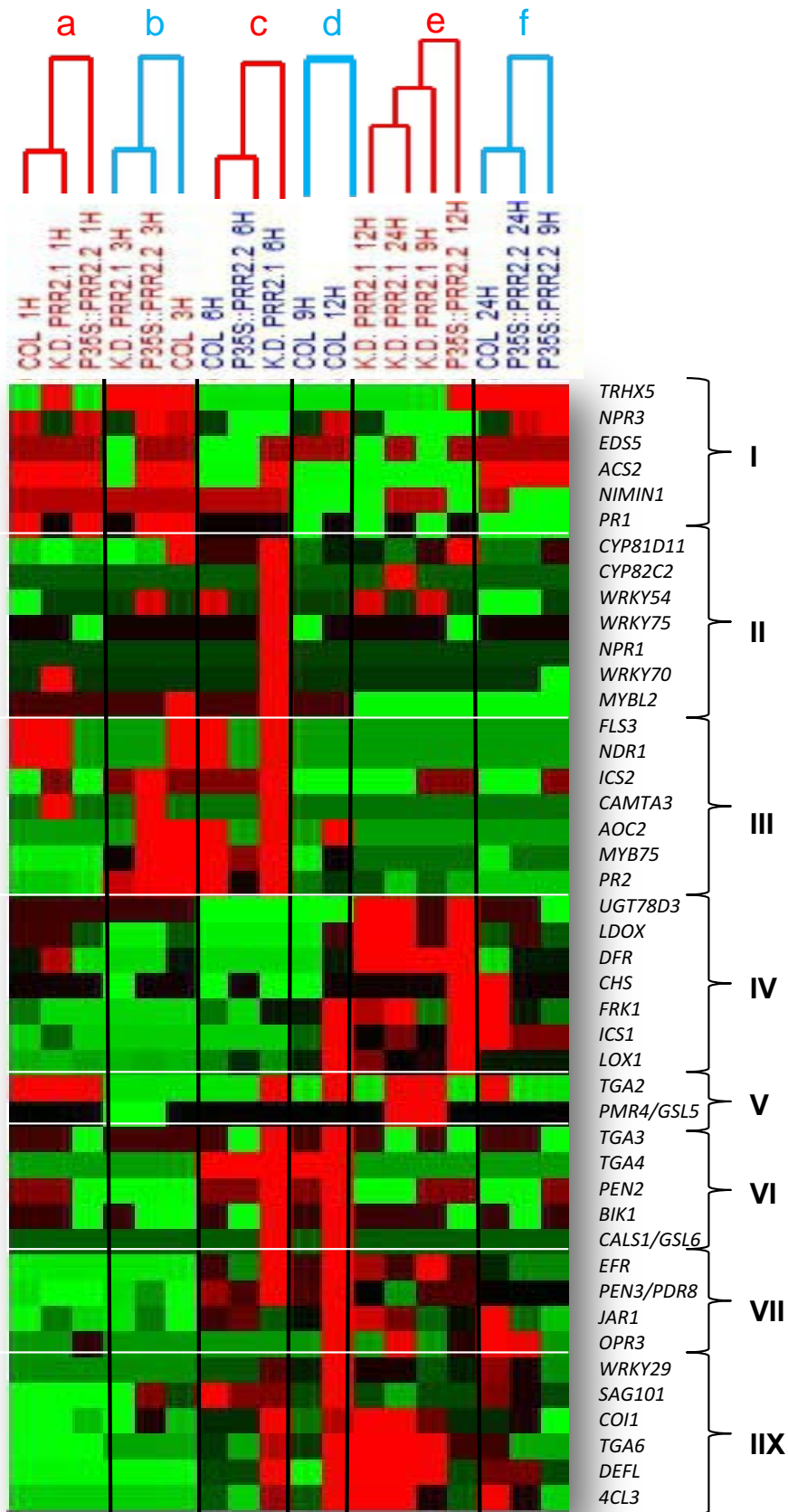


Figure II.19: Dendrogramme hiérarchique de l'expression des gènes au sein des génotypes PRR2 au cours du temps après une infection par *Pst* DC3000.

Dendrogramme hiérarchique du profil d'expression des gènes analysés par HCE3.5 après quantification par la technologie Biomarck, Fluidigm®. Les plantes d'*Arabidopsis* des génotypes Col0, *K.D. prr2.1* et *p35s::PRR2.2* ont été infectées par la bactérie *Pst* DC3000 ou traitées dans des conditions contrôles (mock) à T0, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Après analyse RT-qPCR à haut débit, les ratios d'induction au cours du temps sont analysés, transformés en données logarithmiques et classés en différents groupes selon le coefficient de corrélation de Bravais-Pearson. Les analyses ont été effectuées sur au moins 3 réplicats biologiques indépendants.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

précocement puisque l'expression du gène est plus élevée entre 1h et 12h avec un pic d'expression à 3h. *A contrario*, *FRK1* présente une expression plus faible entre 1h et 12h après traitement flg22 chez le *K.D.prr2.1* en comparaison du Wt. *WRKY29* est aussi exprimé chez la lignée *p35S::PRR2* 3h après traitement avec un niveau d'induction 5 fois plus important comparativement au Wt (**figure II.20b**). Par contre, ce gène n'est pas exprimé de manière significativement différente chez le *K.D. prr2.1* par rapport au Wt. *BIK1* et *EFR* (**figure II.20c et d**) sont aussi connus pour être impliqués dans des voies flg22 de manière FLS2 et EFR dépendante. Bien que PRR2 semble ne pas être impliqué dans la mise en place des réponses à elf18 (données non illustrées), ces gènes sont induits plus fortement et de manière rapide et transitoire 1h après traitement par la flg22 chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* comparativement au Wt. Aucune différence significative dans l'expression de ces gènes n'est observée chez le mutant *K.D. prr2.1* comparativement au Wt. L'expression de gènes marqueurs de défense induits tardivement généralement entre 12h et 24h en réponse à la flg22 tels que *PR2* et *PR3*, a aussi été examinée sur une fenêtre de 6h à 24h après traitement par la flg22 (**figure II.20e et f**). Aucune différence significative dans l'accumulation des transcrits de ces gènes entre le Wt et le mutant *K.D. prr2.1* n'est observée mais une induction significativement plus forte de l'expression de ces gènes chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* par rapport au WT est montrée. **L'ensemble de ces résultats indique que PRR2 exercerait un rôle positif sur la régulation de l'expression de gènes de défense induits de manière FLS2 dépendante en réponse à la flg22**

2.2 Analyse du transcriptome chez les lignées PRR2 en réponse à la flg22

2.2.1. Analyse de l'expression génique par l'approche CATMA

L'analyse transcriptomique adoptée dans ce travail de thèse se base sur la technologie CATMA pour *Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray*. Ce type de puce à ADN bi-couleur est proposé par l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France). A l'origine, les lames étaient constituées de sondes ADN double brin issues de l'amplification PCR de fragments de gènes d'une taille de 150 à 600nt choisis pour être les plus spécifiques possibles (GSTs pour *Gene Specific Tag*) des gènes identifiés sur la base de l'annotation complète du génome nucléaire d'*Arabidopsis* rendue disponible par EuGène (21,120 *in silico* GSTs, version 1). Puis la collection s'est élargie avec plus de 13000 sondes supplémentaires apportées par les bases TIGR (TIGR5), Eugène et TAIR6. La plateforme de L'URGV prépare aujourd'hui les lames CATMA contenant chacune 34660 spots (version 5). Les positions des GSTs sont accessibles via le Web sur la base de données FLAGdb⁺⁺:

<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>.

2.2.2 PRR2 et expression des gènes impliqués dans des voies de défense en réponse à la flg22

Nous avons examiné l'effet de PRR2 sur la modulation de l'expression génique en réponse à la flg22 en comparant le transcriptome de plantules des différentes lignées *PRR2* 30 min après une application exogène de flg22 à 1µM. Les puces ont été hybridées avec des cDNAs provenant des 3 génotypes Wt (Col0), *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*. Pour chacun des génotypes les ADNcs issus de

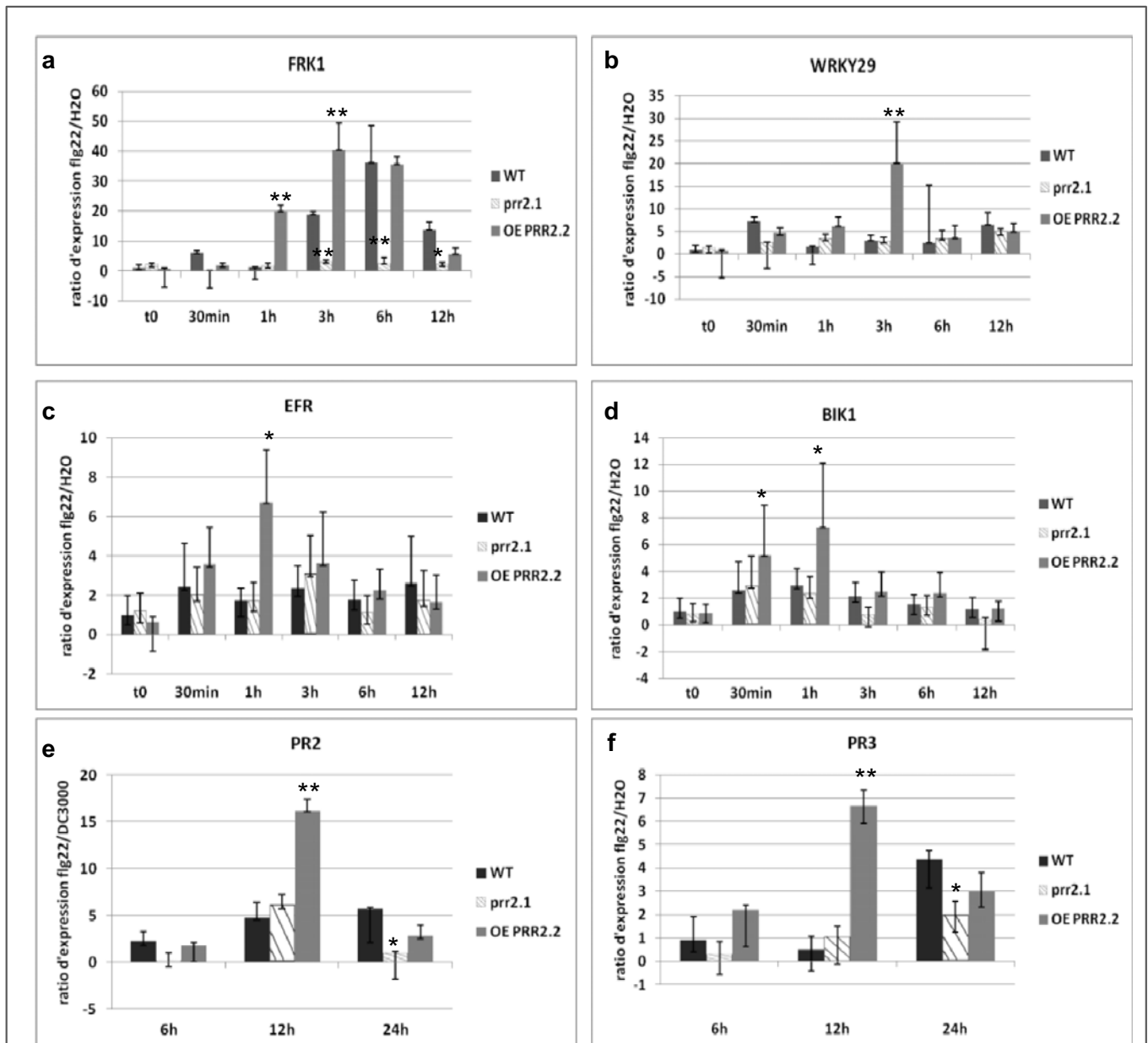


Figure II.20: Profil d'expression de gènes marqueurs de défense associés à la flagelline (flg22) examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes FRK1(a), WRKY29 (b), EFR (c), BIK1 (d), PR2 (e) et PR3 (f) dans les génotypes Wt (*col0*), *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été élicitées avec 1 μm de flg22 puis récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h après traitement. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène en réponse à la flg22 par rapport à l'expression en conditions contrôles (H2O) a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomark®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatives respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (** *p-value* < 0.01, * *p-value* < 0.05).

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

plantules traitées à la flg22 et non traitées (contrôles) ont été hybridés sur une même puce après marquage au Cy3 ou au Cy5. Trois réplicats biologiques ont été réalisés pour chaque génotype et pour chaque traitement, deux réplicats techniques (*dye-swap*) ont été réalisés par puce. Après normalisation des données, les gènes différentiellement exprimés de manière significative (p -value <0.01) par rapport à la condition contrôle sont déterminés à l'aide d'un test corrigé par la procédure de de Benjamini & Hochberg afin de contrôler la FDR (False Discovery Rate). Lorsque l'on considère les gènes significativement dérégulés en réponse à l'application de flg22 par rapport à la condition contrôle (**figure II.21a**), 3858 gènes sont dérégulés de manière différentielle chez le Wt, 6900 sont dérégulés chez le *K.D. prr2.1* et 7754 sont dérégulés chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*. Un critère supplémentaire prenant en compte un rapport d'expression supérieur à 4 a été appliqué pour sélectionner les gènes induits ou réprimés de manière très significative (**figure II.21b**). Sur les 657 gènes présentant un différentiel d'expression supérieur à 4, 634 gènes sont dérégulés chez le Wt, 397 gènes chez le mutant et 450 gènes chez le surexprimeur *PRR2*. La validité des résultats de cette analyse a été évaluée de manière indépendante par RT-qPCR sur un ensemble de gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique globale (**figure II.21c**). La comparaison des données d'expression obtenues en RT-qPCR avec celles de l'analyse transcriptomique globale montre qu'il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes bien que le niveau d'expression génique soit plus faible pour l'analyse transcriptomique, ce qui est généralement le cas pour ce type d'approche.

Cette analyse permet de valider les données d'expression issues de l'approche transcriptomique globale et offre la possibilité d'évaluer l'effet de PRR2 en comparant le profil d'expression des gènes dérégulés chez les trois génotypes Wt, *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*. Une classification hiérarchique des 657 gènes dérégulés, regroupant les gènes ayant des profils d'expressions similaires a été réalisé à l'aide de la méthode UPGMA en considérant le coefficient de corrélation de Bravais Pearson comme indice de similarité (**figure II.22**). Sept groupes (ou clusters) ont été identifiés par cette méthode. Les gènes appartenant à chaque cluster ont été classés selon l'annotation de GENE ONTOLOGY (GO) avec le logiciel *Generic GO Term Finder* (Boyle, 2004). Dans cette ontologie, les gènes sont annotés selon 3 critères (biological process, molecular function et cellular component) divisés en différentes classes. Pour les différents clusters de gènes, l'analyse de leur répartition en classes de GO permet une meilleure interprétation des groupes de gènes ayant des profils d'expression similaires. De plus, la proportion des gènes appartenant aux différentes classes peut aussi être comparée entre l'ensemble des gènes dérégulés par la flg22 et l'ensemble du génome d'*Arabidopsis*. (**table S2, données supplémentaires**). Ces deux données prises en compte donnent une bonne indication des catégories de gènes jouant un rôle important dans la réponse à flg22. Le cluster 1 rassemble 22 gènes fortement induits à la fois chez le *K.D. prr2.1* et le surexprimeur et plus faiblement induits voire réprimés chez le Wt. Le cluster 2 regroupe 42 gènes plus fortement induits chez le mutant par rapport au surexprimeur *p35S::PRR2.2* et au WT, qui présentent un profil d'expression assez similaire. D'après leur annotation GO, les gènes des clusters 1 et 2 correspondent principalement à des gènes de réponse au stress. Le cluster 3 est constitué de 142 gènes sur lesquels PRR2 n'a pas d'effet puisqu'ils présentent le même comportement chez les trois génotypes étudiés. Les gènes du cluster 3 sont aussi impliqués dans les réponses au stress et plus particulièrement dans les réponses de défense. Ces gènes codent pour des kinases telles que les protéines membranaires à motifs LRRs, des RLKs (RLK1, RLK3), et les protéines de la voie MAPK (MPK3, MPK5, MPK11) qui permettent la transduction de signaux très en amont dans la voie de signalisation flg22. Les analyses du cluster 3 nous indiquent que PRR2 n'est pas un régulateur de l'expression des gènes impliqués

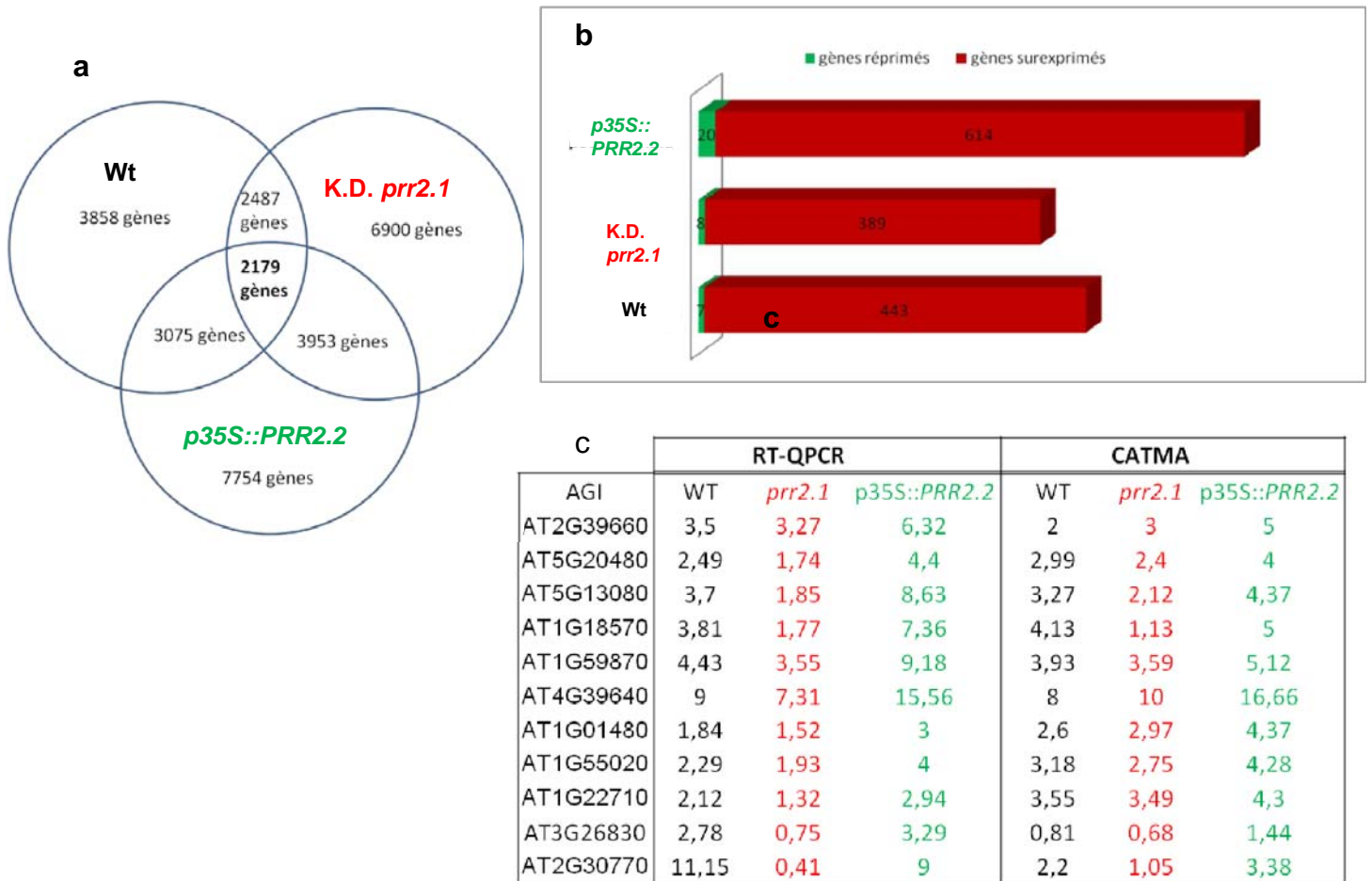


Figure II.21: Illustration des résultats de l'analyse transcriptomique 30min effectuées en réponse à la flagelline (flg22) chez les génotypes *PRR2*.

a. Diagramme de Venn représentant les gènes dérégulés 30min après traitement par la flagelline (flg22) chez les génotypes *PRR2*. Le nombre de gènes représente les transcrits différentiellement exprimés (p -value <0.01 , procédure de Benjamini et Hochberg) chez le Wt, le K.D. *prr2.1* et la lignée transgénique *p35S::PRR2.2*. 3 réplicats biologiques ont été réalisés par puce. Les gènes exprimés de manière différentielle (p -value <0.01) par rapport à la condition contrôle sont déterminés d'après la statistique t (de Student) corrigée avec un test de correction multiple de type FDR (False Discovery Rate, procédure de Benjamini et Hochberg).

b. Représentation graphique du nombre de gènes significativement différentiellement exprimés en réponse à la flagelline (flg22). Nombre de gènes significativement induits (en rouge) ou réprimés (en vert) chez les lignées *PRR2* 30 min après traitement flg22. Pour être considéré comme significativement exprimé, la p -value <0.01 et l'accumulation de transcrit représente au moins un fold-change de 4 par rapport à la condition contrôle. La figure est basée sur 3 réplicats biologiques indépendants.

c. Validation de certains des gènes par RT-qPCR. Tableau illustrant la comparaison des résultats obtenus par RT-qPCR et par microarray CATMA. La régulation de l'expression de gènes de réponse à la flg22 dérégulés chez les lignées *PRR2* a été évaluée pour un certain nombre de gènes en utilisant une approche transcriptomique globale de type CATMA et par RT-qPCR. Des primers spécifiques ont été désignés pour tous les gènes et les analyses de RT-qPCR ont été réalisées en prenant deux gènes contrôles comme référence, l'actine 8 et l'ubiquitine 10. Les ratios d'expression/ contrôle présentés dans cette figure ont été calculés à partir de 3 expériences indépendantes.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

dans la voie MAPK 30 min après traitement flg22. Le cluster 4 est composé de 23 gènes qui sont indépendants de PRR2 puisque ceux-ci sont réprimés à la fois chez le *K.D. prr2.1* et le surexprimeur *p35S::PRR2.2* (par rapport au Wt). Ces gènes codent pour des protéines de fonctions variées impliquées dans les réponses au stress dont certaines réponses immunes. Dans le cluster 5 sont regroupés 104 gènes induits chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* et le Wt mais réprimés chez le *K.D. prr2.1*. Ces gènes pour la grande majorité codent des facteurs de transcription ou des régulateurs transcriptionnels impliqués dans les réponses immunes. Ce cluster comprend notamment un grand nombre de facteurs de transcription de type WRKY bien connus comme *WRKY72*, *WRKY11* impliqués dans la mise en place des réponses de défense basale (Bhattarai et al., 2010; Journot-Catalino et al., 2006) et un grand nombre de protéines de dégradation associées à des complexes ubiquitine ligase en réponse aux PAMPs tels que *PUB23*, *PUB24* (Trujillo et al., 2008). Ces résultats indiquent qu'à 30 min PRR2 exercerait plutôt un contrôle sur l'expression de gènes situés plus en aval dans la signalisation flg22. Le cluster 6 est composé de 108 gènes qui présentent les mêmes profils que le cluster 5 mais avec une répression plus forte chez le *K.D. prr2.1* et une induction plus faible chez le *p35S::PRR2.2* et le Wt. Parmi ces gènes, on retrouve des kinases de type LRR-RLKs comme *IOS1* impliqué dans les réponses de défense contre des pathogènes biotrophes (Hok et al., 2011) et *EFR* dont le rôle est bien connu dans les réponses aux PAMPs (Zipfel et al., 2006). D'autres gènes bien caractérisés pour leur rôle dans la défense comme *NDR1*, *RPS2*, *NHL3* sont présents dans ce cluster ainsi qu'un grand nombre de régulateurs transcriptionnels impliqués dans les réponses au stress et en particulier dans les réponses immunes comme *WRKY48*, *WRKY6* et *PUB22* impliqués dans des réponses de défense dépendantes du SA (Xing et al., 2008; Trujillo et al., 2008) ou au cours de la mort cellulaire comme *CAD1*, *PLP2*. On retrouve aussi dans ce cluster des gènes associés à la biosynthèse de glucosinolates comme *CYP81F2*, *MYB51* et *PEN3*. Ces résultats indiquent que PRR2 exercerait non seulement un effet régulateur sur l'expression d'un grand nombre de régulateurs transcriptionnels mais aussi un effet sur l'expression de gènes de la voie des glucosinolates. Enfin, le cluster 7 regroupe 198 gènes qui sont réprimés chez le *K.D. prr2.1* et le Wt par rapport au surexprimeur *p35S::PRR2.2*. Ces gènes sont majoritairement impliqués dans les réponses immunes, au cours de la mort cellulaire et au cours du métabolisme secondaire. On retrouve parmi ces gènes des protéines kinases impliquées dans la transduction de signaux comme *BIK1*, *PEPR2*, *AP2C2* mais aussi des régulateurs transcriptionnels comme *JAZ*, *GRX80*, *GRX480*, *WRKY33* impliqués dans la régulation des mécanismes de défense dépendants de la signalisation JA et SA (Pieterse et al., 2012; Birkenbihl et al., 2012). L'analyse de la fonction des gènes de ce cluster suggère que PRR2 pourrait être un régulateur de l'expression de gènes impliqués dans des réponses de défense dépendantes du SA et du JA.

Un intérêt particulier a été porté aux gènes qui présentent un profil dérégulé de manière inverse entre le *K.D. prr2.1* et le surexprimeur *p35S::PRR2.2* par rapport au Wt. En effet, ces gènes sont *a priori* les plus directement affectés par PRR2. Ainsi, 104 gènes apparaissent régulés de manière opposée chez le *K.D. prr2.1* et le surexprimeur *p35S::PRR2.2*, dont 68 gènes induits chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* et réprimés chez le *K.D. prr2.1* et 36 gènes induits chez le *K.D. prr2.1* et réprimés chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*.

L'analyse de la fonction de ces gènes et la réalisation de leur profil d'expression en RT-qPCR sur une cinétique de 24h en réponse à la flg22 nous a permis de mettre en évidence que PRR2 exerce un contrôle sur la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation SA (1), au cours du stress oxydatif (2) et dans la voie des glucosinolates (3).

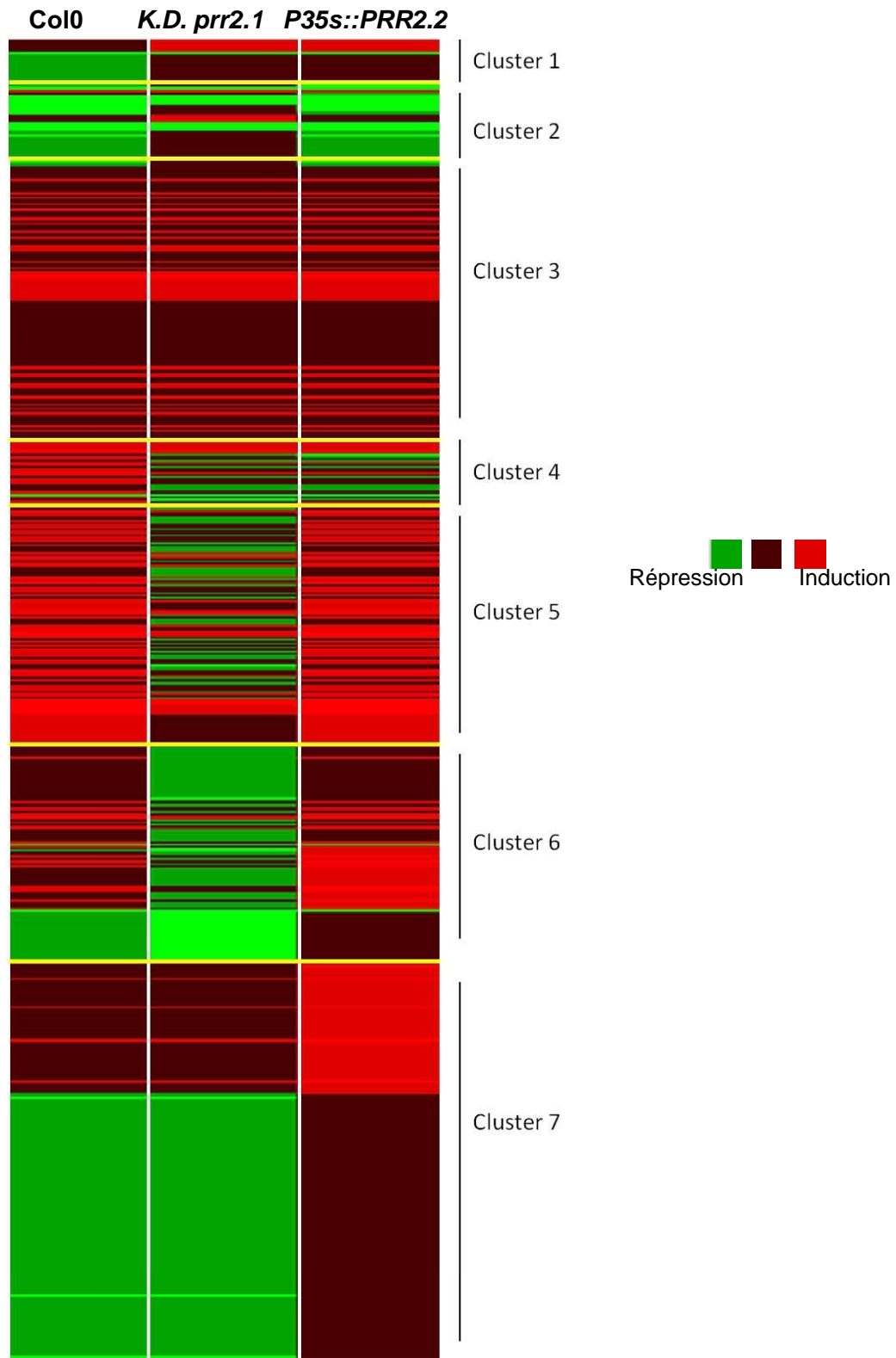


Figure II.22: Clustering hiérarchique des gènes dérégulés chez les génotypes *PRR2* en réponse à la flg22

Dendrogramme hiérarchique du profil d'expression des gènes issus de l'analyse transcriptomique CATMA analysés par HCE3.5. Les plantes *d'Arabidopsis* des génotypes Col0, *K.D. prr2.1* et *p35s::PRR2.2* ont été traitées par la flg22 ou traitées dans des conditions contrôles (mock) à T0, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Après analyse RT-qPCR à haut débit, les ratios d'induction au cours du temps sont analysés, transformés en données logarithmiques et classés en différents groupes selon le coefficient de corrélation de Bravais-Pearson. Les analyses ont été effectuées sur au moins 3 réplicats biologiques indépendants.

2.2.2.1. PRR2, un régulateur de l'expression des gènes impliqués dans des voies de signalisation SA en réponse à la flg22?

Nous avons identifié plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans des voies hormonales de défense parmi les gènes inversement dérégulés entre les génotypes PRR2 en réponse à la flg22 dans l'analyse transcriptomique globale. Ainsi, le profil d'expression détaillé de certains gènes clefs de la voie de biosynthèse et de signalisation SA et du JA sur une cinétique de 24h en réponse à la flg22 a été réalisé. Il est bien connu que *EDS5/SID1*, *SID2/ICS1*, *EDS1*, *PAD4* sont des gènes clefs de la biosynthèse du SA en réponse à la flg22 (Pieterse et al., 2012). L'analyse du profil d'expression du gène *EDS5* révèle des différences significatives dans l'accumulation de ce transcrite entre les génotypes PRR2 (**figure II.23a**). En effet, l'induction du gène *EDS5* est significativement plus importante chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* par rapport au Wt entre 1h et 6h après traitement par la flg22 alors que le *K.D. prr2.1* présente le même profil d'expression que le Wt. Les mêmes tendances sont observées pour le gène *PAD4* entre 1h et 3h post-traitement flg22 (**figure II.23b**). Cependant, concernant les gènes *ICS1* et *EDS1* aucune différence significative n'a été observée entre les différentes lignées PRR2 (**figure II.23c et d**). De plus, cette analyse cinétique ne montre pas de dérégulation de l'expression du gène *PR1*. Ces résultats indiquent que PRR2 régulerait de manière sélective l'expression des gènes de biosynthèse et de signalisation SA en réponse à la flg22. Le profil d'expression des gènes clefs de la production de JA, ceux de la production d'ET ainsi que les gènes impliqués dans les voies JA/ET a aussi été réalisé, cependant aucune différence significative dans l'expression de ces gènes n'a été observée entre les génotypes PRR2 (données non illustrées). **Ces données nous indiquent que PRR2 ne serait pas impliqué dans la régulation de l'expression des gènes clefs des voies JA et ET en réponse à la flg22.**

2.2.2.2. PRR2, un régulateur des processus associés au stress oxydatif en réponse à la flg22?

Parmi les gènes induits chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* et réprimés chez le *K.D. prr2.1* en réponse à la flg22, on compte un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif comme *NADK1* (NAD KINASE 1) et *PER4* (PEROXIDASE 4), deux régulateurs du stress oxydatif en réponse aux pathogènes (Berrin, 2005; Singh, 2012), mais un grand nombre de gènes codant des FAD binding proteins connues pour réguler le stress oxydatif et certains facteurs de transcription comme *WRKY6* et *WRKY75* impliqués dans la mise en place de la sénescence et de la régulation des processus oxydatifs en réponse aux pathogènes (Robatzek and Somssich, 2001; Li et al., 2012). Les profils d'expression de gènes clefs impliqués dans la régulation du stress oxydatif en réponse aux pathogènes comme *WRKY53*, *WRKY70*, *SAG101* ainsi que le profil d'expression de *WRKY6* et *WRKY75* sur une cinétique de 24h en réponse à la flg22 a été réalisé. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les génotypes PRR2 pour les régulateurs clefs *WRKY53*, *WRKY70*, *SAG101* (données non illustrées) en réponse à la flg22 aux points cinétiques étudiés. Entre 30min et 12h après traitement flg22, on observe cependant une forte induction rapide et transitoire des gènes *WRKY75* (**figure II.24a**) et *WRKY6* (**figure II.24b**) chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*.

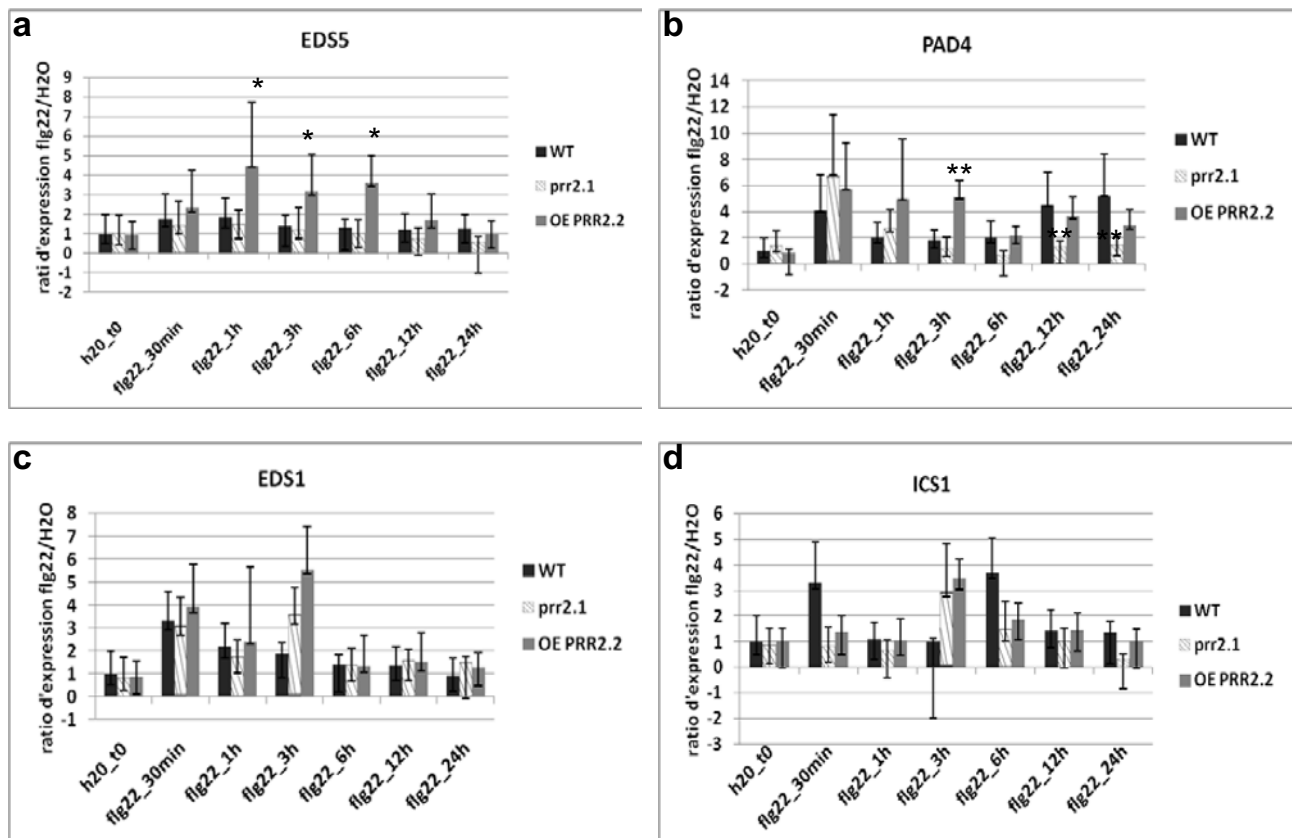


Figure II.23: Profil d'expression de gènes de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) en réponse à la flagelline (flg22) examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes *EDS5* (a), *PAD4* (b), *EDS1* (c), *ICS1* (d) et *PR2* (e) dans les génotypes Wt (*col0*), *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été élicitées avec 1 μ m de flg22 puis récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h après traitement. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène en réponse à la flg22 par rapport à l'expression en conditions contrôles (H2O) a été déterminée par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomark®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatifs respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* *p-value* <0.01; . *p-value* <0.05).

2.2.2.3 PRR2, un régulateur positif de la voie des glucosinolates, de la camalexine et de la production de papilles de callose en réponse à la flg22?

L'analyse globale CATMA suggère que PRR2 jouerait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de la voie des glucosinolates puisque l'expression des trois gènes clefs de la voie de biosynthèse de ces composés *PEN3*, *CYP81F2* et *MYB51* (Clay et al., 2009) est altérée chez les génotypes *PRR2* en réponse à la flg22. Le profil d'expression détaillé de ces gènes a été examiné (figure II.25). L'expression de *MYB51* et *CYP81F2*, des gènes situés en amont de la biosynthèse de glucosinolates, de la camalexine et de la callose est augmentée chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* par rapport au Wt entre 30 min et 3h après traitement flg22 avec un pic d'induction à 1h (figure II.25a et b). Leur expression est réduite chez le *K.D. prr2.1* par rapport au Wt 30 min post-élicitation et reste faible pour les autres points de la cinétique. Il apparaît ainsi que PRR2 serait un acteur la régulation de la production de ces composés en réponse à la flg22. Pour mieux comprendre quels sont les processus biologiques régulés par PRR2 en réponse aux PAMPs, les profils d'expression de *PEN2* et *PEN3* (figure II.25c et d), deux gènes au carrefour de la production de callose et de glucosinolates en réponse à la flg22 (Clay et al., 2009), et *PMR4* (figure II.25e) bien connu pour être impliqué dans la biosynthèse de callose en réponse aux pathogènes (Jacobs et al., 2003), *GGT1* et *CYP71A13* (figure II.25f et g) décrits pour leur rôle dans la production de camalexine chez *Arabidopsis* en réponse à *P.syringae* ont été analysés. Les transcrits *PEN2* et *PEN3* s'accumulent de manière similaire après traitement par la flg22. Bien que l'expression de ces deux gènes ne soit pas significativement différente entre le *K.D. prr2.1* et le Wt, une induction importante est observée chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* 1h post-traitement flg22. Aucune différence significative entre les lignées *PRR2* n'a pu être mise en évidence dans l'accumulation des transcrits des gènes de biosynthèse de la callose *PMR4* et *GSL6*. PRR2 ne semble donc pas impliqué dans la régulation de la production de callose modulée par ces deux gènes. Parmi les gènes les plus fortement dérégulés, il apparaît que les gènes impliqués dans la biosynthèse de camalexine sont fortement altérés chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*. En effet, une induction 4 à 8 fois supérieure de l'expression de *CYP71A13* est observée par rapport au Wt. *GGT1* présente également une expression 2 à 4 fois supérieure chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* entre 30min et 6h après traitement flg22. **L'ensemble de ces résultats indiqueraient que PRR2 exerce un contrôle sur la voie des glucosinolates et de la camalexine en réponse à la flg22.**

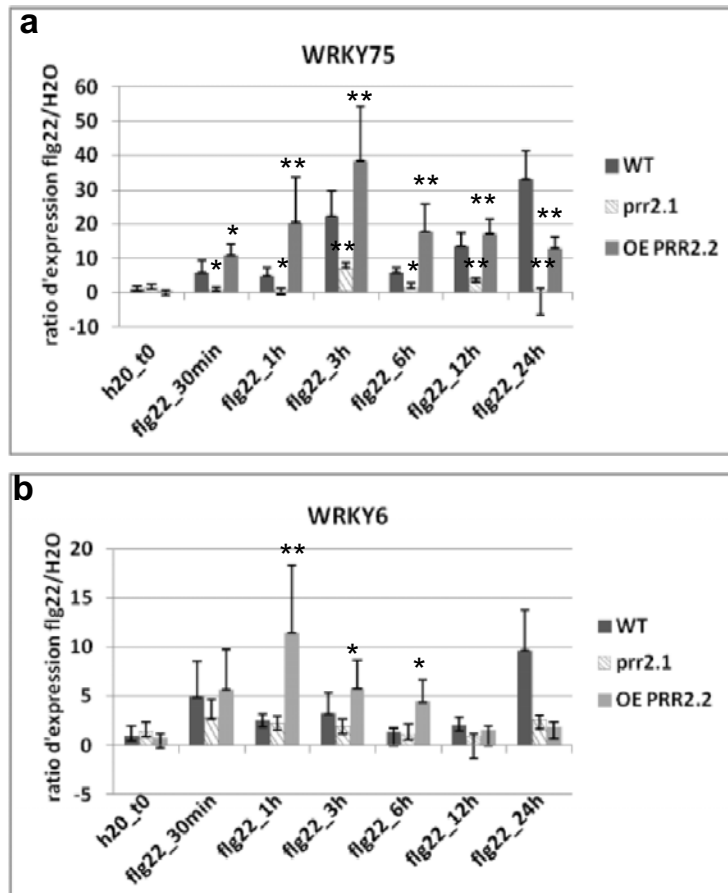


Figure II.24: Profil d'expression de facteurs de transcription WRKY impliqués au cours du stress oxydatif en réponse à la flagelline (flg22) examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes WRKY75 (a), WRKY6 (b) dans les génotypes Wt (*col0*), *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été élicitées avec 1 μ m de flg22 puis récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h après traitement. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène en réponse à la flg22 par rapport à l'expression en conditions contrôles (H2O) a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomarck®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatives respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* *p-value* <0.01; . *p-value* <0.05).

III. Est-ce que PRR2 régule d'autres fonctions au cours de la croissance et du développement?

Nos travaux ont démontré que PRR2 pourrait moduler le métabolisme secondaire en réponse à la flg22 et en réponse à *Pst* DC3000. Or, des travaux récents ont démontré qu'en plus de son implication en réponse aux pathogènes, PRR2 est aussi associé à la régulation du métabolisme secondaire au cours de la maturation du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum*, Pan et al., 2013). En effet, PRR2 est fortement exprimé dans le fruit de tomate au moment où le fruit commence à murir. Les fruits de tomates portés par des lignées transgéniques sur-exprimant PRR2 présentent des plastides dont le nombre, la taille et la quantité de pigment sont plus importantes par rapport à des plantes sauvages et dont l'expression de gènes impliqués dans les processus de maturation est dérégulée. Ces altérations sont responsables d'une augmentation de la quantité de chlorophylle dans les fruits encore verts et de la quantité de caroténoïdes dans les fruits murs. L'orthologue de PRR2 chez le poivron (*Capsicum annuum*) est aussi associé à l'accumulation de pigments au cours de la maturation du fruit, ce qui montre que la fonction de PRR2 est conservée entre les taxons (Pan et al., 2013). Nous avons donc recherché si PRR2 pouvait aussi être impliqué au cours du développement chez *Arabidopsis*. Bien que PRR2 soit fortement exprimé tout au long du développement végétatif, nous n'avons pas observé l'expression de ce gène au niveau des siliques. Nous avons donc réalisé une analyse transcriptomique chez les différentes lignées PRR2 (Wt, mutant *K.D. prr2.1* et *p35s::PRR2.2*) au stade plantule où l'on observe une forte expression du gène afin de mettre en évidence le régulon de PRR2.

1. Analyse transcriptomique globale

Nous avons ainsi réalisé un transcriptome CATMA[®] sur les deux lignées PRR2: *K.D.prr2.1* et *p35S::PRR2.2* au stade plantule. Les ADNcs des génotypes mutant *K.D. prr2.1* et Wt ont été hybridés sur une même puce ainsi que ceux du surexprimeur *p35S::PRR2.2* et du Wt (**figure II.26**). L'analyse statistique a été effectuée en triplicats, en prenant en considération les gènes dérégulés pour des p-values (BH) <0.01 (**figure II.26**). Ainsi 3259 gènes apparaissent significativement dérégulés chez le *K.D.prr2.1* par rapport à Col0 et 2122 gènes sont dérégulés chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* par rapport à Col0. Afin d'évaluer l'effet le plus direct de PRR2 sur la régulation génique, nous nous sommes focalisés sur les gènes inversement dérégulés. Pour valider et préciser le profil d'expression des gènes inversement dérégulés, nous avons choisi de réaliser le profil d'expression détaillé des gènes les plus fortement dérégulés par Rt-qPCR sur une cinétique de 0 à 24h afin de mettre en évidence si les dérégulations observées se maintiennent au cours du temps et sont ainsi bien la

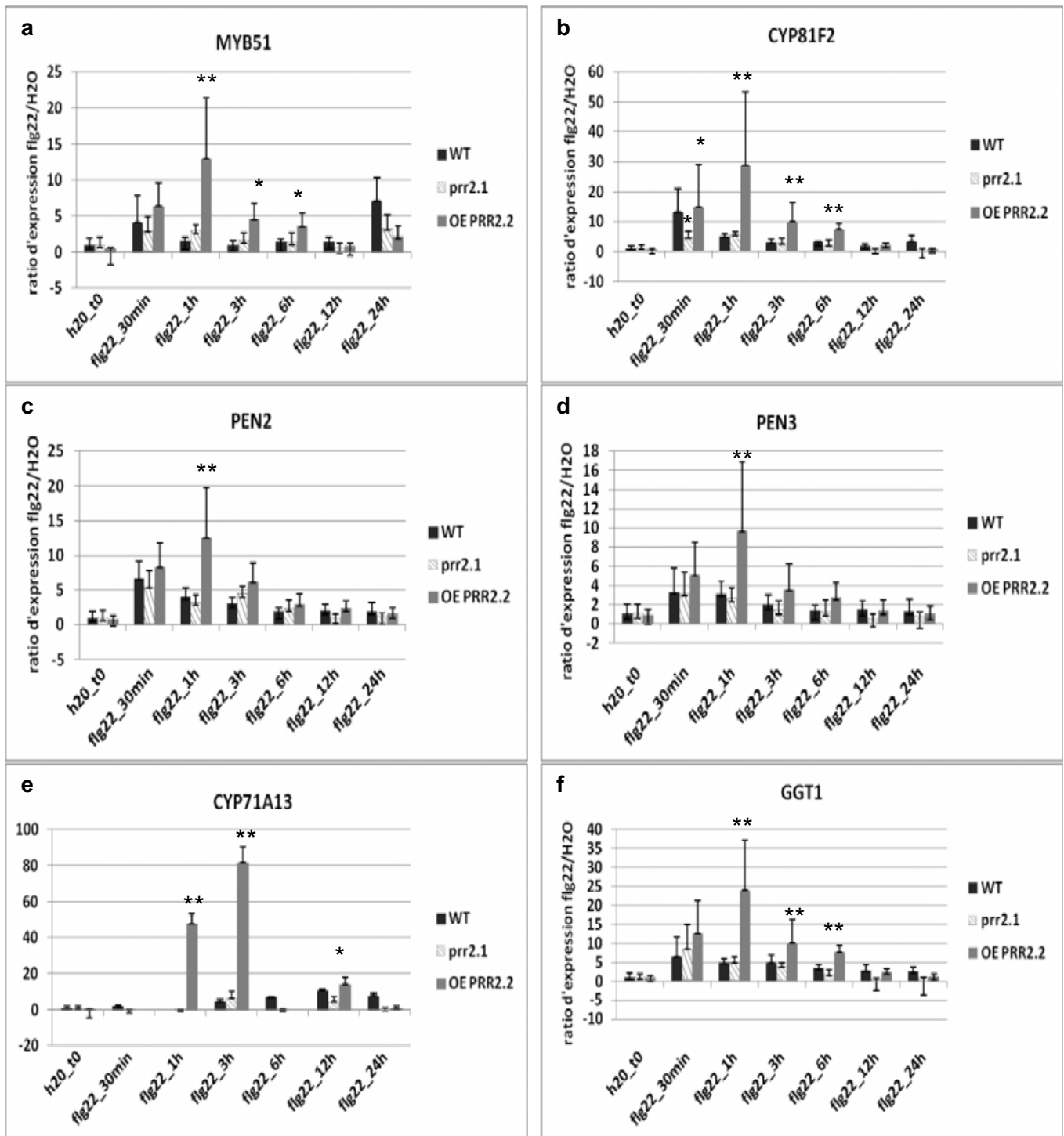


Figure II.25: Profil d'expression des gènes de la voie des glucosinolates et de la camalexine en réponse à la flagelline (flg22) examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes PEN2 (a), PEN3 (b), MYB51 (c), CYP181F2 (d), PMR4 (e), GGT1 (f) dans les génotypes *Wt* (*col0*), *K.D.prr2.1* et *p35S::PRR2.2*. Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été élicitées avec 1 μ m de flg22 puis récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h après traitement. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène en réponse à la flg22 par rapport à l'expression en conditions contrôles (H2O) a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomarck®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatifs respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* *p*-value <0.01; . *p*-value <0.05).

conséquence de la modulation du niveau d'expression de *PRR2*. Les résultats majeurs de ces analyses sont présentés dans les paragraphes suivants.

2. PRR2 régule les fonctions chloroplastiques et les processus de sénescence au cours de la croissance et du développement

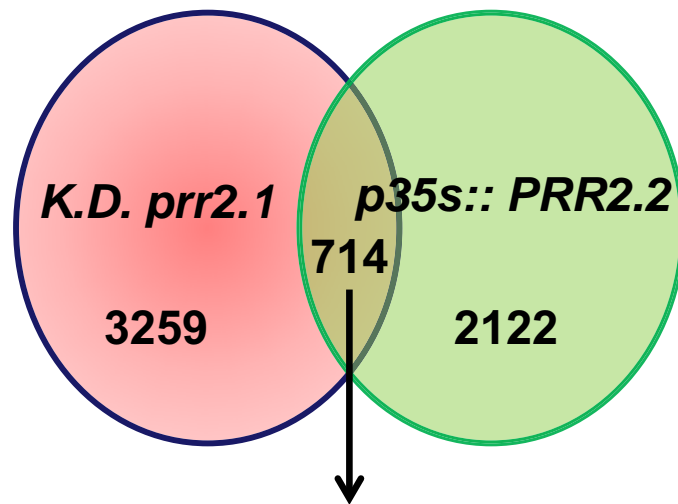
2.1 PRR2 régule positivement l'expression de gènes associés aux fonctions du chloroplaste

L'analyse transcriptomique globale a permis de mettre en évidence que des gènes impliqués dans les fonctions chloroplastiques sont dérégulés chez les lignées *PRR2*. Lorsqu'on réalise le profil d'expression des gènes les plus fortement dérégulés dans l'analyse transcriptomique tel que *LHCB1.4* (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX II SUBUNIT B1, **figure II.27a**), *LHCB2.4* (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING 2, **figure II.27b**) et *PSBP-2* (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P-2, **figure II.27c**) on remarque que ces gènes sont induits très fortement de 0 à 6h chez le surexprimeur *PRR2* par rapport au Wt Col0 et au mutant *K.D.prr2.1*. Le niveau d'expression diminue entre 6h et 24h, cependant, les différences se maintiennent entre les génotypes. Nous pouvons noter également que l'expression des gènes *PSBP-2* et *LHCB2.4* a tendance à être plus faible chez le mutant *K.D.prr2.1* par rapport au Wt Col0. Ces données suggèrent bien que *PRR2* est un régulateur majeur de l'expression des gènes de l'appareil photosynthétique dans des conditions normales de croissance et de développement.

2.2 L'expression de gènes de stress est particulièrement affectée chez le surexprimeur *p35s::PRR2.2*

L'analyse transcriptomique réalisée en réponse à la flg22 avait permis de mettre en évidence que l'accumulation de transcrits de nombreux gènes impliqués dans les réponses précoces ou plus tardives à la flg22 est altérée chez les génotypes *PRR2* (**figure II.20**). En conditions normales de croissance et de développement, l'analyse transcriptomique et le profil d'expression en qPCR n'a pas permis de mettre en évidence de différences majeures dans l'expression des gènes de réponses à la flg22. En effet, le profil d'expression des gènes *FRK1*, *WRKY29*, *BIK1*, *EFR* a été effectué en qPCR sur une cinétique de 0 à 24h (données non illustrées). Ces gènes apparaissent très faiblement induits (induction<2) et aucune différence significative n'a pu être observée entre les génotypes *PRR2*. Ces résultats indiquent que la régulation de l'expression des gènes associés à la défense en réponse à la flg22 n'est pas constitutivement dérégulée chez les génotypes *PRR2*.

Cependant, parmi les gènes les plus fortement dérégulés entre les génotypes *PRR2*, certains gènes qui ne sont pas associés à un processus en particulier mais impliqués dans différentes réponses de stress apparaissent très fortement induits chez le surexprimeur. On retrouve notamment certains facteurs de transcription comme *TZF1* (TANDEM ZINC FINGER PROTEIN 1), impliqué dans les réponses aux hormones et en réponse au stress abiotique (froid, sécheresse; Lin et al., 2011) dont l'expression est plus fortement induite chez le surexprimeur *p35s::PRR2.2* par rapport aux autres génotypes entre 0 et 6h (**figure II.28c**). Un autre facteur de transcription putatif de fonction inconnu



298 gènes inversement dérégulés

Figure II.26: Représentation schématique du nombre de gènes dérégulés chez les génotypes *PRR2* identifiés à partir de l'analyse transcriptomique CATMA

Ce diagramme de Venn illustre le nombre de gènes dérégulés chez le *K.D. prr2.1* (3259 gènes), le nombre de gènes dérégulés chez le surexprimeur *p35s:: PRR2.2* (2122 gènes) et le nombre de gènes dérégulés chez les deux génotypes (714 gènes) pour une $p\text{-value} < 0.01$ (test de Benjamini-Hopkins). Parmi ces gènes, 298 gènes présentent une dérégulation inversée, c'est-à-dire une induction chez l'un des génotypes et une répression chez l'autre.

BBX27 (B-BOX DOMAIN PROTEIN 27), que l'on retrouve généralement induit dans de nombreuses analyses transcriptomiques en réponse au stress est aussi plus fortement induit chez le surexprimeur *p35::PRR2.2* entre 0 et 6h (**figure II.28b**). D'autres gènes codant des protéines de stress qui ne sont pas directement impliquées dans le métabolisme chloroplastique mais qui sont localisées au niveau du chloroplaste sont aussi fortement induits chez le surexprimeur *PRR2* en comparaison du Wt Col0 et du mutant *K.D.prr2.1*. C'est le cas notamment du gène *COR15a* (**figure II.28a**), localisé au niveau du stroma du chloroplaste et impliqué dans différentes réponses de stress abiotiques ou biotiques (Nakayama et al., 2007; Nakayama et al., 2008 ; Thalhammer et al., 2010). **L'ensemble de ces résultats indique qu'en conditions normales de croissance et développement, PRR2 est un régulateur positif de l'expression de gènes associés aux réponses au stress.**

2.3 L'expression de gènes impliqués dans les processus de sénescence est fortement altérée chez le mutant *K.D. prr2.1*

Lorsque l'on se focalise sur les gènes fortement induits chez le mutant par rapport au Wt et dont l'expression chez le surexprimeur ne diffère pas et/ou est réprimée par rapport au Wt, on remarque qu'un certain nombre de gènes sont connus pour leur implication dans les processus de sénescence. Parmi ces gènes on retrouve notamment de nombreux facteurs de transcription de type WRKY, comme *WRKY54*, *WRKY70*, *WRKY75*. *WRKY54* et *WRKY70* sont des régulateurs négatifs de la sénescence (Besseau et al., 2012) alors que *WRKY75*, impliqué dans l'assimilation du phosphate et dans la croissance racinaire, est un régulateur positif de la sénescence (Devaiah et al., 2007; Li et al., 2012). Lorsqu'on analyse le profil d'expression de ces gènes (**figure II.29**), on remarque qu'ils sont induits de manière transitoire entre 0 et 24h (ce qui est généralement le cas pour les facteurs de transcription de type WRKY), avec un pic d'induction entre 1h et 6h chez le mutant *K.D. prr2.1*. Ces gènes restent à un niveau basal ou peuvent être réprimés chez le Wt et le surexprimeur *p35s::PRR2.2* sur l'ensemble de la cinétique. On note cependant une induction plus forte et significative de *WRKY54* chez le surexprimeur *p35s::PRR2.2* à 6h (**figure II.29a**). Il faut noter que ces données d'expression ont été générées au stade plantule, qui n'est pas un stade de développement pour lequel les gènes de sénescence sont connus pour être dérégulés. **En conséquence, les résultats obtenus indiquent que PRR2 pourrait également exercer un rôle régulateur au cours des processus de sénescence.** Il faut noter cependant que l'expression de gènes clés de sénescence comme *WRKY53* n'apparaît pas dérégulé chez les lignées *PRR2*.

3. Analyse *in silico* du promoteur des gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique globale

Afin de déterminer si les promoteurs des gènes régulés par PRR2 partagent un élément *cis* commun, nous avons réalisé une analyse *in silico* de la région promotrice des gènes (500 nucléotides situés en amont du site d'initiation de la transcription) dérégulés dans l'analyse transcriptomique. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec B. Savelli du service bioinformatique de notre laboratoire. La démarche employée pour cette analyse est résumée dans la **figure II.30**.

A partir de la liste des gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique, nous avons sélectionné :

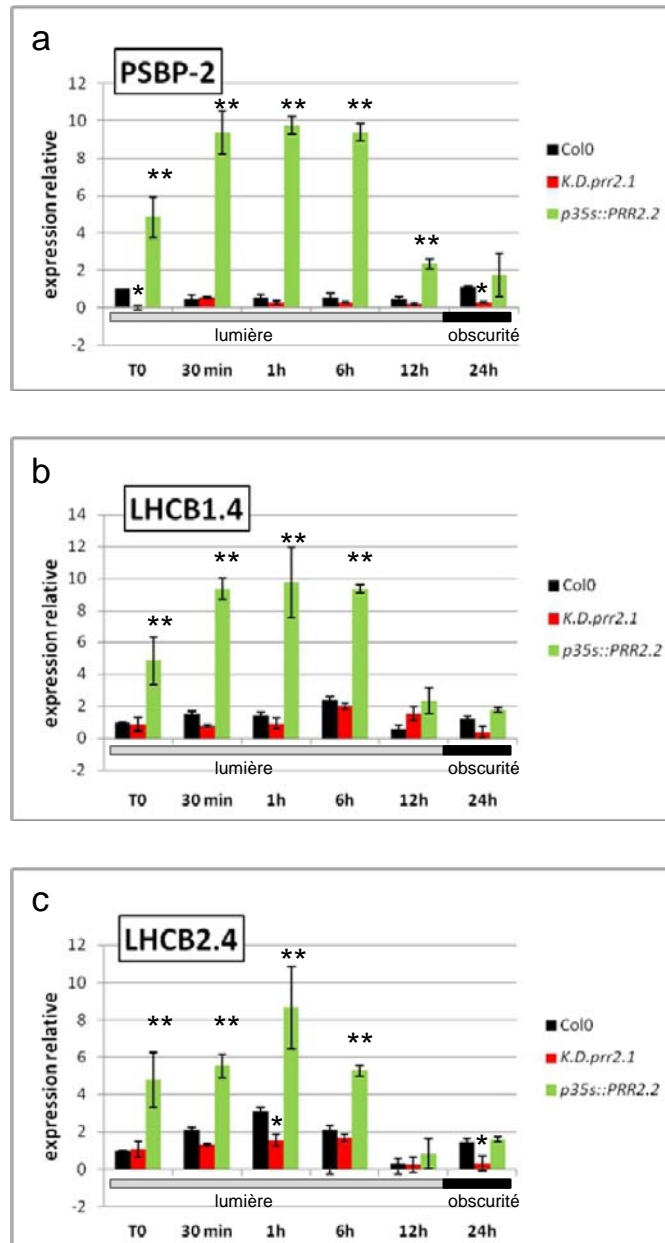


Figure II.27: Profil d'expression de gènes de la machinerie photosynthétique examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes *PSBP-2* (a), *LHCB1.4* (b), *LHCB2.4* (c) dans les génotypes Wt (col0), *K.D. prr2.1* et *p35s::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène par rapport à l'actine a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomarck®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatives respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* * *p-value* < 0.01; . * *p-value* < 0.05).

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

_ les 135 gènes qui sont induits très significativement chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* (ratio d'induction>4) et réprimés chez le mutant *K.D.prr2.1* : **groupe A**

_ les 20 gènes significativement induits chez le mutant *K.D.prr2.1* et réprimés chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2*: **groupe B**

_ 50 gènes constitutifs, non induits chez le surexprimeur *p35S::PRR2.2* et le mutant *K.D.prr2.1* représentatifs du génome d'*Arabidopsis* (répartition de ces gènes sur les 5 chromosomes d'*Arabidopsis*): **groupe C**

Dans un premier temps, l'analyse bioinformatique a été menée sur les 500 bp en amont de la région +1 de la région promotrice. Cette analyse a été effectuée à partir de deux programmes: RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*) et MEME (*Multiple Expectation Maximisation for Motif Elicitation*) qui fonctionnent selon deux algorithmes différents, ce qui renforce la méthode d'analyse. Ces deux outils permettent d'identifier un motif (de taille définie) sur-représenté et de comparer sa fréquence obtenue dans une liste de gènes donnée par rapport à la fréquence attendue dans les régions promotrices de 500 bp de l'ensemble des gènes d'*Arabidopsis* (TAIR Patmatch Tool).

Lorsque la liste des promoteurs des gènes du groupe A est soumise à RSAT et à MEME, un motif putatif de 6 pb CACGTG ou CACGTC a été identifié (**figure II.31A**). Ce motif est significativement surreprésenté dans le groupes A d'après les analyses RSAT et MEME (p -value<0.001). Le motif CACGTG est présent dans 27 des gènes du groupe A et le motif CACGTC est présent dans 8 des gènes de ce même groupe.

Afin de vérifier que le motif CACGTG ou CACGTC est surreprésenté dans le groupe A, et que de ce fait, ces motifs sont bien des motifs putatifs ciblés par PRR2, nous avons examiné la région promotrice des gènes des groupes B, C et nous avons aussi recherché ces motifs dans l'ensemble du génome d'*Arabidopsis* (**figure II.31B**). Etant donné le faible nombre de gènes dans le groupe B, les résultats doivent être interprétés avec prudence et nous ne pouvons pas conclure quant à la significativité de l'occurrence des motifs CACGTG ou CACGTC dans ce groupe. En théorie, un motif de 6 pb est supposé apparaître tous les 4^6 (4096) bases. Or, si l'on considère la fréquence d'apparition des motifs CACGTG et CACGTC dans le groupe C et dans le génome d'*Arabidopsis*, ce motif n'est pas représenté à une fréquence supérieure à celle estimée au hasard dans ces groupes. En conséquence, nous pouvons formuler l'hypothèse que les motifs CACGTG ou CACGTC pourraient être des *cis-elements* reconnus par PRR2.

L'analyse effectuée à partir de PLACE, a permis de confirmer ces résultats puisque le motif CACGTG apparaît comme étant un des éléments retrouvé significativement dans la région promotrice des gènes étudiés.

PRR2 présente toutes les caractéristiques d'un facteur de transcription de type GARP proche d'autres facteurs de transcription de la même famille: les GLKs. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de confirmer la liaison directe des GLKs sur les promoteurs de certains gènes cibles (Waters et al., 2009). L'analyse *in silico* de la région promotrice de ces gènes cibles a permis de mettre en évidence un élément cis putatif reconnu par les GLKs: CCAATC. Nous avons recherché si ce motif CCAATC est surreprésenté dans les groupes A et B, mais la fréquence de ce motif dans ces groupes apparaît similaire à celle du groupe C ou à sa fréquence dans le génome d'*Arabidopsis*

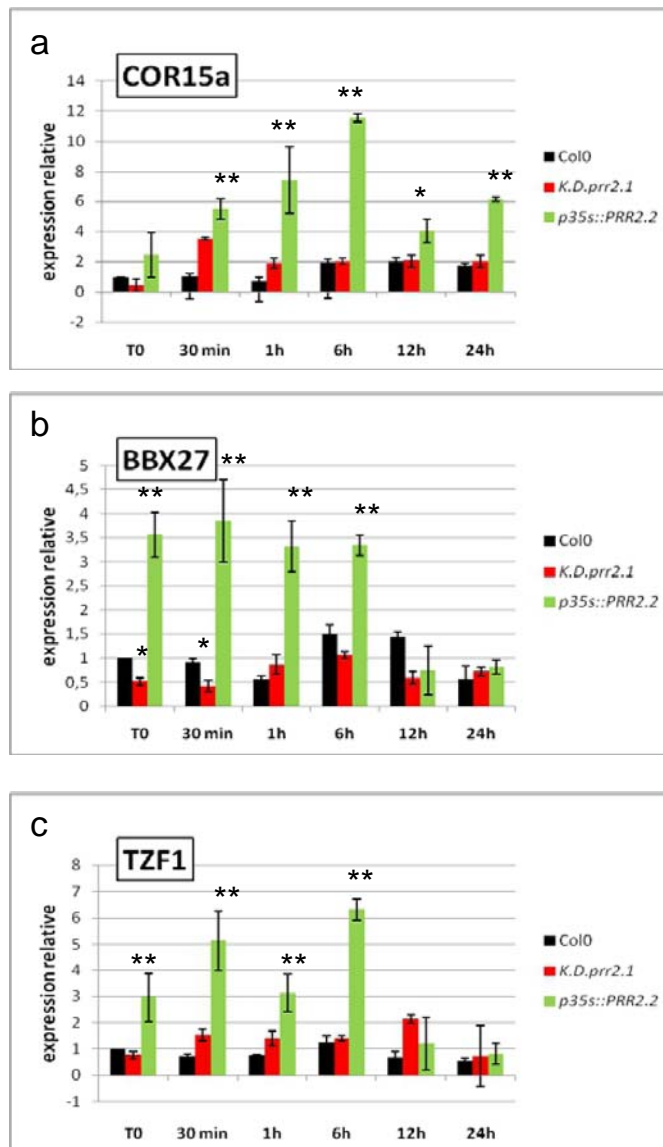


Figure II.28: Profil d'expression de gènes de stress examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes *COR15a* (a), *BBX27* (b), *TZF1* (c) dans les génotypes Wt (*col0*), *K.D. prr2.1* et *p35S::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène par rapport à l'actine a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomarck®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatives respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* **p-value* <0.01; . **p-value* <0.05).

(données non illustrées). De ce fait, PRR2 semble ne pas être capable de reconnaître ce motif. De plus, les travaux réalisés par Perochon (Thèse, 2010) ont montré que PRR2 n'est pas capable de lier l'élément cis reconnu par les ARRs de type B.

En conséquence, il pourrait être intéressant de poursuivre cette analyse de promoteurs par des approches expérimentales (tests de liaison à l'ADN) afin de déterminer si PRR2 est capable de lier l'élément cis putatif CACGTG ou CACGTC identifié dans cette étude.

Discussion...

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre concerne un partenaire de CML9, PRR2 qui est un facteur de transcription de type GARP spécifique du règne végétal. Bien que la fonction de certains facteurs de transcription de type GARP dans la signalisation hormonale soit bien connue, très peu de données dans la littérature décrivent celle de PRR2. L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont contribué à une meilleure compréhension de la fonction biologique de PRR2 au cours du développement et dans les réponses aux pathogènes, plus particulièrement dans les réponses à *P. syringae*.

PRR2 un gène exprimé dans les tissus aériens au cours du développement et en réponse à des pathogènes

Dans un premier temps, il a été nécessaire de préciser le profil d'expression de *PRR2* au cours du développement et en réponse à des stress afin de confirmer les informations disponibles dans les bases de données. Les résultats de cette étude ont montré que PRR2 est exprimé à tous les stades de développement, plus spécifiquement dans certains organes aériens de la plante, notamment au niveau des stomates ainsi que des tiges et plus particulièrement au niveau des cellules du phloème, des cellules compagnes et des cellules du parenchyme du xylème. De manière intéressante, les tissus du xylème et du phloème sont issus de la différenciation des méristèmes secondaires présents uniquement chez les Gymnospermes et les Angiospermes dicotylédones (Kerstetter et Hake, 1997). Ces données sont cohérentes avec le fait que PRR2 soit présent uniquement chez des espèces dicotylédones et laisse supposer que ce facteur de transcription puisse exercer une fonction particulière dans le fonctionnement de ces tissus.

Il est bien admis que les tissus conducteurs permettent non seulement le transport de métabolites mais représentent aussi un moyen de dispersion pour de nombreux pathogènes pour coloniser la plante. Les stomates et les tissus conducteurs étant deux structures qui permettent respectivement la pénétration, la circulation, le déplacement des pathogènes dans les tissus de l'hôte, la localisation de l'expression de *PRR2* au niveau des stomates et au niveau des tissus conducteurs a conduit à rechercher si PRR2 peut être impliqué dans les réponses à des agents pathogènes. Les informations issues des bases de données nous indiquaient que *PRR2* tout comme *CML9* présente un profil

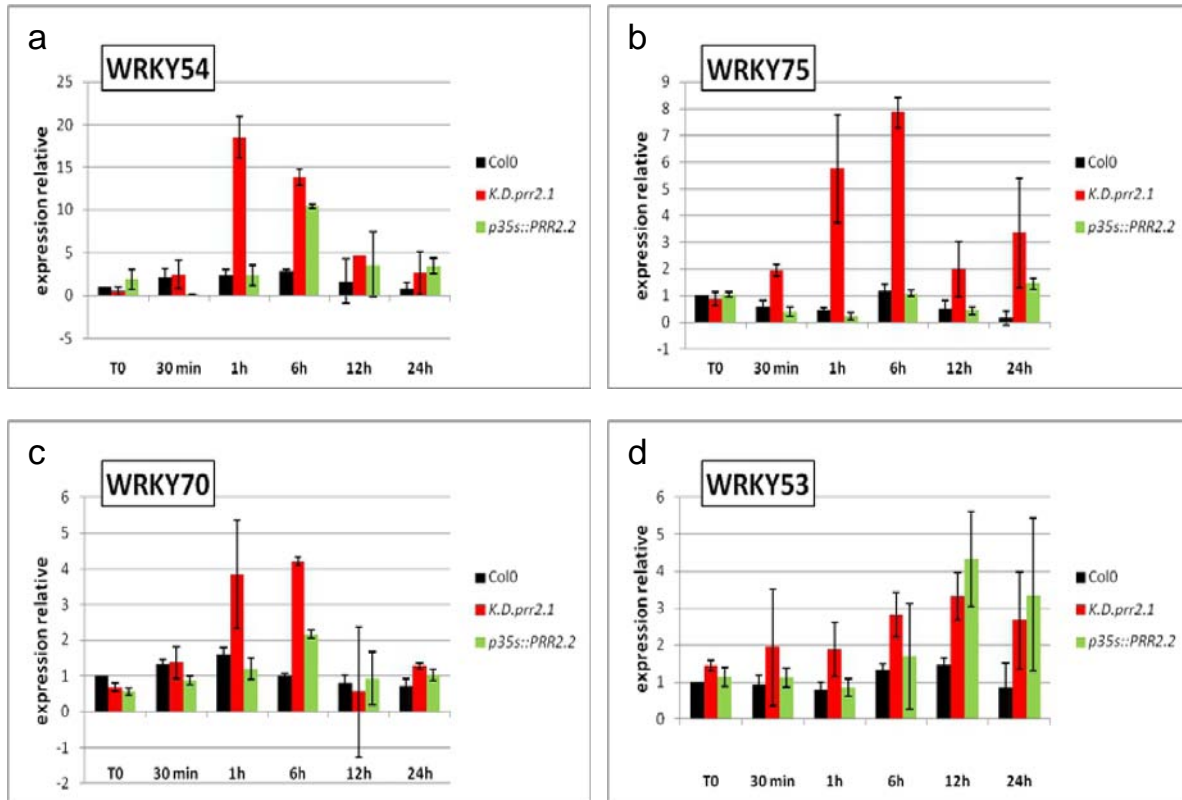


Figure II.29: Profil d'expression de gènes impliqués dans les processus de sénescence examiné chez les lignées *PRR2*.

Les graphiques représentent le profil d'expression sur une cinétique de 24h des gènes *WRKY54* (a), *WRKY75* (b), *WRKY70* (c), *WRKY53* (d) dans les génotypes Wt (col0), *K.D.prr2.1* et *p35S::PRR2.2*.

Des plantules de 12 jours d'*Arabidopsis* cultivées en milieu liquide ont été récoltées à 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h. Le ratio d'expression qui représente l'expression du gène par rapport à l'actine a été déterminé par RT-qPCR en utilisant la méthode Fluidigm® de Biomarck®. Les valeurs et les barres d'erreurs sont représentatives respectivement de la moyenne et de l'écart-type de 3 réplicats biologiques indépendants. La significativité des résultats a été évaluée par une analyse ANOVA et par un test de Newman-Keuls (* **p-value* < 0.01; . **p-value* < 0.05).

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

d'expression altéré en réponse à *P. syringae*. Ces données ont été confirmées dans nos expériences qui ont permis de montrer que *PRR2* est exprimé de manière rapide et transitoire en réponse à l'infection par la souche virulente de *P. syringae*.

Une approche génétique a alors été menée afin de mieux comprendre la fonction de cette protéine au cours du développement et dans les réponses au pathogène.

PRR2: un régulateur de fonctions chloroplastiques au cours du développement

Les observations de différentes lignées mutantes ou surexpresses de *PRR2* au niveau macroscopique ne nous a pas permis d'observer de différences en terme de croissance et de développement végétatif. Bien que *PRR2* soit fortement exprimé au niveau des tissus conducteurs, il semble peu probable que cette protéine puisse exercer un rôle majeur dans la biogénèse des tissus conducteurs, auquel cas, le développement des lignées mutantes ou surexpresses aurait été affecté (phénotypes nains...). Cependant il serait nécessaire de réaliser des observations plus fines des tissus conducteurs des différentes lignées *PRR2* en microscopie afin de déterminer si *PRR2* impacte ou non sur leur différenciation. Si des analyses phénotypiques ont mis en évidence que *PRR2* exerce un rôle négatif sur la cinétique d'apparition des hampes florales chez *Arabidopsis* et un rôle de régulateur de l'accumulation de métabolites secondaires au cours de la maturation des fruits chez la tomate (Pan et al., 2013), le développement végétatif ne semble pas altéré au niveau macroscopique. Ces données ont motivé la recherche du régulateur de *PRR2* afin de mieux comprendre sa fonction biologique au cours de la croissance et du développement. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une approche transcriptomique globale sur les lignées *PRR2*. Les résultats de cette analyse transcriptomique ont permis de mettre en évidence que **PRR2 affecte très significativement l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines chloroplastiques, notamment des gènes codant les unités structurales du photosystème II. PRR2 semble donc être impliqué dans la biogénèse de l'appareil photosynthétique.** La machinerie photosynthétique est composée de protéines codées par des gènes chloroplastiques et nucléaires. Ainsi les différentes unités des chaînes de transport d'électrons au niveau de la membrane des thylakoïdes, ou encore les sous-unités de la Rubisco, sont codées par le génome chloroplastique et par le génome nucléaire (Strand, 2004). Le fonctionnement de la machinerie photosynthétique nécessite donc une bonne coordination de l'activité des génomes chloroplastiques et nucléaires. La coordination de l'expression des gènes chloroplastiques et nucléaires incluent des mécanismes dits antérogrades et rétrogrades (Rodermeil and Park, 2003). En réponse à un stress, les mécanismes antérogrades (du noyau vers le chloroplaste) se mettent en place lorsque des protéines codées par le génome nucléaire régulent la transcription et la traduction des gènes codés par le génome chloroplastique. Les mécanismes rétrogrades (du plaste vers le noyau) se mettent en place lorsque des signaux sont envoyés du chloroplaste vers le noyau pour activer l'expression de gènes nucléaires qui codent pour des protéines chloroplastiques (Susek et al., 1993). **Il est possible que PRR2 soit impliqué dans un mécanisme antérograde ou rétrograde au cours du développement.** Les protéines nucléaires GLKs portant le motif GARP de liaison à l'ADN, proches de *PRR2* au niveau phylogénétique, sont bien connues pour réguler les fonctions du chloroplaste au cours du développement (Waters et al., 2009). Ainsi, des double-mutants *glk1/glk2* d'*Arabidopsis* possèdent une pigmentation vert pâle au niveau macroscopique et accumulent une quantité anormale de précurseurs de la chlorophylle alors qu'au

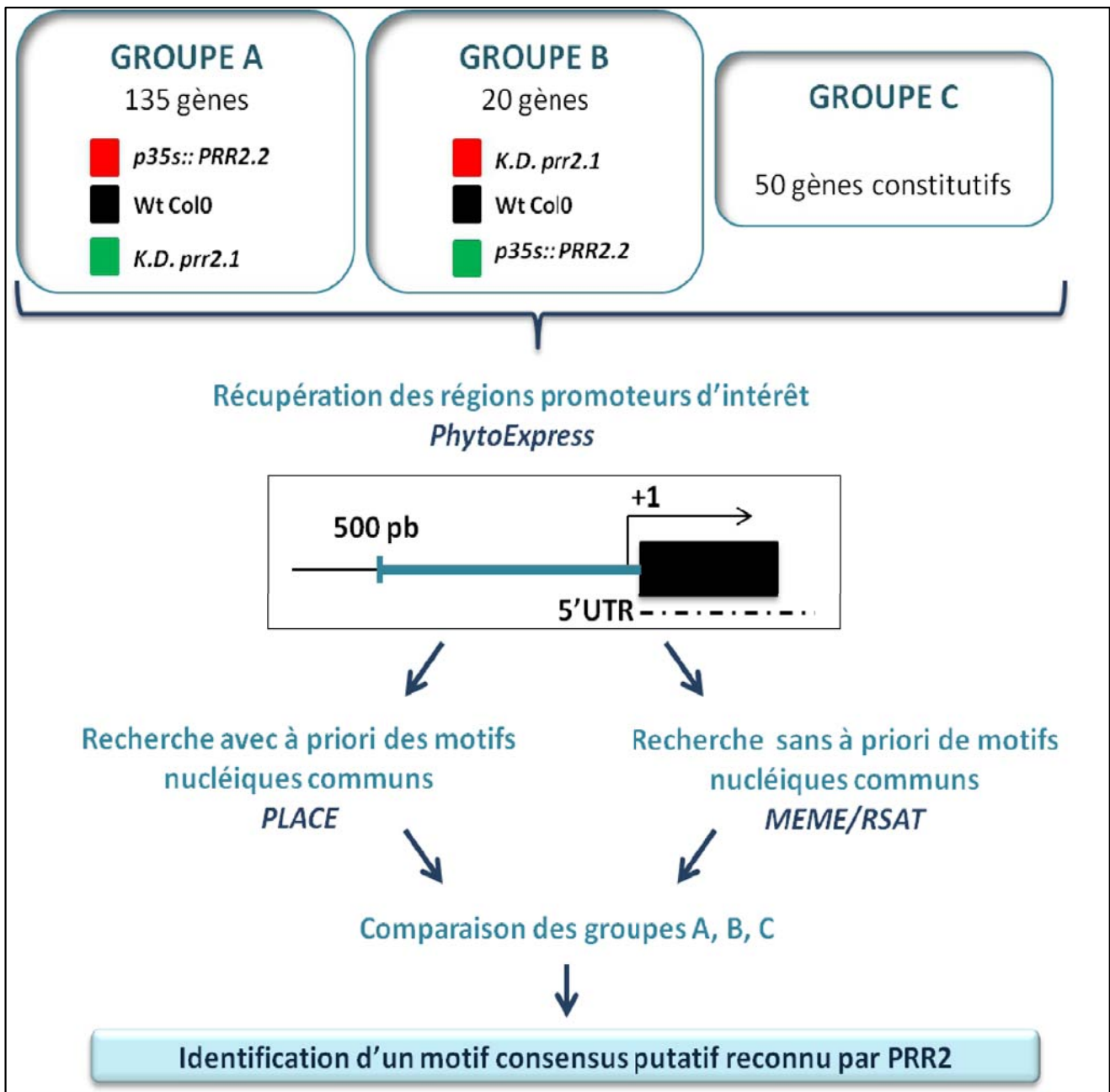


Figure II.30: démarche opérée pour l'analyse de promoteurs putatifs reconnus par PRR2

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

contraire des lignées transgéniques surexprimant les *GLKs* accumulent des transcrits de gènes codant des protéines des antennes photosynthétiques et des enzymes de biosynthèse de la chlorophylle (Waters et al., 2009). Il a été démontré au cours des travaux de thèse de Perochon (2010) que PRR2 est capable de former des complexes d'interaction avec GLK1 et GLK2. Le fait que PRR2 et les GLKs semblent partager des voies de régulations géniques communes encourage la recherche plus précise de la fonction de PRR2 au niveau du chloroplaste. Il se pourrait que PRR2 et les GLKs exercent des fonctions partiellement redondantes dans la régulation des fonctions du chloroplaste. Nous disposons dans l'équipe de doubles mutants *glk1/glk2* et de lignées transgéniques surexprimant *GLK1* et *GLK2*. Afin de mettre en évidence si les fonctions des GLKs et de PRR2 sont complémentaires ou redondantes, des lignées transgéniques surexprimant PRR2 chez le double mutant *glk1/glk2* ont été générées, et leur phénotype est en cours.

L'analyse transcriptomique réalisée sur les plantules au cours du développement a aussi permis de mettre en évidence que plusieurs éléments impliqués dans des processus de sénescence dont des facteurs de transcription de type WRKY fortement induits chez le mutant *prp2*. Ces résultats sont assez inattendus dans la mesure où cette analyse a été effectuée à un stade de développement qui ne permet pas normalement de révéler des différences de sénescence. Cependant, bien qu'impliqués dans la sénescence, les gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique ne sont pas des gènes majeurs classiquement décrits pour exercer un rôle majeur au cours de ce processus. PRR2 n'est peut être pas un régulateur majeur de la sénescence au cours du développement. Bien que le développement de l'appareil végétatif semble ne pas être altéré par la perte ou le gain de fonction de *PRR2*, la floraison est accélérée chez les mutants *prp2*. L'accélération des processus de développement étant généralement associée à une accélération de la mise en place des processus de sénescence, cela pourrait expliquer pourquoi les lignées *PRR2* présentent une altération de l'expression de certains gènes associés à ces processus.

PRR2, un régulateur positif de l'accumulation de métabolites de défense en réponse à P.syringae

Les données exposées dans ce chapitre indiquent que le gain ou la perte de fonction du gène *PRR2* entraîne des différences de sensibilité à l'infection par les souches bactériennes *Xanthomonas campestris* et *Pseudomonas syringae*. En effet, bien que PRR2 semble ne pas être impliqué dans les réponses de défense à la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum* ce qui semble cohérent avec l'absence du gène *PRR2* dans les parties racinaires, les lignées *PRR2* présentent une différence de sensibilité en réponse à l'infection par *X. campestris* et *P. syringae*. Ces résultats montrent pour la première fois l'implication de PRR2 dans les réponses aux pathogènes.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai choisi d'étudier plus en détail l'implication de PRR2 dans les réponses de défense à *P. syringae*. La mutation ou la surexpression du gène *PRR2* conduit à des différences de sensibilité à l'agent pathogène *P. syringae* et à la flagelline. En effet, PRR2 régule positivement la résistance à la souche virulente de *Pst* DC3000. La recherche des processus cellulaires, biochimiques et moléculaires classiquement altérés en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 et/ou en réponse à la flagelline a été effectuée.

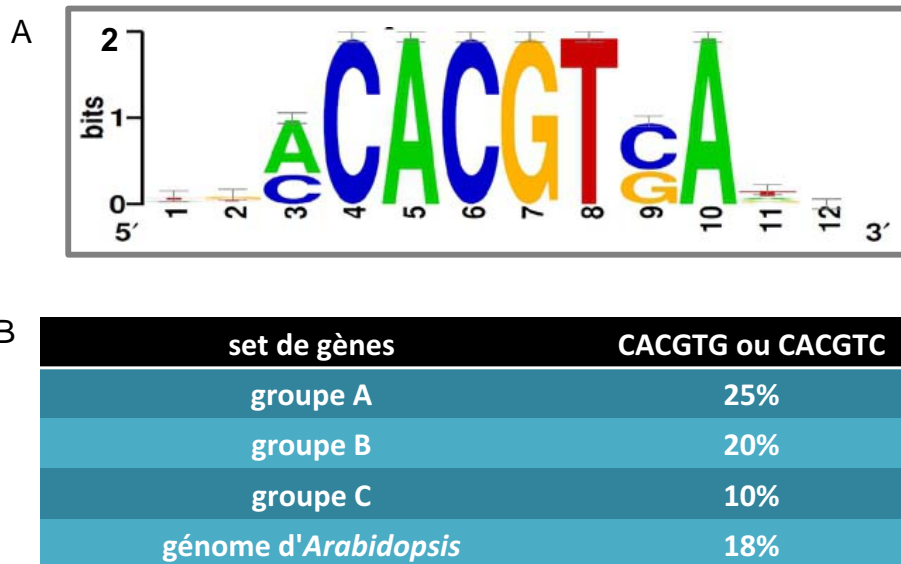


Figure II.31: Eléments cis putatif identifié parmi les gènes dérégulés dans le transcriptome réalisé en conditions standards de croissance et de développement

A. La recherche d'un élément commun dans les 500pb en amont du site +1 du site d'initiation de la transcription dans la région promotrice des gènes cibles de PRR2 a permis d'identifier un élément putatif. Toutes les occurrences de ce motif avec une ou plusieurs substitutions ont été effectuées pour générer le logo de la séquence consensus suivante: CACGT(C/G)A. La taille des lettres à chaque position reflète le niveau de conservation de chaque nucléotide.

B. Fréquence de la séquence putative identifiée dans la région promotrice des gènes cibles de PRR2 dans les groupes A, B, C et dans le génôme d'*Arabidopsis*.

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

La production d'hormones de défense a été quantifiée et a révélé que PRR2 contribue à l'accumulation de SA en réponse à *Pst* DC3000 alors que la production de JA et d'ABA n'est pas affectée. De plus, l'analyse transcriptomique réalisée en réponse à la flagelline et l'analyse fluidigm effectuée en réponse à *Pst* DC3000 a permis de révéler que *prp2* affecte l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la signalisation SA. **Ces résultats indiquent que PRR2 serait impliqué dans la régulation des processus SA dépendants en réponse à *P. syringae*.**

La production de ROS est l'une des réponses les plus précoces observées suite à l'inoculation de *P. syringae* ou l'application de flg22 (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006). L'expression génique des régulateurs majeurs de la production de ROS n'est cependant pas altérée chez les lignées PRR2 en réponse à ce PAMP. Ces résultats nous permettent de conclure que **PRR2 n'apparaît pas être un régulateur de la production de ROS en réponse à la flg22.**

En réponse à la flg22 et à *Pst* DC3000 PRR2 régule positivement l'expression de gènes de biosynthèse des glucosinolates, de la callose et de la camalexine (**figure II.32**). Le dosage de camalexine et de glucosinolates au cours de l'infection par *Pst* DC3000 a montré que **PRR2 est un régulateur positif de la production de camalexine et semble contribuer à l'accumulation de certaines formes de glucosinolates**. De plus, **la quantification des papilles de callose en réponse à la flg22 a montré que PRR2 contribue aussi positivement à la mise en place de cette barrière physique de défense (figure II.32).**

Bien que le rôle des glucosinolates soit mieux connu dans la réponse aux herbivores (Tierens et al., 2001; Kliebenstein et al., 2005), plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence que l'accumulation de glucosinolates constituent l'une des réponses majeures de défense en réponse à la flg22 (Denoux et al., 2008 ; Ahuja et al., 2012). Les travaux de Denoux, 2005 ont démontré que les gènes de biosynthèse des glucosinolates et de la camalexine sont induits en réponse à la flg22. En régulant positivement l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés, PRR2 pourrait contribuer à augmenter la résistance à *P. syringae*. Cependant, bien que l'expression de gènes clés codant des éléments de biosynthèse des glucosinolates soit fortement dérégulée chez les lignées PRR2 en réponse à la flg22, l'accumulation de ces composés n'est pas fortement affectée aux points cinétiques analysés après infection par la bactérie. Certaines études ont démontré que les glucosinolates sont particulièrement impliqués au cours de la résistance contre des pathogènes nécrotrophes alors que leur rôle est moins décrit contre des pathogènes hémibiotrophes comme *P. syringae* (Bednarek, 2012). Il est envisagé de réaliser des infections chez les lignées PRR2 en réponse à des pathogènes nécrotrophes comme *Alternaria Brassicicola* et *Botrytis cinerae* afin d'exacerber les réponses de défenses et pouvoir mettre ainsi en évidence la présence ou non de différences dans l'accumulation de ces composés chez les lignées PRR2. Il faut prendre en considération que les glucosinolates sont des composés instables qui sont rapidement dégradés en isothiocyanates (ITCs) sous l'action de myrosinases. Il serait intéressant de quantifier l'accumulation des ITCs chez les lignées PRR2 en réponse à *Pst* DC3000, d'une part parce que ces composés ont une activité antibiotique et contribuent de ce fait aux réponses de défense contre des agents pathogènes (Wittstock and Gershenzon, 2002).

De manière assez étonnante, l'analyse transcriptomique et les analyses d'expression en Rt-qPCR n'ont pas permis de révéler de différences majeures dans l'expression des gènes connus pour être impliqués dans la biosynthèse de callose comme *PMR4* (Jacobs et al., 2003). Cependant, il a été

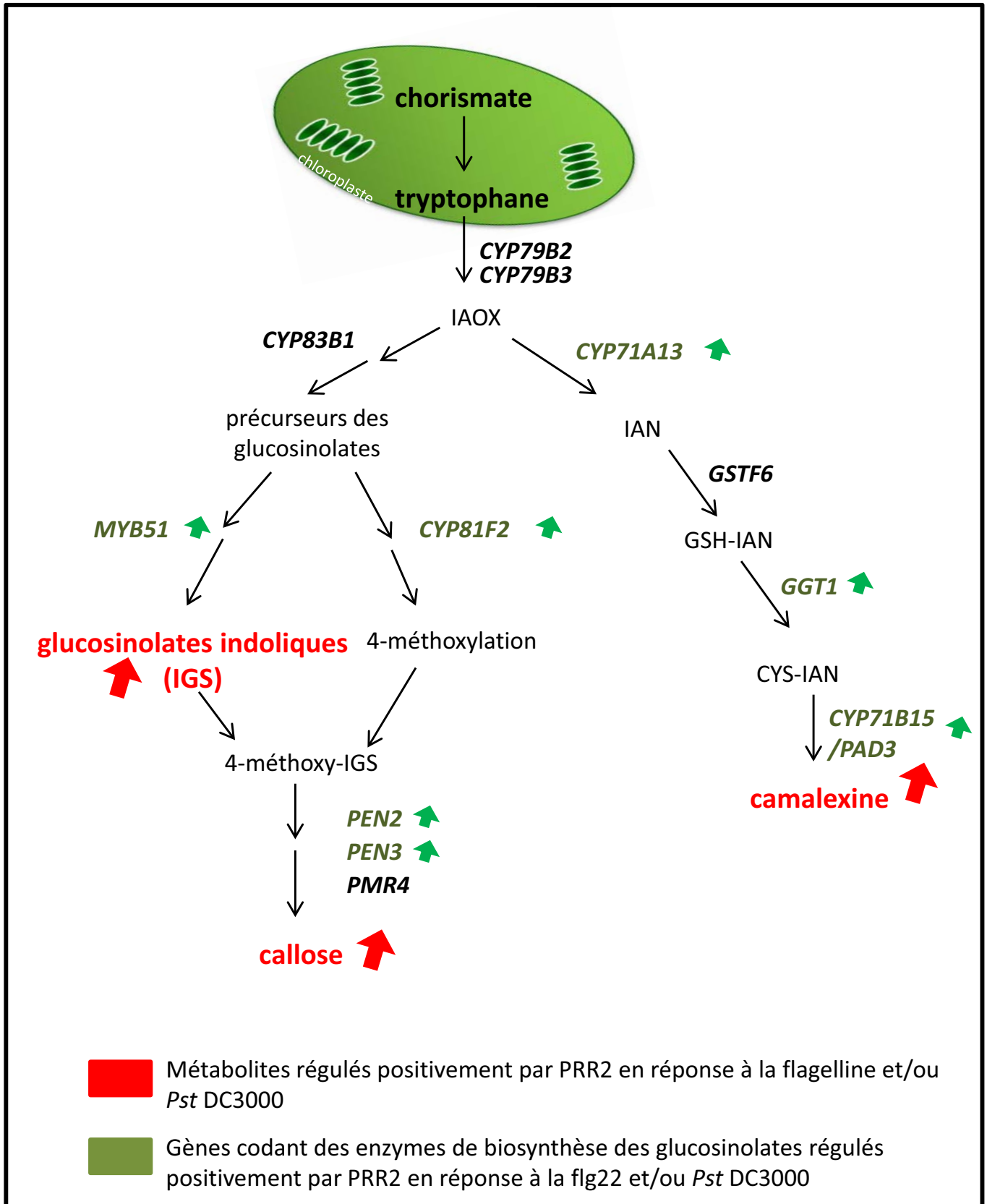


Figure II.32: Régulation exercée par PRR2 sur la production de glucosinolates indoliques, camalexine et papilles de callose

CHAPITRE II : Contribution de PRR2 à l'immunité

démontré que l'accumulation de callose en réponse à la flg22 nécessite l'activation concomitante de trois voies de signalisation qui impliquent les gènes de la voie des glucosinolates: *MYB51*, *CYP81F2*, *PEN2* et *PEN3* (Clay et al., 2009). Le rôle positif exercé par PRR2 sur l'accumulation de papilles de callose pourrait ainsi s'expliquer par l'effet inducteur qu'il exerce sur l'expression des gènes de biosynthèse des glucosinolates.

Parmi les gènes fortement induits chez le surexprimeur, on compte aussi *GGT1* et *CYP71A13* qui sont des gènes clefs de la biosynthèse de camalexine. La biosynthèse de la camalexine peut être induite par l'infection par des bactéries telles que *P. syringae*, *Erwinia carotovora* et des champignons comme *Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea* (Glawischnig, 2006). Chez les *Brassicaceae*, les voies de biosynthèse de la camalexine et de certaines formes de glucosinolates sont interconnectées et mises en place à partir d'un même précurseur, le tryptophane (Rauhut and Glawischnig, 2009). Le fait que l'expression de l'ensemble des gènes de la voie des glucosinolates, de la callose et de la camalexine soit dérégulée dans les génotypes PRR2 nous conforte dans l'idée que PRR2 pourrait exercer un contrôle très en amont dans la voie de biosynthèse de ces composés peut être sur la production de tryptophane ou de chorismate au niveau du chloroplaste (figure II.32). Il serait intéressant de pouvoir effectuer un dosage de ces composés chez les lignées PRR2 en réponse à l'infection par *P. syringae*.

PRR2: un facteur de transcription à l'interface entre métabolisme chloroplastique et métabolisme secondaire?

Il est bien admis aujourd'hui que le chloroplaste est un élément clef de la mise en place des réactions de défense en réponse à un agent pathogène. En effet, bien qu'il reste encore tout un champ d'investigations pour mieux comprendre les relations qui existent entre le chloroplaste et le noyau au cours de la réponse immune, des travaux récents ont démontré que le chloroplaste est essentiel dans les réponses aux PAMPs (Nomura et al., 2012). Les protéines chloroplastiques CAS (*calcium sensing receptor*) induisent des variations de la concentration en calcium dans le stroma qui sont essentielles à la mise en place de la défense en réponse aux PAMPs et dans la mise en place de la HR au cours de la résistance spécifique (Nomura et al., 2012).

Les chloroplastes jouent un rôle critique au cours de l'immunité comme site de production du SA et du JA. Des études ont démontré qu'il existe un lien entre la photosynthèse et la synthèse de certains composés hormonaux dérivés des oxylipines comme le JA au cours de la défense. En effet, des lignées d'*Arabidopsis* mutées sur des gènes codant des éléments du photosystème II produisent de fortes quantités d'OPDA, le précurseur du JA (Frenkel et al., 2009). Etant donné les relations antagonistes qui existent entre le SA-JA, la forte induction des gènes codant des éléments du photosystème II chez les surexprimeurs PRR2 pourrait expliquer pourquoi la production de SA augmente en réponse à *Pst* DC3000. En conditions normales de croissance et de développement la production de SA et de JA n'apparaît pas perturbée, cependant l'interaction avec le pathogène pourrait exacerber les réponses associées au métabolisme chloroplastique, et pourrait de ce fait impacter la production de SA en réponse au pathogène. De plus, plusieurs analyses ont démontré que les réponses de défense prennent leur origine au niveau chloroplastique et sont relayées vers le génome nucléaire grâce à *EDS1* et *PAD4* qui forment le cœur des réponses immunes SA dépendantes (Mühlenbock et al., 2008). La dérégulation de l'expression des gènes *EDS1* et *PAD4* chez les lignées

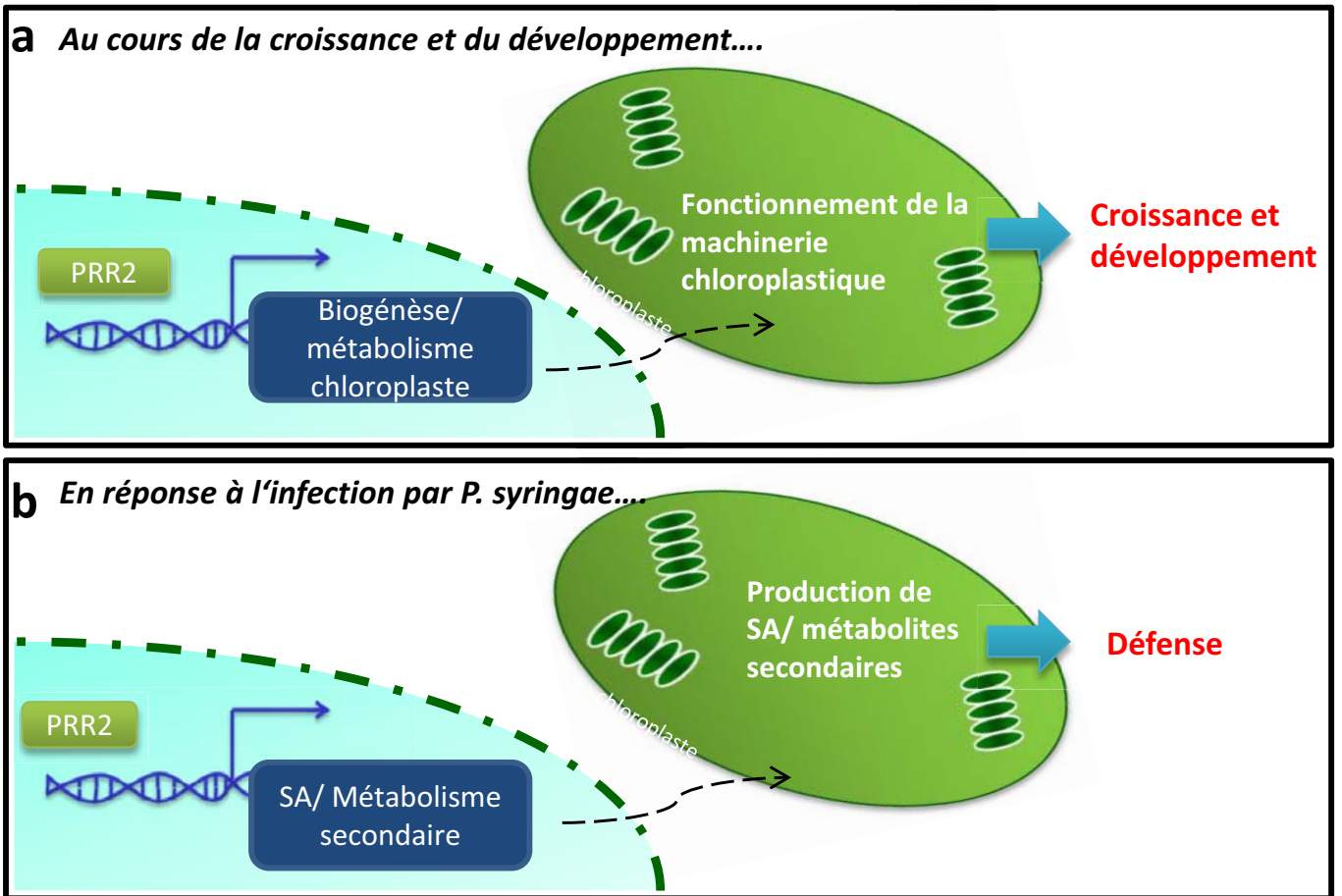


Figure II.33: Modèle hypothétique présentant la contribution de PRR2 au cours de la croissance et du développement et en réponse à l'infection par *P. syringae*

PRR2 en réponse à *Pst* DC3000 et à la flg22 nous conforte dans l'idée que c'est grâce à la fonction qu'il pourrait exercer au niveau du chloroplaste que PRR2 régule les mécanismes de défense. D'autres travaux ont démontré que le SA lui-même est un régulateur de la photosynthèse puisque cette hormone affecte la structure des plastes (Uzunova and Popova, 2000) ainsi que le contenu en chlorophylle et caroténoïdes (Rao et al., 1997). Le métabolisme chez les plantes est souvent subdivisé en métabolisme primaire qui permet la croissance, le développement et la reproduction, et le métabolisme secondaire qui ne joue pas un rôle sur ces fonctions vitales. Il existerait un «*trade-off*» entre les ressources attribuées à la croissance et au développement et celles attribuées à la biosynthèse et au maintien du métabolisme secondaire. Le chloroplaste serait un des éléments clefs à l'origine de cette répartition des ressources. Bien qu'il soit difficile d'évaluer le coût de la production de métabolites secondaires sur la croissance et le développement, il a été démontré par exemple que près de 15% de l'énergie photosynthétique normalement allouée au métabolisme primaire est nécessaire à la production d'une suite de 30 composés de la famille des glucosinolates (Bekaert et al., 2012). L'ensemble des travaux obtenus sur PRR2 nous laisse penser que ce facteur de transcription de type GARP pourrait avoir un «effet balance», qui régulerait les fonctions du chloroplaste au cours de la croissance et du développement (figure II.33) et potentialiserait la production de métabolites secondaires en réponse à l'attaque par des pathogènes (figure II.33).

PARTIE III: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

De nombreux travaux ont rapporté que la signalisation calcique joue un rôle clef tout au long de la vie d'une plante. Cependant, bien que de nombreux senseurs de calcium soient connus chez les plantes, la compréhension de leur contribution dans la physiologie de la plante n'a pas été encore complètement élucidée. C'est notamment le cas des CMLs, pour lesquelles très peu d'études ont expliqué la fonction chez les plantes (Ranty et al., 2006).

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de mieux comprendre la contribution d'un senseur de calcium, CML9 et de son partenaire, PRR2, un facteur de transcription de type GARP dans les réactions de défense chez les plantes.

Pour étudier la contribution de CML9 et de PRR2 dans les mécanismes de défense, nous avons d'une part analysé le profil de régulation des gènes CML9 et PRR2 en réponse à des agents pathogènes, des PAMPs et des composés hormonaux. D'autre part, par différentes approches de phénotypage à l'échelle cellulaire et moléculaire nous avons étudié le comportement de lignées transgéniques, mutées et surexprimant *les gènes CML9 et PRR2* dans le contexte de l'interaction avec le pathogène *P.syringae*.

L'étude du comportement des lignées transgéniques après des expériences d'infections a permis de montrer que CML9 et PRR2 contribuent à la résistance basale à *Pst* DC3000 dans une voie de signalisation dépendante du SA, mais régulent différemment la résistance non hôte en réponse à la flagelline.

CML9 et PRR2 sont exprimés au cours des interactions plantes-micro-organismes pathogènes

Au début de ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que CML9 pourrait être impliqué dans les stress biotiques. *CML9* étant exprimé de façon constitutive au cours du développement et plusieurs éléments bibliographiques indiquaient que CML9 pourrait agir rapidement après la perception d'une signature calcique dans les réponses des plantes à *P.syringae* (de Torres et al., 2003). En effet, l'analyse détaillée du profil d'expression de *CML9* après une inoculation par des souches virulentes et avirulentes de la bactérie *P. syringae* montre que *CML9* est induit de façon rapide et transitoire, ce qui est parfaitement en accord avec les données publiées dans la littérature (de Torres et al., 2003).

L'étude du profil d'expression de *PRR2* révèle que celui-ci est exprimé de manière constitutive au cours du développement au niveau des organes aériens de la plante et plus particulièrement au niveau des stomates et tissus conducteurs. En réponse à une inoculation par une souche virulente de *P. syringae*, *PRR2* est comme *CML9*, induit de manière rapide et transitoire.

Généralement, l'induction rapide et transitoire d'un gène en réponse à un agent pathogène résulte de l'activation des réponses de défense dépendantes de la perception des PAMPs. C'est pourquoi nous avons étudié plus en détail le profil d'expression de *CML9* et *PRR2* en réponse à un PAMP majeur de *P. syringae*, la flagelline. Nous avons montré que l'expression de *CML9* est aussi

induite en réponse à la l'application de flg22. Au contraire, l'expression de *PRR2* n'apparaît pas sensible à flg22.

Cependant, nous avons montré que *CML9* et *PRR2* sont tous deux exprimés de manière transitoire en réponse à une application exogène d'acide salicylique (SA) et réprimés par un traitement au méthyl jasmonate (MeJA). De plus en réponse à la souche virulente de *P. syringae*, l'expression de *CML9* et de *PRR2* est altérée chez des mutants de signalisation de la voie SA mais n'apparaît pas perturbée dans des mutants de la voie de signalisation MeJA. Ces résultats nous indiquent que l'expression de *CML9* et *PRR2* semble dépendante de la voie SA en réponse à cet agent pathogène. Le SA est l'hormone clef de l'établissement des défenses au cours des interactions *P. syringae-Arabidopsis* alors qu'au contraire, le MeJA est plutôt connu pour le rôle négatif qu'il exerce dans les réponses de défense à *P. syringae*. *CML9* avait été montré auparavant comme étant induit dans une voie de signalisation dépendante de l'ABA (Magnan et al., 2008). Cette hormone, plus connue pour son rôle dans la tolérance au stress abiotique exerce un contrôle très fin sur les réactions de défenses. L'expression de *PRR2* n'apparaît cependant pas être régulée par l'ABA au cours du développement et en réponse à *P. syringae*.

En conclusion, la régulation transcriptionnelle de *CML9* et *PRR2* apparaît très complexe Bien que ces deux gènes présentent un profil d'expression similaire en réponse à la souche virulente de *P. syringae* et en réponse à des hormones de stress impliquées dans les réactions de défense à cet agent pathogène comme le SA et le MeJA, *CML9* présente cependant un profil d'expression qui apparaît également altéré en réponse à la flagelline et à l'ABA. **Ces données d'expression suggèrent que *CML9* et *PRR2* pourrait interagir au cours de la défense à *P. syringae* dans une voie de signalisation dépendante du SA mais pourraient aussi intervenir dans d'autres fonctions.** Les approches génétiques gain et perte de fonction utilisées au cours de cette thèse ont permis d'éclairer nos connaissances sur les fonctions de *CML9* et *PRR2* dans les réactions de défense et plus spécialement dans les réponses à *P. syringae*.

***CML9* et *PRR2* sont deux régulateurs positifs de la résistance basale à l'agent pathogène *Pst* DC3000 impliqués dans une voie de signalisation SA**

Les tests de sensibilité des génotypes *CML9* et *PRR2* en réponse aux souches virulentes de *Pst* DC3000 et *P. syringae pv maculicola* nous ont conduit à la conclusion que *CML9* et *PRR2* se comportent comme des régulateurs positifs de la résistance basale à ces pathogènes.

Dans un premier temps, plusieurs arguments nous ont incité à rechercher si *CML9* et *PRR2* sont impliqués au cours de l'immunité pré- ou post-invasive. En effet, différents travaux ont démontré que le gène *FLS2* est plus fortement exprimé au niveau des cellules de garde des stomates et qu'une application exogène de flg22 provoque une fermeture rapide des stomates contribuant ainsi à l'immunité pré-invasive (Melotto et al., 2008). Or, les travaux de Zipfel (2004) ont montré que des mutants *fls2* sont plus sensibles que les plantes sauvages à la bactérie *Pst* DC3000 lors d'infections par pulvérisations alors que les infiltrations foliaires conduisent à de très légères différences. L'ABA serait notamment impliqué dans cette immunité pré-invasive, puisque cette hormone est responsable de la fermeture stomatique et de ce fait empêche les pathogènes de pénétrer dans les tissus de l'hôte (Melotto et al., 2006). Etant donné que l'expression de *CML9* et

PRR2 est localisée au niveau des stomates et que l'expression de *CML9* est altérée en réponse à la *flg22* et à l'ABA, nous avons recherché si le mode d'inoculation avait un effet sur la croissance bactérienne de *Pst* DC3000 chez les géotypes *CML9* et *PRR2*. Différentes méthodes d'inoculation par infiltration à la seringue, par pulvérisation et des infections *in vitro* en milieu liquide ont été testées et ont donné les mêmes résultats. Aussi, quelque soit le mode d'infection, *CML9* et *PRR2* se comportent comme des régulateurs positifs de la défense à *Pst* DC3000. Ces résultats nous confortent dans l'idée que **CML9 et PRR2 agiraient au cours de l'immunité post-invasive**. L'étude de la fermeture stomatique chez les lignées *CML9* et *PRR2* en réponse à des PAMPs comme la *flg22* nous permettrait de confirmer ces observations.

Dans le contexte de l'interaction entre *Arabidopsis* et *P. syringae*, les réactions de défense sont finement contrôlées par la balance hormonale (Pieterse et al., 2012). Etant donné que les profils d'expression de *CML9* et *PRR2* apparaissent altérés en réponse à des hormones de défense, la quantification de l'accumulation de SA, JA et d'ABA chez les lignées *CML9* et *PRR2* a été effectuée en réponse à *Pst* DC3000. Aucune différence significative entre les géotypes *CML9* en terme de cinétique et d'amplitude de production de SA et JA n'a pu être mise en évidence aux temps étudiés après infection. Ces résultats nous indiquent que **la production hormonale n'est pas affectée chez les lignées CML9 en réponse à Pst DC3000**. Bien que *CML9* semble ne pas être impliqué dans la régulation de l'homéostasie hormonale, la quantification de l'expression de gènes marqueurs de défense clefs des voies de signalisation hormonales indique que **CML9 pourrait être impliqué dans une voie de signalisation SA en réponse à Pst DC3000**. En effet, le gène *PR1* marqueur de la voie SA apparaît clairement et significativement régulé de manière différentielle entre les géotypes *CML9* en réponse à l'infection par la souche virulente de *P. syringae*.

A la différence de *CML9*, chez les lignées *PRR2* les dosages réalisés ont montré que **PRR2 impacte la cinétique d'accumulation de SA en réponse à Pst DC3000** puisque les surexprimeurs *PRR2* accumulent plus rapidement cette hormone de défense après infection. Au contraire, l'accumulation de MeJA et d'ABA n'est altérée ni en terme de cinétique, ni en terme d'amplitude chez les géotypes *PRR2*. De plus l'analyse de gènes marqueurs des réponses de défense à *P. syringae*, révèle que **l'expression des gènes de biosynthèse et de signalisation SA sont dérégulés chez les géotypes PRR2 en réponse à Pst DC3000**. En conditions témoins, la production de SA et l'expression de gènes marqueurs n'apparaît pas perturbée chez les lignées *PRR2* ce qui signifie que *PRR2* viendrait amplifier les réactions de défense dépendantes du SA en réponse à *Pst* DC3000. L'ensemble de ces données nous confortent dans l'idée que **PRR2 pourrait être un acteur de la résistance à Pst DC3000 impliqué dans une voie SA**. Une approche génétique a été menée sur la fin de cette thèse afin de valider le positionnement de *PRR2* dans une voie de signalisation SA. Les mutants *prp2* ont été croisés avec des mutants de la voie SA, *sid2*, *sid1* et *npr1*. Des tests d'infections avec *Pst* DC3000 sont en cours afin de déterminer si les deux mutations sont épistatiques et de ce fait, si *PRR2* est bien impliqué au cours d'une voie SA en réponse à l'infection par la souche virulente de *P. syringae*.

Les résultats de ces dosages hormonaux soulèvent plusieurs questions, et notamment, pourquoi la production hormonale est-elle altérée chez les géotypes *PRR2* et non pas chez les géotypes *CML9*?

CML9, comme la CaM typique et les CMLs d'*Arabidopsis*, interagit certainement avec d'autres partenaires en réponse à l'infection par *P. syringae*. Comme toute protéine de signalisation capable d'interagir avec plusieurs partenaires et de ce fait, capable de jouer sur la régulation de différents

processus au cours des réactions de défense, il est très difficile d'observer un effet majeur de CML9 sur une réponse biologique en particulier. En plus, des tests d'interaction *in vitro* réalisés par Popescu (2007), ont révélé que CML9 est capable d'interagir avec certains facteurs de transcription comme TGA2, TGA3 et WRKY53 qui régulent l'expression de gènes de défenses en réponse à un agent pathogène. TGA3 est connu pour interagir avec le facteur de régulation NPR1 et régule positivement l'expression du gène *PR1* (Johnson et al., 2003 ; Zhou et al., 2000). L'analyse du comportement des mutants *tga3* et *tga2* a montré que ces facteurs de transcription jouent respectivement un rôle positif et un rôle négatif dans la résistance à *Pst DC3000* (Kesarwani et al., 2007). WRKY53 agit comme régulateur positif de la défense à *Pst DC3000* mais comme régulateur négatif de l'expression de *PR1* (Murray et al., 2007). Des tests d'interaction en double hybride chez la levure n'ont cependant pas permis de valider l'interaction CML9/TGA3 ou CML9/WRKY53 *in vivo* (communication personnelle de Benoît Ranty). De plus, des tests d'activité transcriptionnelle menés au laboratoire n'ont pas permis de conclure quant à l'effet de CML9 sur l'activité de TGA3 et WRKY53 (Perochon, 2010). Parmi les 113 partenaires de CML9 identifiés *in vitro* (Popescu et al., 2007) il serait intéressant de rechercher ceux qui exercent un effet régulateur sur les voies hormonales et de valider leur interaction avec CML9 afin de pouvoir mener par la suite une étude plus détaillée de l'effet de CML9 sur ces partenaires dans un contexte d'interaction plantes-pathogènes.

L'accumulation de SA et la surexpression de gènes associés aux voies de signalisation SA (notamment les gènes *PRs*) est souvent accompagnée par l'accumulation de composés antimicrobiens de défense et de ce fait, à une meilleure tolérance à *Pst DC3000* (Glazebrook et al., 1996; Pieterse et al., 2012). Il est compté parmi les composés anti-microbiens principalement impliqués au cours de l'interaction entre *P. syringae* et *Arabidopsis*, des composés qui contribuent à renforcer les barrières physiques de défense comme la callose et des composés à activité anti-microbienne comme la camalexine, qui est la phytoalexine majeure d'*Arabidopsis* synthétisée en réponse à l'attaque par des phytopathogènes (Bednarek, 2012). Concernant la formation de papilles de callose, il a été démontré que la souche virulente de *Pst DC3000* injecte des effecteurs (AvrPtoB, AvrPto, HopM1) qui bloquent les flux de vésicules de sécrétion qui permettent le dépôt de callose au niveau de la paroi (Nomura et al., 2006). La formation de papilles de callose doit donc être étudiée dans un contexte d'interaction avec une bactérie non-hôte incapable d'injecter des effecteurs ou dans un système simplifié via l'utilisation de la *flg22* par exemple. En conséquence, nous avons choisi d'évaluer la formation de papilles de callose en réponse à la *flg22* et/ou en réponse à des souches non-hôtes ou délétées pour les effecteurs du pathogène, et de quantifier la production de camalexine en réponse à l'infection par la souche virulente de *Pst DC3000*. Par ailleurs, les voies de biosynthèse qui conduisent à la production de camalexine sont interconnectées avec les voies de biosynthèse des glucosinolates c'est pourquoi nous avons également dosé la production de ces composés en réponse à *Pst DC3000*. Etant donné que les lignées CML9 présentent des différences plus discrètes en termes de croissance bactérienne par rapport aux lignées *PRR2*, nous avons choisi de réaliser ces dosages uniquement chez les génotypes *PRR2*. Les dosages de camalexine réalisés ont montré que **PRR2 est un régulateur positif de l'accumulation de camalexine et pourrait aussi induire l'accumulation de certaines formes de glucosinolates en réponse à l'infection par *Pst DC3000***. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec le fait que **l'expression de gènes marqueurs des voies de production de la camalexine et des glucosinolates est fortement dérégulée en réponse à *Pst DC3000* chez les génotypes *PRR2***. Ces résultats nous ont menés à la conclusion que *PRR2* pourrait contrôler la production de ces métabolites secondaires en exerçant son rôle régulateur très

en amont dans la voie de biosynthèse de ces composés, peut-être sur la biosynthèse du tryptophane. De manière intéressante, des études ont démontré que CML9 est un régulateur clef du métabolisme d'autres acides aminés, les acides aminés branchés (BCAAs). En effet des travaux ont démontré que des mutants *cmI9* sont des hyper-accumulateurs de ces composés (Hirai, 2010). Bien que les BCAAs soient mieux connus pour leur rôle dans la tolérance hydrique, des travaux ont démontré que la production et le catabolisme de ces composés affectent la croissance bactérienne de *P. syringae* (Návarová et al., 2012; von Saint Paul et al., 2011; Zeier, 2013). **CML9 et PRR2 pourraient ainsi «amplifier» les réactions de défense en réponse à *P. syringae* en régulant l'accumulation de métabolites associés à la défense.** Pour mieux comprendre comment CML9 et PRR2 régulent le métabolisme dans un contexte d'interaction plantes-pathogènes, il est envisagé dans un premier temps de réaliser des quantifications de l'accumulation de camalexine, glucosinolates et BCAAs chez les génotypes *CML9* et de doser dans un deuxième temps la production de tryptophane chez les lignées *PRR2* en réponse à l'infection par *Pst* DC3000.

Est-ce que CML9 est nécessaire à la fonction de PRR2 au cours de la résistance basale ?

Les données obtenues au cours de ce projet de thèse nous ont conduits à établir que CML9 et PRR2 sont des régulateurs positifs des défenses en réponse à l'infection par la souche virulente *Pst* DC3000. Cependant, **nos travaux actuels ne nous permettent pas d'affirmer si CML9 et PRR2 sont bien impliqués dans une même voie de signalisation et si CML9 est l'élément qui régule l'activité de PRR2 dans ce contexte d'interaction Arabidopsis-Pst DC3000.** Pour ce faire, nous avons choisi de réaliser une approche génétique via la génération de double mutants *cmI9/prr2*. Cependant, les outils génétiques dont nous disposons ne sont pas suffisamment robustes pour justifier cette approche. En effet, les phénotypes obtenus en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 avec le mutant *K.O cmI9* sont discrets. Les différences observées entre un mutant *cmI9* et le Wt sont difficilement quantifiables. C'est le cas aussi du mutant *prr2* qui est un mutant *K.D* d'expression réduite et non pas un véritable *K.O*. Des mutants pertes de fonction *K.O* pour *PRR2* ne sont pas disponibles. De plus le mutant *K.O cmI9* est issu de l'écotype Col8 alors que le mutant *K.D prr2* est issu de l'écotype Col0. Or, des expériences réalisées dans l'équipe ont confirmé à plusieurs reprises qu'il existe des différences significatives dans la sensibilité des écotypes Col8 et Col0 face à *Pst* DC3000. Nous ne disposons donc pas d'un génotype Wt de référence pour le double-mutant.

Pour remédier à ce problème et déterminer si l'effet de PRR2 est dépendant ou non de CML9, plusieurs approches alternatives ont été envisagées et différents outils ont été générés au cours de ce travail de thèse. Tout d'abord, le **croisement des lignées transgéniques surexprimant PRR2 avec le mutant *K.O cmI9*** a été effectué afin de déterminer si l'absence de CML9 altère la résistance et les réponses de défense à *Pst* DC3000. Le phénotypage de ces lignées en réponse à *P. syringae* est en cours dans l'équipe.

Il faut prendre aussi en compte que PRR2 est capable d'interagir avec CML8 et CML11, d'autres CMLs du groupe 2. Des travaux entrepris dans l'équipe sur des lignées perte et gain de fonction pour *CML8* et *CML11* ont montré que CML8 serait impliqué dans les réponses de défense à *Ralstonia Solanacearum* alors que CML11 pourrait contribuer à la résistance à *Pst* DC3000 de manière indépendante de la voie flagelline (communication personnelle de J.P Galaud). Il est donc possible que PRR2 soit régulé par d'autres CMLs que CML9 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000. L'absence de mutants de CMLs du groupe II dans la même accession que PRR2 (WS4, WS0, Col8 ...)

ne nous permet pas d'envisager de réaliser des doubles mutants *prp2/cml(s)*. Aussi, **des lignées transgéniques K.O pour les CMLs ont été générées récemment dans l'équipe par une stratégie miRNA** ciblant l'ensemble des CMLs du groupe 2 d'*Arabidopsis* auquel appartient CML9. **Ces lignées ont été générées dans l'accession Col8 et également dans les deux lignées transgéniques surexprimant PRR2.** Le phénotypage de ces lignées transgéniques ne nous permettra pas de mettre en évidence si CML9 seule est nécessaire à la régulation de la fonction biologique de PRR2 en réponse à *P.syringae*, mais nous permettra de déterminer si les CMLs du groupe 2 sont nécessaires à son rôle au cours de la défense.

Mis à part les approches génétiques, des approches biochimiques peuvent aussi être envisagées pour mieux comprendre dans quel contexte interagissent CML9 et PRR2. Les travaux de thèse de Perochon (2010) ont montré une interaction physique *in planta* entre CML9 et PRR2 par une analyse FRET-FLIM après co-expression des deux protéines dans des épidermes de feuilles de *N. benthamiana*. Des lignées transgéniques exprimant des formes étiquetées de CML9 et PRR2 permettraient de réaliser des **expériences de co-immunoprécipitation dans un contexte physiologique donné**: après infection par *Pst* DC3000, en réponse au SA...

De plus, afin d'évaluer le rôle de l'interaction avec CML9 sur ces processus, il apparaît important d'évaluer le rôle biochimique de PRR2. L'analyse de la séquence protéique de PRR2 a permis de mettre en évidence que PRR2 possède toutes les caractéristiques structurales d'un facteur de transcription: un domaine GARP de liaison à l'ADN et une région riche en proline. Cependant, des tests réalisés par Perochon (2010) ont démontré que PRR2 n'est pas capable de lier la séquence cis (G/A)GAT(T/C), liée par les régulateurs de réponses de type B possédant le motif GARP comprenant ARR1, ARR10 et ARR11 (Sakai et al., 2000; Hosoda et al., 2002; Imamura et al., 2003). D'autres analyses bioinformatiques proposent la séquence CCAATC comme l'élément *cis* reconnu par les GLKs et la séquence GCATATTC reconnu par PHR1 (Rubio et al., 2001). Pour mettre en évidence les activités biochimiques de PRR2 et plus particulièrement sa liaison à l'ADN, les gènes cibles de PRR2 ont été recherchés au cours de la croissance et du développement et en réponse à la flagelline. Parmi les gènes dérégulés dans l'analyse transcriptomique réalisée au cours de la croissance et du développement un motif *cis* putatif reconnu par PRR2 a été identifié. Les résultats de cette analyse bioinformatique a permis de mettre en évidence la séquence CACGT(G/C) qui pourrait être reconnue par PRR2. Des tests de liaison à l'ADN *in vitro* sont en cours afin de déterminer si PRR2 est bien capable de reconnaître cette séquence. Cette approche présentant plusieurs limites, il est aussi envisagé d'effectuer des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine à partir des lignées transgéniques surexprimant PRR2 fusionné au tag 3HA. Le séquençage des séquences isolées permettrait d'identifier une séquence consensus reconnue par PRR2. Ainsi, les promoteurs des gènes cibles directs de PRR2 pourront de ce fait être identifiés et validés par des expériences de PCR en utilisant des couples d'amorces spécifiques des gènes candidats sur l'ADN précipité par les expériences de CHIP. **Des essais de transactivation de PRR2 en présence ou en absence de CML9 ou d'autres CMLs et en présence ou non de calcium sont aussi envisagés.**

CML9 et PRR2 sont deux acteurs de la résistance non hôte qui présentent des fonctions opposées en réponse à la flagelline

Si le profil d'expression de *CML9* apparaît être régulé de manière FLS2 dépendante en réponse à *P. syringae*, l'expression de *PRR2* semble ne pas être dépendante de la perception de flagelline. Nous avons alors recherché si *CML9* et *PRR2* sont impliqués uniquement au cours de la résistance basale en réponse à *P. syringae* ou si au moins l'un de ces deux partenaires est impliqué au cours de la résistance non-hôte en réponse à la perception de PAMPs. Pour cela, nous avons utilisé une souche de *Pst* DC3000 *hrcc-*, mutée dans le système de sécrétion de type III et de ce fait incapable d'injecter des effecteurs et de supprimer les défenses des plantes. Ainsi cette souche nous permet d'observer uniquement l'effet des PAMPs du pathogène sur la croissance bactérienne *in planta* chez les génotypes *PRR2*. Dans ces conditions d'infection nous avons observé d'une part, la perte totale des différences entre les plantes mutantes *cml9* et sauvages et d'autre part, que les lignées surexprimant *CML9* présentent une sensibilité exacerbée à la souche *hrcc-* en comparaison avec les plantes sauvages (Col). Des résultats similaires ont été obtenus avec les génotypes *PRR2*. **CML9 et PRR2 exercent donc un rôle négatif sur la résistance à *P. syringae* en réponse aux PAMPs.** Ces résultats suggèrent que ce n'est pas *via* la perception des PAMPs que *CML9* et *PRR2* exercent leur rôle de régulateur positif de la défense en réponse à des souches virulentes de *P. syringae*. Il est possible que *CML9* et *PRR2* exercent un rôle négatif dans la résistance non hôte à *P. syringae* et potentialisent les réactions de défense en réponse à l'injection des effecteurs de ce pathogène. Afin de préciser la fonction de *CML9* et *PRR2* dans les réponses à *P. syringae*, nous avons d'une part étudié le comportement des génotypes *CML9* et *PRR2* dans un contexte non-hôte en réponse à la flagelline et/ou en réponse à l'infection par des souches non hôtes de *P. syringae*.

Les expériences réalisées durant cette thèse ont montré que **les génotypes *cml9* présentent un comportement spécifique en réponse à la flagelline.** La reconnaissance de flg22 par le récepteur FLS2 déclenche des réponses très précoces telles que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'expression de gènes marqueurs de défense (Zipfel et al., 2004; Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2006). Un traitement flg22 induit aussi des réponses plus tardives comme la formation de papilles de callose (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Gómez-Gómez and Boller, 2002; Clay et al., 2009). Bien que la production de ROS ne soit pas altérée, nos expériences ont montré que la production de papilles de callose est particulièrement dérégulée chez les génotypes *cml9*. **CML9 agit comme un répresseur des réponses de défense comme la formation de dépôts de callose et l'expression de gènes marqueurs de défense (*PR1*) en réponse à la flg22.**

Ces résultats originaux ont incité à étudier le comportement des génotypes *cml9* vis-à-vis d'une bactérie non hôte incapable d'infecter *Arabidopsis thaliana* qui ne dispose pas des effecteurs suffisants pour contrecarrer les défenses de la plante. Ainsi, des infections avec la souche bactérienne **non hôte**, *P. syringae* *pv phaseolicola* (souche 1448a) a montré que *CML9* se comporte comme un régulateur négatif de la résistance dans ce contexte. Les résultats obtenus avec la souche *P. syringae* *pv phaseolicola* et *Pst* DC3000 *hrcc-* sont concordants et confirment le rôle de régulateur négatif de *CML9* dans la défense non hôte chez *Arabidopsis thaliana*.

Deux loci majeurs confèrent la résistance à *P. syringae* *pv phaseolicola* chez *Arabidopsis thaliana* : le premier est localisé sur le chromosome 5 et le second correspondant au gène *FLS2* (Forsyth et al., 2010). Grâce à une collaboration menée avec l'équipe de Carmen Beuzon de l'université de Malaga, une souche bactérienne *P. syringae* *pv phaseolicola* mutée sur le motif

peptidique reconnu par le récepteur FLS2 a été générée et utilisée pour inoculer les différents génotypes *cmI9*. Dans ces conditions, plus aucune différence significative n'est observée entre les génotypes sauvages et les surexprimeurs. **Dans un cas d'interaction avec un pathogène non-hôte, le rôle de régulateur « négatif » de CML9 semble donc dépendant de la perception et de l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la flagelline.**

Afin de tenter de confirmer l'implication de la voie flagelline chez les plantes dans le comportement des génotypes *cmI9* nous avons utilisé une souche mutée dans les effecteurs par la souche $\Delta AvrPtoB/\Delta AvrPto$ qui bloquent normalement la voie de signalisation de la flagelline (Göhre et al., 2008 ; Xiang et al., 2008). L'absence de ces effecteurs chez les bactéries *Pst* DC3000 rétablit le fonctionnement de la voie flagelline. Après infection, le mutant *cmI9* reste plus sensible à l'infection par cette bactérie et que par contre, les surexprimeurs présentent le même comportement que des plantes sauvages. Ainsi, lorsque le blocage de la voie flagelline est partiellement levé par l'absence des effecteurs *AvrPtoB/AvrPto*, CML9 a tendance à se comporter encore une fois comme un régulateur négatif de la résistance à *P. syringae*.

CML9 est donc un régulateur négatif de la résistance non-hôte qui affaiblit les défenses en réponse à la perception de la flagelline et un régulateur positif de la résistance basale à *P. syringae* qui au contraire potentialise les défenses des plantes en réponse à l'injection d'effecteurs. Ces résultats sont assez originaux puisque très peu de données dans la littérature décrivent des éléments de signalisation qui à la fois contrecarrent les défenses associées à la perception des PAMPs et potentialisent les défenses basales en réponse aux effecteurs du pathogène. Certaines protéines constituent « un lien mécanistique » entre les réponses associées à la perception des PAMPs et les réponses associées à la sécrétion des effecteurs. Certains facteurs de transcription de type WRKY par exemple agissent comme des suppresseurs des défenses associées à la PTI en réponse à des pathogènes bactériens. L'utilisation de suppresseurs de la PTI est une stratégie efficace développée par la plante pour pouvoir mettre en place plus rapidement l'ETI, plus forte et durable contre l'agent pathogène. Chez l'orge, la protéine de résistance nucléaire MLA (*mildew A*) confère la résistance contre l'oïdium. La reconnaissance de la protéine d'avirulence A10 de l'oïdium par la protéine MLA entraîne l'interaction de cette dernière avec des facteurs de transcription de type WRKY. Ces WRKYs sont connus pour réprimer les défenses associées à la perception des PAMPs. L'association MLA/WRKY interfère avec leur fonction de répresseurs, et permet la résistance spécifique (Shen et al., 2007). Nous pouvons émettre l'hypothèse que **le recrutement de certains partenaires de CML9 à un moment donné au cours de l'infection puisse être à l'origine de l'issue de l'interaction entre *Arabidopsis* et *P. syringae*.** La protéine RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*) d'*Arabidopsis* agit aussi comme un régulateur négatif des réactions de défenses en réponse aux PAMPs avant même la sécrétion d'effecteurs par le pathogène (Kim et al., 2005). Certains effecteurs vont interagir avec les fonctions de cette protéine afin d'augmenter la sensibilité des plantes à l'agent pathogène (Hoorn and Kamoun, 2008). Bien que ce contexte semble être profitable au pathogène, il a été démontré que la suppression de la PTI par les effecteurs va permettre de déclencher des réponses spécifiques de type ETI beaucoup plus efficaces et durables lorsque la plante possède les protéines de résistance adéquates pour contrecarrer l'effet des effecteurs. En réponse à la souche virulente de *P. syringae*, CML9 pourrait aussi être impliqué dans une voie ciblée par des effecteurs. Si cette hypothèse n'a pas encore été testée dans le cas de CML9, des infections réalisées sur les lignées PRR2 avec des souches délétées pour certains effecteurs nous laisse fortement penser que CML9 et PRR2 pourrait être impliqués dans une voie ciblée par des effecteurs.

Bien que CML9 réprime les réponses de défense de manière FLS2 dépendante, **PRR2 au contraire se comporte comme un régulateur positif des réponses de défense après application exogène de flg22**. En effet, nous avons recherché si les réponses de défense comme la formation de papilles de callose et l'expression de gènes marqueurs de défense sont altérées chez les lignées PRR2. Nos expériences ont permis de montrer que PRR2 est un régulateur positif de l'accumulation de papilles de callose et exerce un rôle positif sur l'expression de gènes marqueurs de défense, de gènes associés à la voie SA et l'expression de gènes impliqués dans l'accumulation de composés antimicrobiens en réponse à la flg22. Il paraît donc peu probable que CML9 et PRR2 soient impliqués dans une même voie de signalisation en réponse à la flg22 ou bien CML9 pourrait exercer un effet régulateur négatif sur l'activité de PRR2 en réponse à la flg22. L'utilisation des lignées transgéniques surexprimant PRR2 croisées avec le mutant *K.O cml9* est un outil qui nous permettrait de mettre en évidence si CML9 exerce un effet « négatif » sur la fonction de PRR2 dans la mise en place des défenses en réponse à la flagelline, à savoir, est-ce que l'absence de CML9 permettrait d'« exacerber » le phénotype des lignées surexprimant PRR2 en réponse à la flg22 ?

Ces résultats posent aussi la question du mécanisme de régulation de PRR2. Il est possible que PRR2 soit régulé par un mécanisme autre que l'interaction avec des CMLs en réponse à la flg22 ou bien que d'autres protéines interfèrent avec la formation du complexe CML9-PRR2 dans ce contexte. Parmi les gènes cibles de PRR2 mis en évidence par l'analyse transcriptomique, l'identification d'un élément cis-régulateur reconnu par PRR2 nous permettrait de répondre à cette question. En effet, pour pouvoir mettre en évidence quel est l'élément régulateur qui permet à PRR2 d'exercer sa fonction biologique en réponse à la flagelline, il faudrait dans un premier temps identifier les partenaires de PRR2 en réponse à la flg22 et dans un deuxième temps réaliser des tests de liaison à l'ADN et/ou des tests de transactivation de PRR2 en présence ou non du partenaire identifié.

Le comportement de PRR2 en tant que régulateur négatif en réponse à la souche hrcc- n'est donc pas dû à la perception de la flg22. PRR2 serait donc un régulateur positif de la résistance non-hôte en réponse à la perception de flg22. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il est envisagé d'étudier le comportement des génotypes *PRR2* en réponse à des souches non-hôtes telles que *P. syringae pv phaseolicola* mutée sur le motif peptidique reconnu par le récepteur FLS2 et en réponse à la souche $\Delta AvrPtoB/\Delta AvrPto$ qui bloquent normalement la voie de signalisation de la flagelline. Pour expliquer le comportement des lignées PRR2 en réponse à la souche hrcc-, nous pouvons supposer que PRR2 agit comme un régulateur négatif de la défense en réponse à la perception d'autres PAMPs que la flagelline. Il est aussi bien connu que *P. syringae* va pouvoir manipuler les défenses de l'hôte par différentes stratégies telles que la sécrétion de toxines. La coronatine notamment est bien connue pour affaiblir les réactions de défense, notamment les défenses SA-dépendantes et l'accumulation de glucosinolates et de callose (Geng et al., 2012; Zheng et al., 2012). Afin de mieux comprendre pourquoi PRR2 se comporte comme un régulateur négatif des défenses en réponse à la souche hrcc-, Il est envisagé à l'avenir de réaliser des infections avec une souche *COR-* incapable de sécréter la coronatine.

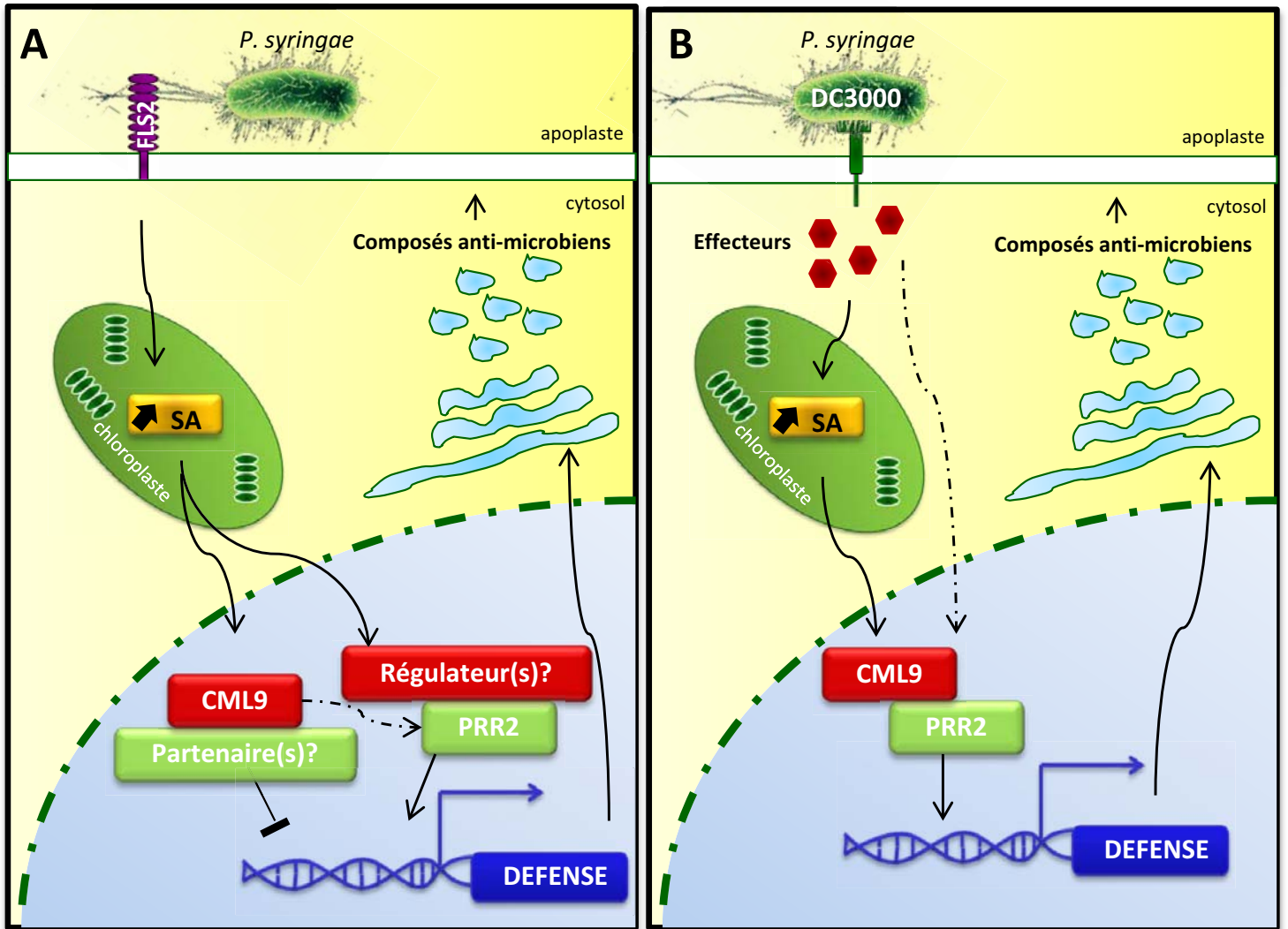


Figure II.34: Modèle hypothétique présentant la contribution de CML9 et PRR2 en réponse à l'infection par *P. syringae*

En conclusion, l'état actuel des connaissances sur CML9 et PRR2 au cours de l'interaction entre *Arabidopsis* et *P. syringae* nous a permis de construire un modèle hypothétique du fonctionnement de ces deux partenaires (**figure II.34**). Au cours de la résistance non hôte associée à la perception de la flg22, CML9 serait un régulateur négatif des réponses de défense qui n'interagirait pas avec PRR2 mais avec d'autres partenaires qui régulent négativement les réponses de défense associées au PAMPs (**figure II.34A**). Dans ce même contexte, PRR2 serait un régulateur positif des défenses qui contribuerait à l'accumulation de métabolites secondaires tels que la callose, la camalexine et les glucosinolates. Le mécanisme de régulation de PRR2 dans ce contexte est cependant encore inconnu (**figure II.34A**). Au cours de la résistance basale, CML9 et PRR2 pourraient tous deux interagir afin de potentialiser les réponses de défense en réponse à l'injection d'effecteurs de *P. syringae* dans une voie de signalisation SA dépendante (**figure II.34B**). Dans ce contexte, CML9 et PRR2 pourraient contribuer à l'accumulation de métabolites secondaires qui viennent renforcer les défenses et contribuent ainsi à une meilleure tolérance au pathogène (**figure II.34B**).

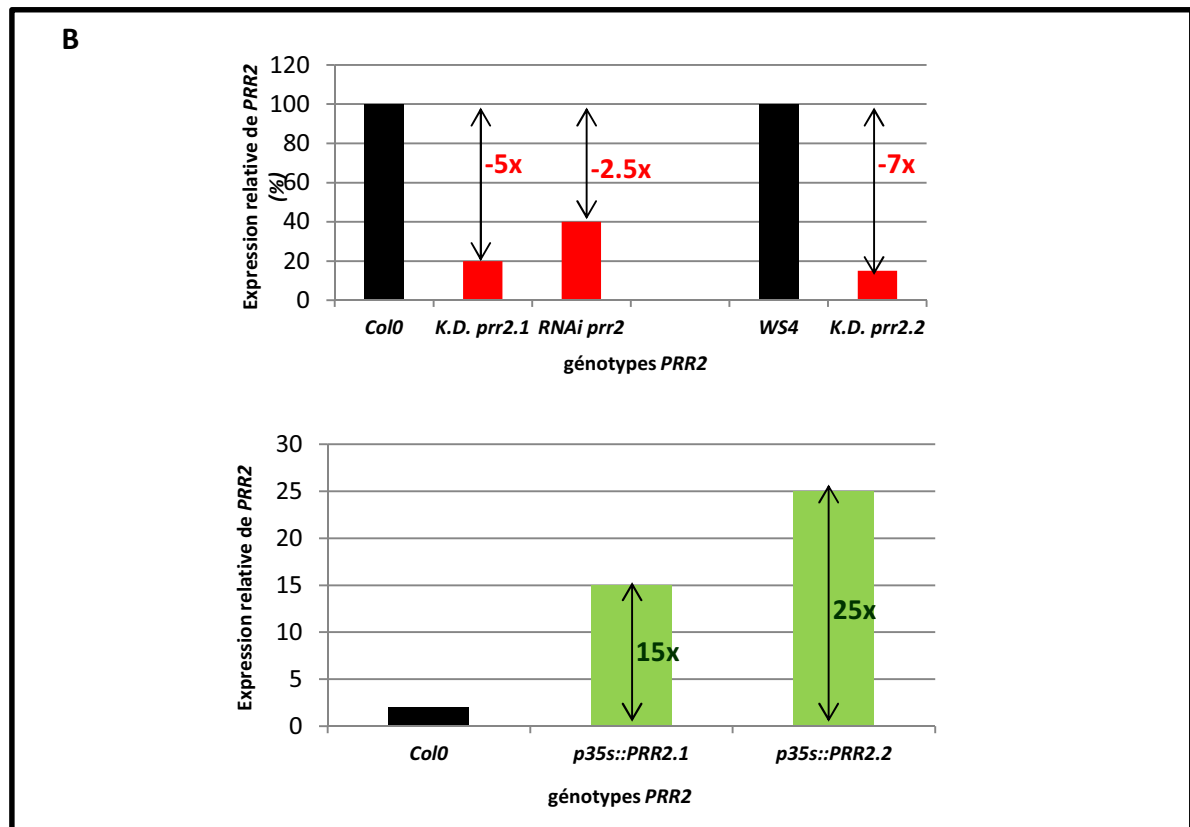
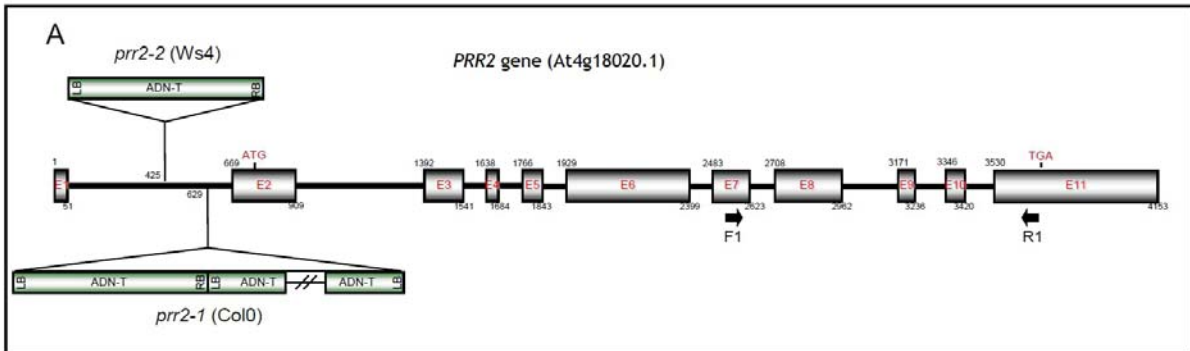


Figure M1: Caractérisation moléculaire des lignées d'insertion d'ADN-T dans le gène *PRR2*.

(A) Représentation schématique de la localisation des insertions d'ADN-T dans le gène *PRR2* dans les lignées mutantes *prr2.1* et *prr2.2*. Les introns et les exons du gène *PRR2* chez *Arabidopsis* sont représentés par des lignes et des boîtes respectivement. Les positions des amorces F1-R1 utilisées pour les amplifications PCR sont représentées par des flèches.

(B) Analyse du niveau d'expression du gène *PRR2* par RT-PCR quantitative dans les lignées mutantes, les lignées transgéniques surexprimant *PRR2* et le sauvage correspondant. Les séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR et la RT-q PCR sont présentées dans le tableau M2 dans le matériel et méthodes.

PARTIE IV: MATERIEL ET METHODES

I_Matériels biologiques

1. Matériel végétal et conditions de cultures

1.1 Matériel végétal

_ Arabidopsis thaliana

Les deux accessions Col (Columbia) et Ws4 (Wassilevskiya) d'*A. thaliana* ont été utilisées au cours de ce travail. Les lignées mutantes *cm19-1* (Col8) et *cm19-2* (Ws4) de *CML9* (At3g51920) ont été obtenues auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, UK) pour *cm19-1* et auprès de l'INRA de Versailles pour *cm19-2*. Des lignées homozygotes pour la mutation du gène *CML9* ont été utilisées dans cette étude (Magnan et al., 2008). Les plantes transgéniques surexprimant la séquence codante de *CML9* sous le contrôle d'un promoteur 35S (*Cauliflower mosaic virus*) ont été générées en utilisant le vecteur pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003). Deux lignées indépendantes homozygotes OE-CC-2 et OE-CC-5 (**O**ver **E**xpressor of **C***M*L9 in **C**ol8) ont été utilisées au cours de ce travail. La caractérisation moléculaire de ces lignées indiquent que la lignée OE-CC-2 présente un taux de transcrits du gène *cm19* 4 fois supérieur à l'écotype sauvage, et la lignée OE-CC-5 un taux 10 fois supérieur (Figure S2 manuscrit).

Deux mutants d'insertion dans le gène *PRR2* (*K.D. prr2.1* dans l'écotype Col et *K.D. prr2.2* dans Ws4) ont été obtenus auprès de la collection GABI-Kat et de l'INRA de Versailles. Des lignées homozygotes pour la mutation du gène *PRR2* ont été utilisées dans cette étude (Thèse Perochon, 2010). La caractérisation moléculaire de ces lignées indiquent que la lignée *prr2.1* présente une diminution d'expression de *prr2* d'un facteur 5 comparativement à l'écotype sauvage, et la lignée *prr2.2* une diminution d'expression d'un facteur 7 (Figure M1). Une lignée *RNAi* dans l'écotype Col (NASC ID: N225095, *RNAi prr2*) a été obtenue auprès du NASC. La caractérisation moléculaire de cette lignée indique une diminution d'expression par un facteur de 2.5 comparativement à une plante sauvage (Figure M1). Les plantes transgéniques surexprimant la séquence codante de *PRR2* fusionnée à l'épitope HA ont été générées en utilisant un vecteur dérivé du vecteur binaire pAMPAT. Deux lignées indépendantes homozygotes *p35s::PRR2.1* et *p35s::PRR2.2* ont été utilisées au cours de ce travail. La caractérisation moléculaire de ces lignées indiquent que la lignée *p35s::PRR2.1* présente un taux d'expression de *prr2* quinze fois supérieure à l'écotype sauvage, et la lignée *p35s::PRR2.2*, un taux vingt-cinq fois supérieur (Figure M1). La présence de la protéine de fusion PRR2-3HA a également été détectée à l'aide d'anticorps anti-HA (Roche).

Différents mutants de signalisation dans l'écotype Col ont été utilisés dans cette étude. Des mutants altérés dans la voie du SA (*sid1* et *sid2*, *npr1*), la voie du JA (*jar1*), et dans la perception de l'éthylène (*ein2*), de la flagelline (*fls2*) et du facteur d'élongation EF-Tu (*efr*) ont été obtenus auprès du NASC.

Des lignées transgéniques (Col0) ont été générées avec la séquence codante du gène de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène *PRR2*. La construction a été réalisée avec une séquence nucléotidique de 2387 bp située en amont du site d'initiation de la traduction (ATG), et introduite dans le vecteur de transformation pKGWFS 7.0 (Karimi et al., 2002).

1.2 Conditions de culture

Toutes les études comparatives des lignées mutantes et transgéniques ont été réalisées avec des lots de graines issus de plantes cultivées dans les mêmes conditions et à la même période de l'année-puis stockés dans les mêmes conditions.

_Culture en pots

Pour obtenir des plantes d'*Arabidopsis thaliana* au stade adulte, les graines sont semées sur tourbe (Jiffy, France) ou sur terreau (H4, Tref) en pots individuels. Après 3 à 4 semaines de croissance en salle de culture (température 22°C ; photopériode 16 h jour/8h nuit) les plantes sont utilisées pour l'expérimentation ou transférées en serre pour la production de graines. A l'apparition de la hampe florale, un système de récolte des graines (Aracon, Lehle Seeds) est mis en place et les graines après récolte sont stockées à 4°C.

_Culture *in vitro*

Pour les cultures *in vitro* sur milieu solide et en milieu liquide, les graines sont désinfectées pendant 30min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2.6% puis rincées 5 fois à l'eau stérile. Pour les cultures sur milieu solide, les graines sont semées dans des boîtes de Pétri sur milieu MS 0.5x (Murashige et Skoog, Sigma) à pH 5,7 additionné d'agar (0.8%) et de saccharose (1%).

Afin de synchroniser la germination, les boîtes sont placées 48 heures à 4°C avant d'être transférées en salle de culture. Pour les cultures en milieu liquide, les graines sont placées dans des microplaques de cultures stériles de 12, 24, ou 96 puits contenant du milieu MS (0.5X) à 0.5g/L de MES et 1% de saccharose à un pH de 5,7. Les plaques sont ensuite placées en salle de culture (température 22°C; photopériode 16 h jour s / 8h nuit).

2. Souches bactériennes et conditions de culture

Au cours de ce travail, les souches bactériennes suivantes ont été utilisées :

- Souche *DH5 α* d'*Escherichia coli*, utilisée pour le clonage du promoteur de *PRR2*. Les souches d'*Escherichia coli* transformées sont cultivées à 37°C dans un milieu LB liquide sous agitation ou LB agar contenant les antibiotiques appropriés.

Souches de <i>P.syringae</i>	Antibiotiques
<i>Pst</i> DC3000	Rifampicyne 50µg/ml
<i>Pst pv maculicola</i>	Rifampicyne 50µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 avrRPM1	Rifampicyne 50µg/ml
	Tétracycline 10µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 <i>Hrcc</i> -	Rifampicyne 50µg/ml
	Chloramphénicol 34µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 Δ AvrPto/ Δ AvrPtoB	Rifampicyne 50µg/ml
	Kanamycine 20µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 <i>pv phaseolicola</i>	Kanamycine 20µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 <i>pv phaseolicola</i> Δ flic	Kanamycine 20µg/ml
<i>Pst</i> DC3000 Δ cel	Rifampicyne 50µg/ml
	Chloramphénicol 34µg/ml

Tableau M1: Souches bactériennes de *P.syringae* et antibiotiques.

- Souche d'*Agrobacterium tumefaciens* souche C58C1 (*pMP90*) (Koncz *et al.*, 1989), utilisée pour la transformation stable d'*A. thaliana*. Cette souche est (i) résistance à la rifampicine grâce à un marqueur chromosomal et (ii) à la gentamicine grâce au marqueur du plasmide Ti (*Tumor inducing*). Le plasmide Ti porte les composants qui assurent le transfert de l'ADN-T des vecteurs de transformation vers le génome de l'hôte. Les souches d'*A. tumefaciens* transformées sont cultivées à 28°C sous agitation et à l'obscurité dans un milieu LB liquide contenant les antibiotiques appropriés.

_ Les souches de *P.syringae* utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le [tableau M1](#). Les bactéries sont cultivées 3 jours à 28°C sur milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat (Tableau M1). 20 ml de milieu LB liquide additionnés des antibiotiques adéquats sontensemencés à partir d'une pré-culture et au bout de 12h à 28°C sous agitation (200 tours/min) la culture est lavée avec de l'eau stérile et centrifugée à deux reprises 2 minutes à 7500g. Le culot de bactéries est remis en suspension dans 2 ml d'eau stérile et après mesure de la densité optique à 600 nm, la solution bactérienne est ajustée pour obtenir un inoculum à la concentration souhaitée.

II_Obtention et caractérisation de lignées transgéniques

1. Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

La transformation des plantes d'*Arabidopsis* pour l'obtention des lignées transgéniques portant le promoteur de PRR2 en fusion la séquence codante des gènes de la β -glucuronidase (GUS) est réalisée selon le protocole «Floral dipping» proposé par Logemann, (2006). Les agrobactéries contenant la construction d'intérêt sontensemencées dans un milieu LB liquide contenant l'antibiotique adéquat puis incubées à 28°C pendant une nuit. La culture est étalée sur milieu LB solide en boîte de pétri. Après 2 à 3 jours de culture à 28°C; les bactéries sont remises en suspension à la concentration souhaitée (DO à 600 nm de l'ordre de 1) dans un milieu de transformation (saccharose 50g/l et de silwet L77 0.04% (v/v)). Les hampes florales des plantes d'*Arabidopsis* sont immergées 30 secondes dans le milieu de transformation, égouttées et maintenues sous atmosphère humide pendant 24 h. Les plantes sont ensuite transférées à la serre jusqu'à la récolte des graines.

2. Sélection des plantes transformées

_ Sélection sur kanamycine des lignées *promPRR2::GUS*

La sélection de ces lignées s'effectue sur milieu MS additionné de 50 μ g/ml de kanamycine. La ségrégation est déterminée par le taux de plantes sensibles en fonction du nombre de graines germées. Les plantes sensibles se différencient des plantes résistances par leur couleur jaune-blanc, un arrêt du développement au stade cotylédon et l'absence de développement de la racine dans le milieu. Après transformation, des plantes T1 résistantes à la kanamycine ont été repiquées sur Jiffy et menées à graine pour produire la génération T2. En T2, la ségrégation $\frac{3}{4}$ résistante et $\frac{1}{4}$ sensible est recherchée. Elle suggère la présence d'une seule insertion de la construction dans le génome de la plante ou d'une insertion à un seul locus. En T3, la ségrégation 100% résistante est recherchée, elle indique que la lignée est très certainement homozygote pour le transgène.

_ Sélection sur Basta® des lignées *p35s::PRR2.1* et *p35S::PRR2.2* et *RNAi PRR2*

La sélection de ces lignées s'effectue sur milieu MS additionné de basta (glufosinate ammonium) à 5mg/L. Les plantes sensibles se différencient des plantes résistantes par la présence d'une forte quantité d'anthocyanes donnant une coloration mauve et un arrêt du développement au stade cotylédon. Les plantes résistantes sont repiquées sur Jiffy et menées à graine jusqu'à l'obtention de lignées homozygotes en T3 comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

_ Sélection sur sulfadiazine des lignées *K.D. prr2.1* et *K.D. prr2.2*

La sélection de ces lignées s'effectue sur milieu MS additionné de sulfadiazine à 5.25mg/L. Les plantes sensibles chlorosées se différencient des plantes résistantes par leur coloration jaune. Les plantes résistantes sont repiquées sur Jiffy et menées à graine jusqu'à l'obtention de lignées homozygote en T3 comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

III_ Protocole d'infection des plantes par les pathogènes bactériens

1. Infections par *P. syringae*

Le comportement des différents génotypes d'*Arabidopsis* face à *P. syringae* a été analysé sur des plantes adultes (stade rosette) inoculées par pulvérisation ou infiltration foliaire, ainsi que sur de jeunes plantules co-cultivées avec l'agent bactérien.

_ Inoculation par infiltration foliaire

Les plantes sont cultivées sur du terreau en conditions de jours courts (température 22°C; 8h jour/ 16h nuit). Après 4 semaines de culture les plantes sont placées dans une atmosphère à forte hygrométrie 12 heures avant l'inoculation.

L'inoculation est réalisée à l'aide d'une seringue sans aiguille, en faisant pénétrer la suspension bactérienne dans la face abaxiale de feuilles de même rang. Les inoculations sont réalisées sur la moitié du limbe foliaire d'un seul côté de la nervure centrale afin d'observer les symptômes développés au cours de l'interaction. Dans le cas d'échantillons destinés au dénombrement de la croissance bactérienne, la zone inoculée est étendue à l'ensemble de la feuille. Pour la quantification de la croissance bactérienne *in planta*, 4 disques foliaires sont prélevés sur 5 plantes par génotype dans des tubes eppendorf et broyées dans un broyeur à billes (30s à 30 hertz) pour extraire les bactéries. Des dilutions en série (1/10ème au 1/10000ème) sont ensuite réalisées dans du MgCl₂ (10mM) et 5 µl de chaque dilution sont déposés sur un milieu contenant les antibiotiques adaptés à la croissance des bactéries. Chaque dépôt est répété trois fois. Les boîtes sont ensuite placées à 28°C pendant 2 jours et le nombre de colonies est déterminé. En parallèle de ces expériences de quantification, l'apparition de symptômes de maladie est analysée et photographiée.

_ Inoculation par pulvérisation

L'infection est ici réalisée sur des plantes cultivées dans les mêmes conditions que précédemment en pulvérisant l'inoculum additionné de Tween 20 à 0.05% de manière homogène sur la face adaxiale des feuilles. La quantification de la croissance bactérienne est effectuée de la même façon que pour les infections par inoculation foliaire.

_Inoculation par immersion

Après désinfection, les graines sont semées sur milieu MS en boîte de Pétri (MS 0,5X ph 5,7, 1% saccharose, 0.8% agar) et maintenues 48h à 4°C. Les boîtes sont ensuite transférées en phytotrons (température 22°C; 16h jour / 8h nuit). 10 jours après germination, les plantules sont transférées en plaque 24 puits (6 plantules/puit) dans du MS liquide (MS 0,5X ph 5,7, 1% saccharose), l'infection est réalisée après 48h de culture en milieu liquide en remplaçant le milieu MS par l'inoculum à la concentration souhaitée. Pour la quantification de la croissance bactérienne *in planta*, les plantules sont d'abord immergées pendant 1 min dans de l'éthanol 70%, puis rincées 2 fois à l'eau UHQ stérile pendant 1 min. Le pool des 6 plantules est placé dans un tube eppendorf (5 tubes par génotype) puis broyé dans un broyeur à billes (30s à 30 hertz) pour extraire les bactéries dont le dénombrement est réalisé comme précédemment.

2. Infection par *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris*

_ Inoculation par *Ralstonia solanacearum*

La culture de la souche *Ralstonia solanacearum* GMI1000 et l'infection des plantes est réalisée comme décrit par Deslandes (1998). Les racines de plantes âgées de 4 semaines sont blessées en sectionnant la base des Jiffys, et la partie restante est trempée dans une solution bactérienne à la concentration de 10^8 cfu/ml durant 3 minutes. 16 plantes sont analysées par génotypes. Les plantes sont ensuite transférées en chambre de culture à une température de 25°C et une photopériode de 16h jour et 8h nuit. Le développement de la maladie est observé chaque jour après ce traitement et la notation est réalisée en parallèle. Les expériences sont réalisées deux fois de façon indépendante. Les résultats présentés correspondent aux symptômes moyens observés entre les expériences. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Y.Marco (LIPM).

_inoculation par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Les souches de *X. campestris* pv. *campestris* sont cultivées sur un milieu MOKA (extrait de levure 4 g/l, Casamino acids 8 g/l, K_2HPO_4 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/l). Les infections sont réalisées par piercing sur les plantes d'*Arabidopsis* cultivées en jours courts (9h lumière/15h obscurité, 22°C, $192 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) avec une suspension bactérienne à 10^7 cfu/ml. L'infection est réalisée sur 4 plantes par génotype et sur 4 feuilles par plante. Trois répétitions indépendantes de cette expérience ont été effectuées. Après inoculation, les plantes sont recouvertes d'un film plastique qui permet de garder une humidité proche de 100%. Les symptômes de maladie sont comptés entre 3 et 7 jours après

Tableau M2: liste des amorces utilisées pour la PCR et qPCR

AMORCES	SEQUENCE	DESCRIPTION
4CL3_leftprimer	GTC-TCC-CTC-AAG-CCA-TCC-TT	AT1G65060
4CL3_rightprimer	AAG-GCT-CAT-TGA-CAA-CAC-TGG	
ACS2#1_leftprimer	CGACGACTTTACGAGGATGG	At1G01480
ACS2#1_rightprimer	GCTCGGAGAAGAGGTGAGTG	
ACS2#2_leftprimer	TTCAAGCTCCGACAATTTCA	At1G01480
ACS2#2_rightprimer	TGATGGGTTGGTCAAATCA	
ACS5#1_leftprimer	TCGACATCTGCGAATGAGACT	At5G65800
ACS5#1_rightprimer	TCTCCATTTAAGATCTCTATCAAATCC	
ACS5#2_leftprimer	GGCATGCTGAATTCAAAA	At5G65800
ACS5#2_rightprimer	GAACGTGACACGGTTTCCTC	
ACS6#2_leftprimer	GAGAGGATTAGAGTGTCTACTAGCC	At4G11280
ACS6#2_rightprimer	CATAGTTGTTGCAGCCATCG	
ACT8_leftprimer	CACCCGAGAGGAAGTACAGTG	AT1G49240
ACT8_rightprimer	CATACTCTGCCTTAGAGATCCACA	
AOC2_leftprimer	GAT-TTC-TCC-TAT-CCA-TCA-AGT-TTC-A	AT3G25770
AOC2_rightprimer	GAT-TTC-GTA-CAC-ACT-CAG-TTC-TTG-A	
AT4G25580_leftprimer	CTG-ACC-CCA-TCG-GAA-AAT-C	AT4G25580
AT4G25580_rightprime	CCC-AAC-CCT-AAC-CTT-CCA-AT	
ATCTH (left primer)	AGC-TGA-GAG-CGG-AGA-TGT-ATG-C	AT2G25900
ATCTH_rightprimer	TCC-AAG-TCG-ACT-CAA-CCG-AGT-G	
ATMYC2#7_leftprimer	CCAGCTCGAGGAAGTGA AAC	AT1G32640
ATMYC2#7_rightprimer	CGAAGAACACGAAGACGACA	
BAP2_leftprimer	CAT-ACA-GCG-TTG-TGA-GAA-TCG	AT2G45760
BAP2_rightprimer	CCC-TCC-TAG-TTC-ATC-CAC-TTT-G	
BBX27_leftprimer	CAT-CAC-AAG-GCT-CAA-GGA-GAA	AT1G68190
BBX27_rightprimer	GCC-ATT-TTC-TTG-GGA-CCA-TA	
bHLH_leftprimer	CAC-TTA-AAC-TCT-CTC-CGA-TCT-CTC-A	AT4G01460
bHLH_rightprimer	CCT-ACA-ATC-GAA-GCT-TGG-TCA	
BIK1_leftprimer	CCG-ATC-TCC-GTT-CAC-ATC-TC	AT2G39660
BIK1_rightprimer	TTC-AAC-CCA-CAA-GGC-AAA-A	
BT1_leftprimer	CGA-CGA-TGC-AGA-ATC-GAG	AT5G63160
BT1_rightprimer	CCT-TCG-GTG-CAT-ATG-TGT-TC	
BT2_leftprimer	GTT-GAG-ATC-GTT-ACC-TCC-GAT-AA	AT3G48360
BT2_rightprimer	TTT-CTT-CAT-GAT-GTT-CAT-CAG-TAC-C	
CaM1#1_leftprimer	GGTTTTGTCTAGTGAACGCATA	At5g37780
CaM1#1_rightprimer	GGTTTTGTCTAGTGAACGCATA	
CaM2#1_leftprimer	GATCAGCTCACAGACGATCAGA	At2g41110
CaM2#1_rightprimer	CCTTTGTGGTAATGCAACCA	
CaM7#1_leftprimer	TCGACAAAGACGGAGATGG	at3g43810
CaM7#1_rightprimer	CTGGAGCTCGGCTTCTGT	
CAMTA3#8_leftprimer	CTTCATTGGGCAGCTTTCTT	AT2G22300
CAMTA3#8_rightprimer	GGATTTGGGTCAGTTAAAGTTCC	
CBP60g#3_leftprimer	ATCGCAGCACATCGACTTT	AT5G26920
CBP60g#3_rightprimer	GTGGACCGTTGAGCTTGAA	
CHS#1_leftprimer	TCAGGCGGAGTATCTGACTA	AT5G13930
CHS#1_rightprimer	CGTTTCCGAATTGTCGACTT	
CHS_leftprimer	TCA-GGC-GGA-GTA-TCC-TGA-CTA	AT5G13930
CHS_rightprimer	CGT-TTC-CGA-ATT-GTC-GAC-TT	
CML10#1_leftprimer	GAGAGTTTGCCAGGCTTATGA	AT2G41090

infection, d'après un index de maladie de 0 (absence de symptômes) à 4 (nécrose des feuilles) comme décrit précédemment par Meyer (2005).

IV_ Méthodes d'analyses moléculaires

1. Extraction et dosage d'ARN

Après broyage des différents tissus d'*A. thaliana* (environ 100mg) dans l'azote liquide, les ARN totaux sont extraits selon les recommandations du kit «Macherey-Nagel Nucleospin», (Macherey-Nagel, Hoerd, France). La concentration en ARN est déterminée par deux mesures indépendantes de l'absorbance des extraits à 260nm et leur intégrité est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ARNs sont ensuite traités à la DNase Ambion® pour éliminer l'ADN génomique. Pour s'assurer qu'il ne reste aucune trace d'ADN génomique dans les échantillons, 2µl d'ARN à une concentration de 0,5µg/µL sont utilisés pour une réaction PCR avec les amorces de l'actine. La migration sur gel des produits de la réaction PCR, leur coloration au BET et visualisation sous lumière UV sont ensuite réalisées. Les ARNs sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse

2 µg d'ARN végétaux sont utilisés pour une réaction de rétrotranscription réalisée à l'aide du kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems®) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc obtenus sont aliquotés puis stockés à -20°C. Une PCR est réalisée sur 2µL d'ADNc avec les amorces de l'actine afin de s'assurer de la qualité des ADNc.

3. Réalisation de PCR quantitatives

Plusieurs appareillages ont été utilisés pour ce type d'analyse, soit le light Cycler (Roche) qui ou l'appareil 7900 HT (Roche) qui permettent de réaliser des analyses ponctuelles respectivement en capillaires et en plaques, soit le système Biomark (Fluidigm®) qui permet de traiter 9216 échantillons par analyse.

_ qPCR avec le Light Cycler (Roche)

La PCR quantitative en temps réel est réalisée grâce au kit "LightCycler FastStart DNA master SYBR Green (Roche, France) sur un appareil Light Cycler (Roche, France). Les ADNc sont dilués 20 fois et une gamme étalon est réalisée pour la quantification: 1 µL d'ADNc provenant des échantillons prélevés à différents points de la cinétique sont mélangés et des dilutions successives (0, 10, 100 et 1000) sont réalisées. Les amorces utilisées pour la PCR sont données dans le [Tableau M2](#). Les résultats de RT-qPCR sont analysés grâce à l'interface LightCycler Software version 1.5 (Roche). La quantification est réalisée par transformation arithmétique au maximum de la dérivée seconde de la courbe de fluorescence. La PCR est acceptable lorsque la représentation crossing point = f (dilution) donne une pente comprise entre -3,2 et -4 pour les différentes dilutions de la gamme. En plus de

CML10#1_rightprimer	CAAAGTGCCACCAGTTGTGT	
CML10#2_leftprimer	ACGACAAGAATGGTGATGGTC	AT2G41090
CML10#2_rightprimer	TAAACCGAGGGAACGCATC	
CML11#2_leftprimer	AAAATGGTTACATCTCTGCCAGT	AT3G22930
CML11#2_rightprimer	CACCATCCAAATCTGCCTCT	
CML12#2_leftprimer	GGAATCTTTCAGGTTATTCGACA	AT2G41100
CML12#2_rightprimer	AGGGAAAACATCACGGTACG	
CML24#4_leftprimer	GGTGATGGTTGTGTTAATTTTGTAT	at5g37770
CML24#4_rightprimer	AAATCTTCCAAATCCTCAAGCA	
CML43#1_leftprimer	GCTGCACTCCACAAAACCTT	at5g44460
CML43#1_rightprimer	GGAGACCCATCACAGCAACT	
CML8#1_leftprimer	TTTGACAAAGACCAAAATGGATAC	AT4G14640
CML8#1_rightprimer	TTCTTCATCTGTTAGCTTTTCTCT	
cml9_qpcr#3_leftprimer	TCATAGACAAAGATTCCGATGG	At3g51920
cml9_qpcr#3_rightprimer	GCAAGTTGTTCCGCCTTTG	
CO_leftprimer	ATT-CTG-CAA-ACC-CAC-TTG-CT	AT5G15840
CO_rightprimer	TTC-CAG-AAA-TTG-GTA-GAA-TTG-GA	
COI1#1_leftprimer	GTGTCCTAATTTGGAAGTTCTCG	AT2G39940
COI1#1_rightprimer	CTCCATTCTTGTTCATCTGC	
cor15a#2_leftprimer	TTCTCAGGAGCTGTCTCACTG	At2g42540
cor15a#2_rightprimer	GTTTTCTGGCCGACTCTGAC	
cor15B_leftprimer	ACC-TCA-ACG-AAG-CCA-CAA-A	AT2G42530
cor15B_rightprimer	CTT-TTG-TTT-TCT-CGC-CAT-CC	
CYP71A13_leftprimer	GAT-GTT-GTG-TTT-GCT-CCC-TAT-G	AT2G30770
CYP71A13_rightprimer	TTG-TTG-GTG-AGC-AGA-TTG-AGA	
CYP71B15_leftprimer	CAC-CAC-TGA-TCA-TCT-CAA-AGG-A	AT3G26830
CYP71B15_rightprimer	CGG-TCA-TTC-CCC-ATA-GTG-TT	
CYP81D11_leftprimer	CGA-GAA-ACG-TGT-GGA-GAA-AGT	AT3G28740
CYP81D11_rightprimer	TCC-CGG-CAA-GTA-TCA-TAA-CAA	
CYP82C2_leftprimer	TGC-AAT-TAC-TAG-CAT-TAA-ATC-TAC-CTG	AT4G31970
CYP82C2_rightprimer	TGT-AAG-GGT-TGA-TGG-TGA-AGT-CT	
DEFL_leftprimer	GGA-AGA-CGA-TCA-GCT-TCT-CAG-C	AT3G63360
DEFL_rightprimer	CGT-CTC-CTT-GCT-TCA-TCA-ATC-CTG	
DFR#1_leftprimer	AACGGATGTGACGGGTGTTTT	AT5G42800
DFR#1_rightprimer	TCCATTCAGTGTGCGCTTTA	
DFR_leftprimer	AAC-GGA-TGT-GAC-GGT-GTT-TT	AT5G42800
DFR_rightprimer	TCC-ATT-CAC-TGT-CGG-CTT-TA	
DREB_leftprimer	TTC-CTC-ATC-ATC-ACT-CTC-TCA-TTC	AT1G77640
DREB_rightprimer	CGT-AGT-GCC-GAC-GTT-GAA-G	
EDR1#3_leftprimer	TTGATAACAACCTGGAATGTTAAGGTC	AT1G08720
EDR1#3_rightprimer	TGGAGCCATCCATTCAGG	
EDS1#1_leftprimer	CTCAATGACCTTGGAGTGAGC	AT3G48090
EDS1#1_rightprimer	TCTTCTCTAATGCAGCTTGAA	
EDS5#4_leftprimer	GCTTCATAATTGGTTGTCTCACA	AT4G39030
EDS5#4_rightprimer	ATTGAAATCCGACGAGAACG	
eF1Ba2#1_leftprimer	GGCTTCCCAACTTGCTAAAA	At5G19510
eF1Ba2#1_rightprimer	CTGCAGGTGCCTCAGCTT	
EFR_leftprimer	TGTTGGTTACAATAGACTTGGAGGT	AT4G23550
EFR_rightprimer	CAATGTAGTGGACAGATTGGCTA	
ERF1#1_leftprimer	CTTCCCTTCAACGAGAACGA	AT3G23240

l'amplification du gène d'intérêt, chaque échantillon est utilisé pour une réaction avec les amorces pour les gènes de l'actine et de l'ubiquitine. Le niveau d'expression des différents gènes est analysé en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak et Schmittgen (Schmittgen and Livak, 2008).

_ qPCR avec l'appareil ABI 7900 HT

La PCR quantitative en temps réel est effectuée sur l'appareil 7900 HT (Applied Biosystems)avec le kit Power Sybr Green PCR Master Mix [®](Applied Biosystems). Les ADNc sont dilués 10 fois et une gamme étalon est réalisée pour la quantification: 1 μ L d'ADNc provenant des échantillons prélevés à différents points de la cinétique sont mélangés et des dilutions successives (0, 10, 100 et 1000) sont réalisées. Les amorces utilisées pour la PCR sont données dans le [Tableau M2](#). Les résultats de RT-qPCR sont analysés grâce à l'interface SDS 2.2[®]. La quantification est réalisée de la même façon que sur Light Cycler de Roche (voir § précédent).

_ qPCR avec le système Biomark (approche Fluidigm)

Afin de réaliser les expériences de RT-qPCR à haut débit un set d'amorces spécifiques déterminées par l'«*Universal Probe library-A.thaliana*» de Roche Applied-Science a été utilisé. Ces amorces ont été générées de façon à produire des amplicons de 80-100 paires de base ([Tableau M2](#)). Les amorces ont été choisies de façon à avoir que des amplifications spécifiques et dans la mesure du possible ces amorces encadrent un intron sur la séquence génomique. Les gènes analysés sont préamplifiés en utilisant les ADNc générés par la superscript II en utilisant le TaqMan preamp master MIX (Roche) et les différentes amorces choisies. Une fois ces pré-amplifications réalisées, les produits ainsi que les couples d'amorces choisis sont placés sur la plaque 96 puits de Fluidigm Biomark (BMKM- 96.96). Après la réaction de PCR quantitative dans la micropuce, l'expression relative des gènes est analysée en utilisant le logiciel Fluidigm et la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak 2008). Les données illustrées sont les moyennes et les écarts types de quatre répétitions biologiques indépendantes. Aucune variation n'a été observée sur le niveau d'expression des gènes actine 8, ubiquitine 10, et les valeurs obtenues pour ces gènes de référence ont été utilisées comme référence pour normaliser les données.

4. Analyse du transcriptome par microarray

Les analyses ont été réalisées à l'aide des puces à ADN CATMAv6 sur lame Roche-NimbleGen qui comprend 12 chambres d'hybridations indépendantes (=12-plex). Chaque chambre contient 38392 primers: 30834 primers correspondant à l'annotation des gènes de TAIRv8 (incluant 476 primers des gènes mitochondriaux et chloroplastiques) + 1289 primers correspondant aux prédictions spécifiques du logiciel EUGENE. De plus, il est inclus 5352 primers correspondant aux éléments-répétés, 658 primers miRNA/MIR, 342 otherRNA (rRNA,tRNA, snRNA, soRNA) et 36 contrôles. De plus amples informations sont disponibles sur le site web de l'URGV : <http://www.versailles.inra.fr/urgv/microarray.htm>.

ERF1#1_rightprimer	GTTTGTTGCGTGGACTGCT	
FLC_leftprimer	GCT-ACT-TGA-ACT-TGT-GGA-TAG-CAA	AT5G10140
FLC_rightprimer	GGA-GAG-GGC-AGT-CTC-AAG-GT	
FLS2#1_leftprimer	AACATCAGCCTTCGAGGGTA	AT3G25250.1
FLS2#1_rightprimer	ACATCGGCTTTTGTGTCACT	
FLS3_leftprimer	TCA-ATC-ACA-AAT-TCT-GGC-CTA-A	AT5G63590
FLS3_rightprimer	TGC-GTA-CTC-TTC-ATT-CAC-TTC-AA	
FRK1_leftprimer	GAG-ACT-ATT-TGG-CAG-GTA-AAA-GGT	AT2G19190
FRK1_rightprimer	AGG-AGG-CTT-ACA-ACC-ATT-GTG	
FT_leftprimer	GGT-GGA-GAA-GAC-CTC-AGG-AA	AT1G65480
FT_rightprimer	GGT-TGC-TAG-GAC-TTG-GAA-CAT-C	
GA3_leftprimer	TCC-CTG-CAG-GAA-GTG-AGA-TT	AT5G25900
GA3_rightprimer	ATA-TTT-GCC-ATC-ATC-AAG-AAA-CC	
GGT1_leftprimer	TTT-CTT-CCG-TCT-TAG-CTC-CAA	AT4G39640
GGT1_rightprimer	TCG-TAC-GAA-GCT-CTG-TTT-GGT	
glutaredoxin_leftprimer	CCC-GTG-CTG-GTT-AAA-AGG-T	AT5G18600
glutaredoxin_rightprimer	AAT-GGC-TCC-TTC-GTA-CTT-GC	
GSL-6#1_leftprimer	TTGCTCAGATGTGGAACAAAA	AT1G05570
GSL-6#1_rightprimer	GACCAATATGGCACAAGCAA	
ICS1#4_leftprimer	GCAGGGAGACTTACGAAGGA	At1g74710
ICS1#4_rightprimer	TGCTTCTCTGCTGGAAGC	
ICS2#2_leftprimer	ACTTTACAGTGCCCCAGGTC	At1g18870
ICS2#2_rightprimer	CAGTTGCAGCCAGCATTG	
JAR1#1_leftprimer	GCTTTTGCCTTCAGAAACAGA	AT2G46370
JAR1#1_rightprimer	CCTCCCGTTGATATGTACTGC	
JAZ1#2_leftprimer	GAGCAAAGGCACCGCTAA	AT1G19180
JAZ1#2_rightprimer	GCGATAGTAGCGATGTTGCTT	
LDOX#1_leftprimer	GAGCCTGACCGTCTAGAGAAAG	AT4G22880
LDOX#1_rightprimer	CAGGCTGAGGACATTTTGG	
LDOX_leftprimer	CGA-GTG-GAC-AAT-TGG-AAT-GGG-AAG	AT4G22880
LDOX_rightprimer	GCG-TAC-TCA-CTC-GTT-GCT-TCT-ATG	
lectin_leftprimer	GGT-CCA-CTC-CAG-TCC-CTT-TC	AT5G03350
lectin_rightprimer	GAA-AGT-GAA-AGA-AGT-TTC-AAA-TGG-AT	
LHCB1.4_leftprimer	TTA-CTT-GCG-CCA-CAC-TCT-CAC-C	AT2G34430
LHCB1.4_rightprimer	TTT-CCG-GTC-AAA-GCA-GGA-GAG-G	
LHCB2.2_leftprimer	TCA-AGT-CTA-CTC-CCC-AAA-GCA	AT2G05070
LHCB2.2_rightprimer	TCC-GAG-AAT-GGT-CCC-AAG-TA	
LHCB2.4_leftprimer	GCG-TCG-TAC-CGT-CAA-GTC-TAC	AT3G27690
LHCB2.4_rightprimer	GGA-AAA-TGG-TCC-TAG-GTA-TTT-GG	
LOX1#3_leftprimer	TTGGATGGACTCACTGTTGAAG	AtG55020
LOX1#3_rightprimer	TCCAAGTATGGCATCAGTG	
LTP_leftprimer	ACA-AGC-AAG-AAG-GTG-GCA-AT	AT5G48490
LTP_rightprimer	GCC-ACT-GAC-CTC-TCA-ACG-AC	
MYB51_leftprimer	GGC-CAA-TTA-TCT-TAG-ACC-TGA-CA	AT1G18570
MYB51_rightprimer	CCA-CGA-GCT-ATA-GCA-GAC-CAT-T	
MYB75_leftprimer	AAA-TGG-CAC-CAA-GTT-CCT-GT	AT1G56650
MYB75_rightprimer	TCA-GAG-CTA-AGT-TTT-CCT-CTC-TTG-AT	
MYBL2#1_leftprimer	GAAGACGATCTCATCTCAAGC	AT1G71030
MYBL2#1_rightprimer	AACTTCGTTGTGCGTTTCGTC	
NDR1#1_leftprimer	TGCCTAAGTCTATCAAGGACACA	AT3G20600

_ Extraction des ARNs et hybridation des puces CATMA

Un protocole basé sur trois réplicats biologiques indépendants a été suivi dans l'analyse du transcriptome des lignées mutantes et transgéniques d'*Arabidopsis*. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 30mg d'échantillons végétaux à l'aide du kit NucleospinRNAII (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Le marquage des ARN complémentaires a été effectuée avec le dCTP-Cy3 ou le dCTP-Cy5. L'hybridation des lames et l'acquisition du signal ont été réalisées comme décrit par Lurin (2004).

_ Analyse statistique des données microarray

Les expériences ont été conçues avec l'aide du groupe statistique de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, Evry, France). Les méthodes sont disponibles dans le pack R *Anapuce* (<http://cran.r-project.org/web/packages/anapuce/index.html>). La normalisation par loess est basée sur l'utilisation de deux fluorochromes différents par comparaison. Pour déterminer les gènes différentiellement exprimés, un test *t* de Student est effectué sur les ratios exprimés en logarithme en base 2, en supposant une même variance des ratios logarithmiques pour tous les gènes. Les tâches affichant des variances extrêmes (trop petite ou trop grande) sont exclues. Les valeurs P brutes sont ajustées selon la méthode de Bonferroni. Il s'agit d'une "correction" de probabilité de risque d'erreur qui tient compte du nombre de tests *t* effectués. En effet, lorsqu'on fait plusieurs comparaisons impliquant les mêmes moyennes, la probabilité qu'une comparaison indique un test *t* statistiquement significatif croît avec le nombre de comparaisons. Cette correction fixée à 5 % permet un fort contrôle des faux positifs dans un contexte multi-comparatif. Lorsque la valeur P de Bonferroni est en dessous du seuil de 0.05, le gène correspondant est considéré comme différentiellement exprimé. Seuls les gènes présentant des modulations de leur expression dans une même direction pour les deux réplicats biologiques sont considérés comme statistiquement significatifs. Le détail de la méthode de normalisation et d'analyse différentielle des données est présenté sur le lien suivant: <http://www-urgv.versailles.inra.fr/microarray/files/Normalization-and-statistical-analysis-method-for-CATMAv6-array.pdf>.

V_ Méthode d'analyse biochimique

1. Extraction et dosage de phytohormones (SA, JA, JA-ILE, cis-OPDA et ABA)

250 mg de feuilles sont réduites en poudre dans de l'azote liquide puis les phytohormones sont extraites avec 1.5 mL de méthanol contenant 60ng de 9,10-d₂-9,10-acide jasmonique, 60 ng de D₄-acide salicylique, 60 ng de D₆-ABA (Santa Cruz Biotechnology), and 15 ng de JA-[¹³C₆]Ile comme standards internes. JA-[¹³C₆]Ile est obtenu comme décrit par Kramell et al. (1988) à partir de [¹³C₆]Ile (Sigma). L'extrait est mis sous agitation pendant 30min puis centrifugé à 14000 rpm pendant 20min à 4°C. Le surnageant est collecté et le culot est à nouveau extrait avec 500µl de méthanol. Les surnageants sont réunis, évaporés au SpeedVac à 30°C et redissouts dans 500µl de méthanol. Le fractionnement des extraits par chromatographie liquide est réalisée avec un système HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) muni d'une colonne C18 Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 × 4.6 mm, 1.8 µm; Agilent) maintenue à 25°C. Les phases mobiles utilisées sont constituées de A: acide formique (0.05%) dans de l'eau ultrapure et de B: acétonitrile. Le protocole d'élution est réalisé à un débit de

NDR1#1_rightprimer	TCTGGTTGTTTAGCGGCTTT	
NIMIN1#1_leftprimer	CACGGAAACGTAGACGAGAAG	AT1G02450
NIMIN1#1_rightprimer	GACCTTCTCCGCCGTTAG	
NPR1#9_leftprimer	AGGGGATATACGGTGCTTCA	AT5G01900
NPR1#9_rightprimer	ATGCACTTGACCTTTTTCC	
NPR3#2_leftprimer	GGTGGCTCTAATGAAACAGTTG	AT5G45110
NPR3#2_rightprimer	GTCGAGGATGTCGTCGTCTAT	
NPR4#2_leftprimer	GAGGATCTCCAAATGAGGTTGT	At5g45110
NPR4#2_rightprimer	AGCAACGTCCATAGCCACA	
OPR3#1_leftprimer	AAGATTCGATCTCTCATCGAGT	AT2G06050
OPR3#1_rightprimer	GGAGTGGTCCGTTGAGCA	
OPR3#3_leftprimer	CATCTCCGAAGGCACCAT	AT2G06050
OPR3#3_rightprimer	CAAAAGATGAAACCTCCCTTAGC	
OXI1#1_leftprimer	GGACGGTCACGATTTTGC	AT1G64280
OXI1#1_rightprimer	GCGTCGCTCCATACAACAT	
PAD4#1_leftprimer	TGCCATACTCAAACCTTTCTTCA	AT3G52430
PAD4#1_rightprimer	CCAAAGTGCGGTGAAAGC	
PBS3_leftprimer	GAG-AAA-AGA-TAC-GAG-ACT-CTG-TTG-C	at5g13320
PBS3_rightprimer	TGC-TTC-TCA-AAA-GTT-TCG-TTG-AT	
PEN2_leftprimer	GGA-CTT-CAT-GCT-TGG-TTG-G	AT2G44490
PEN2_rightprimer	TGA-TTT-CTT-CAT-CGT-TTC-TGG-A	
PEN3_leftprimer	ATG-TTT-GCT-CCC-AGA-TGG-AT	AT1G59870
PEN3_rightprimer	GTT-CCA-AGC-TTT-ATT-GTG-CTG-TT	
PMR4#1_leftprimer	AGCAGAGGACTTCGCATCAT	AT4G03550
PMR4#1_rightprimer	ACCAATAGGATTTGAACTACCATTAC	
PR1#2_leftprimer	GATGTGCCAAAGTGAGGTGTAA	AT2G14610
PR1#2_rightprimer	TTCACATAATCCCACGAGGA	
PR2_leftprimer	GCT-TAG-CCT-CAC-CAC-CAA-TG	AT3G57260
PR2_rightprimer	CCC-GTA-GCA-TAC-TCC-GAT-TT	
PR4#1_leftprimer	CGTGAGTGCTTATTGCTCCA	AT3G04720
PR4#1_rightprimer	ATACTTGCTCCGCCATGC	
PRR2_leftprimer	GAGCGATTCCACCTTTGTT	AT4G18020
PRR2_rightprimer	CAACCCCATGCATTACCG	
PSBP-2_leftprimer	GGT-GAA-GCC-GCT-AAT-GTG-TT	AT2G30790
PSBP-2_rightprimer	CCA-CTT-TGA-TGG-GAT-CTG-GA	
SAG101#1_leftprimer	CCATGGAGTCTTCTTCTCACTAAA	AT5G14930
SAG101#1_rightprimer	CTCCAAGATCTTACTCCATGAGC	
SOC1_leftprimer	AAC-AAC-TCG-AAG-CTT-CTA-AAC-GTA-A	AT2G45660
SOC1_rightprimer	CCT-CGA-TTG-AGC-ATG-TTC-CT	
SUC2_leftprimer	TAG-CCA-TTG-TCG-TCC-CTC-A	AT1G22710
SUC2_rightprimer	CCA-CCA-CCG-AAT-AGT-TCG-TC	
SUC5_leftprimer	TGG-TTT-CGT-GTC-ACT-TGG-TG	AT1G71890
SUC5_rightprimer	ACA-CAT-CCC-CAA-AGT-CGT-TT	
TGA1_leftprimer	CAGAACTAGACAACAACGTGTCA	AT5G65210
TGA1_rightprimer	CTTCTTGATCGAACATGTGAGG	
TGA2#7_leftprimer	TGGGAAAGTTAGGTACACTCGAA	AT5G06950
TGA2#7_rightprimer	TCTGTTGCAATGTTTGAGTCTCA	
TGA3#1_leftprimer	CTAGGCAGCAGGGATTATGC	AT1G22070
TGA3#1_rightprimer	TTCCATCTCAAATGCAGCAA	
TGA3#5_leftprimer	GAATCACGGGGCTCCAAT	AT1G22070

1.1ml/min selon le gradient suivant: 0 à 0.5 min, 5% B; 0.5 à 9.5 min, 5% à 42% B; 9.5 à 9.51 min, 42% à 100% B; 9.51 à 12 min, 100% B; et 12.1 à 15 min, 5% B. Un spectromètre de masse en tandem API 3200 (Applied Biosystems) équipé avec une source d'ionisation Turbospray permet l'obtention des spectres de masse en mode electrospray négatif. Le système est piloté par la logiciel Analyst 1.5 software (Applied Biosystems) qui permet l'acquisition des données. La capacité d'ionization est vérifiée en utilisant un mélange de standards. Les phytohormones sont quantifiées par rapport au signal correspondant à leur standard interne.

2. Extraction et dosage des glucosinolates

Les rosettes entières des plantes d'*Arabidopsis* sont utilisées pour l'analyse des glucosinolates à cause de la variabilité existante entre les feuilles prises de manières indépendantes (Brown, 2003). Les glucosinolates sont extraits à partir de 25 mg de poudre végétale obtenue par broyage de rosettes dans l'azote liquide, avec 1mL d'une solution de méthanol à 80% contenant 0.05 mm de 4-hydroxybenzylglucosinolate comme standard interne. Après centrifugation, les extraits sont passés sur une colonne DEAE-Sephadex A25 et traités avec de l'arylsulfatase (Sigma-Aldrich). Les glucosinolates élués sont séparés en utilisant un système HPLC (Agilent 1100 HPLC system; Agilent Technologies) par une colonne C18 en phase inverse (Chromolith Performance RP18e, 100 × 4.6 mm; Merck) avec un gradient eau-acetonitrile (0%–3% acetonitrile de 0 à 3 min, 3%–20.5% acetonitrile de 3 à 10 min, 20.5%–50% acetonitrile de 10 à 13 min, suivi par un cycle de lavage; débit, 1.5 mL min⁻¹). La détection est réalisée avec un détecteur à photodiodes et les pics sont intégrés à 229nm.

3. Révélation de l'activité de la β -glucuronidase (GUS) *in planta*

L'activité GUS présente dans les lignées transgéniques exprimant le gène *uidA* sous le contrôle du promoteur de gène *PRR2*, est révélée après ajout d'un substrat, le X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronique), qui en présence de β -glucuronidase produit un composé bleu insoluble. Les plantes à différents stades de développement sont immergées dans un tampon phosphate à 50mM p H 7.2 additionné de 2mM de ferrocyanide de potassium, de 2mM de ferricyanide de potassium, de 0.2% de triton X100 et de 2mM de X-Gluc. Après infiltration sous vide pendant 10 min les échantillons sont placés à 37°C pendant 20h. Les échantillons sont ensuite fixés par infiltration sous vide d'un mélange éthanol/acide acétique/ formalin/eau (50/5/10/35 ml) et maintenus dans ce mélange pendant 20 h à 4°C avant d'être décolorés et conservés dans de l'éthanol à 50%. Les observations ont été réalisées au microscope optique ou sous loupe binoculaire.

4. Détection et quantification des papilles de callose

Afin de quantifier le dépôt de callose dans les cotylédons, des plantules infectées par la bactérie *P. syringae* DC3000 ou *HrcC*- ou traitées par la *flg22* sont récoltées 12h après inoculation. Les plantules sont décolorées et fixées par une solution de lactophénol et d'éthanol à 95% (1v :2v) sur la nuit. Les plantules sont rincées une première fois par une solution d'éthanol à 50% puis par une solution d'eau stérile. Une fois rincées les feuilles sont placées dans une solution de coloration au bleu d'aniline composé de 0.01% d'aniline dans un tampon phosphate à pH de 9,5 pendant 2h. Les dépôts de callose sont visualisés en microscopie à fluorescence sous filtre DAPI. L'acquisition des images se fait sur trois champs des zones différentes de la feuille infiltrée. La quantification du nombre et de la

TGA3#5_rightprimer	CAGGGTCTGTTGTCTCAGATGAT	
TGA4_leftprimer	TCCACATCTAGACATCCTGATAAGA	AT5G10030
TGA4_rightprimer	GGCTAGTCTCTAGCTGCTGAACA	
TGA5_leftprimer	GGGGAAGTTAGGTACCCTTGA	AT5G06960
TGA5_rightprimer	CCATCTGTTGATATGTTTGTAGCC	
TGA6_leftprimer	ATTGAGGAAGAAGGCGTATGTT	AT3G12250
TGA6_rightprimer	CCTGAACCTTGAGATGAAAACCTC	
TT8#1_leftprimer	TGAATCAACCCATACGTTAGACA	AT4G09820
TT8#1_rightprimer	GGGGTGTGACATGAGAAGTGT	
UBI10_leftprimer	CACACTCCAATTGGTCTTGCCT	AT4G05320
UBI10_rightprimer	TGGTCTTTCCGGTGAGAGTCTTCA	
UBP6#11_leftprimer	AATGCACATGCAGCAGGA	At1g51710
UBP6#11_rightprimer	CTTTCACAGCATCAGCACCT	
UGT78D3_leftprimer	AAA-ACG-TCG-GTG-TCA-AAG-AAG	AT5G17030
UGT78D3_rightprimer	TCT-GAT-CTT-CTC-CAT-TCC-TGA-GA	
WCOR413family_leftprimer	CGG-CTA-ACC-TGA-TCA-ATT-CC	AT4G37220
WCOR413family_rightprimer	GCA-TCC-CTA-CGT-CTT-TCA-CG	
WRKY26_leftprimer	TCC-ACC-GCT-ATA-GCA-GCA-C	AT5G07100
WRKY26_rightprimer	CTT-GGC-TCC-TTC-ACA-TTC-TCT-T	
WRKY29#1_leftprimer	AAGGATCTCCATACCCAAGGA	AT4G23810
WRKY29#1_rightprimer	GGGTTTTGAGGATTTCTTTCCG	
WRKY53#6_leftprimer	CAGAGGAACACACACTGTTCG	AT3G56400
WRKY53#6_rightprimer	GGCTGGTTTGACTCTGGTGT	
WRKY54_leftprimer	AGT-TGC-AAC-GGT-GGA-GAT-TC	AT2G40750
WRKY54_rightprimer	CTT-CCA-CGA-TCC-TTG-TAT-GTG-A	
WRKY6#1_leftprimer	GCAACAGCAACAACAGAACAA	AT5G01900
WRKY6#1_rightprimer	TGCCTTGGTACTATCGTCTCC	
WRKY62#2_leftprimer	GGACTCTTCTCTGTGCTTGA	AT3G56400
WRKY62#2_rightprimer	GGGGTTGAAGATTCGTGTCTA	
WRKY70#5_leftprimer	ACCTTCGAACCCATCTCCTC	At4g19660
WRKY70#5_rightprimer	TATCGCCGGAATCTTCAAAC	
WRKY75_leftprimer	CGT-CAA-GAA-CAA-CAA-GTT-CCC-TA	AT5G13080
WRKY75_rightprimer	CTT-TGC-ACT-TGC-TTC-TTC-ACA-T	

surface des dépôts de callose est réalisée avec le logiciel Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Trois feuilles sont analysées par génotype et trois expériences indépendantes sont réalisées.

VI_Méthodes d'analyses statistiques

Pour les expériences décrites, l'effet du génotype et ou du traitement imposé sur le paramètre mesuré a été évalué au travers de procédures non paramétriques et paramétriques de comparaison (multiple ou deux à deux). L'ensemble des tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel Statgraphic Centurion XV.

VII_Méthodes d'analyses *in silico*

1. Clustering hiérarchique

Le clustering hiérarchique des données issues du Fluidigm a été réalisé en utilisant le logiciel HCE3.5 (<http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/>). Les ratios d'induction calculés pour les différents gènes analysés aux temps étudiés ont été utilisés pour réaliser ce clustering. Les données subissent une transformation logarithmique et l'expression de chaque gène dans l'échantillon Col To est utilisée comme référence pour le clustering.

2. Analyse de promoteurs

Pour la recherche d'éléments nucléotidiques dans la région promotrice de gènes, deux programmes différents ont été utilisés:

_ **MEME** teste chaque séquence d'une taille donnée en construisant une matrice "semence" et scanne les séquences afin de détecter les meilleurs sites (en fonction du poids). À chaque itération, un score de vraisemblance de la matrice par rapport à un modèle de référence (modèle de Markov) est calculé. Pour chaque position des séquences d'entrée, on calcule un score de vraisemblance d'appartenir soit au motif soit au modèle de fond. Une nouvelle matrice est alors construite en collectant les sites les plus vraisemblables. Les itérations continuent jusqu'à convergence vers un score localement maximal.

_ Le programme *oligo-analysis* de **RSAT** compte les occurrences de chaque oligonucléotide d'une taille donnée et de détecter ceux qui ont une fréquence exceptionnellement élevée afin de détecter les mots surreprésentés, il faut comparer les fréquences obtenues à des fréquences attendues dans le génome d'*Arabidopsis*.

Données supplémentaires

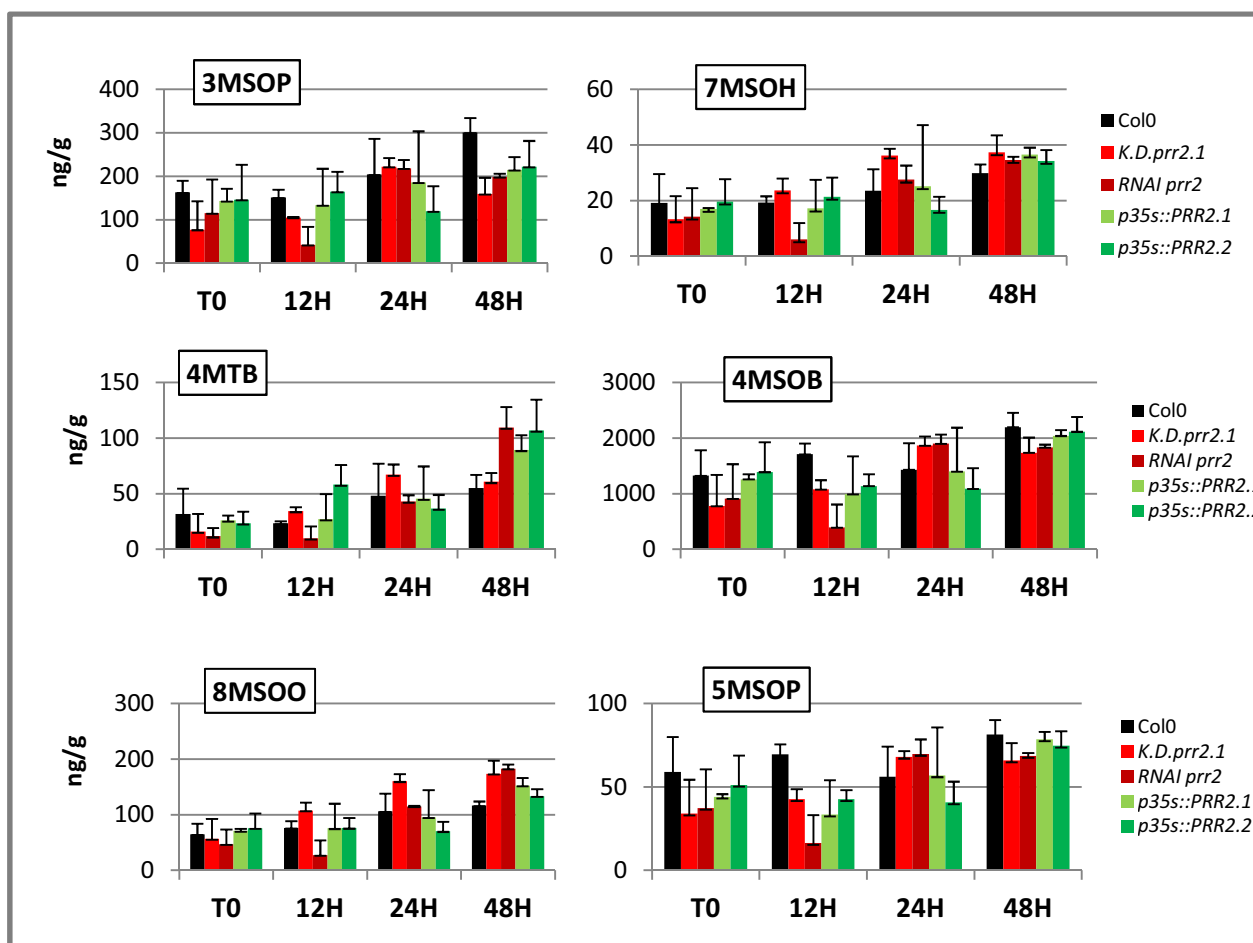


Figure S1: Quantification de la production de différentes formes de glucosinolates aliphatiques au sein des différents génotypes d'*Arabidopsis* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation de 3MSOP (a), 7MSOH (b), 4MTB (c), 4MSOB (d), 8MSOO (e), 5MSOP (f) a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent la SEM (erreur standard à la moyenne).

3MSOP: 3-méthylsulfinylpropyl glucosinolate, 7MSOH: 7-Méthylsulfinylheptyl glucosinolate, 4MTB: x, 4MSOB: 4-méthylsulfinylbutyl glucosinolate, 8MSOO: 8-Méthylsulfinyloctyl glucosinolate, 5MSOP: 5-méthylsulfinylbutyl glucosinolate.

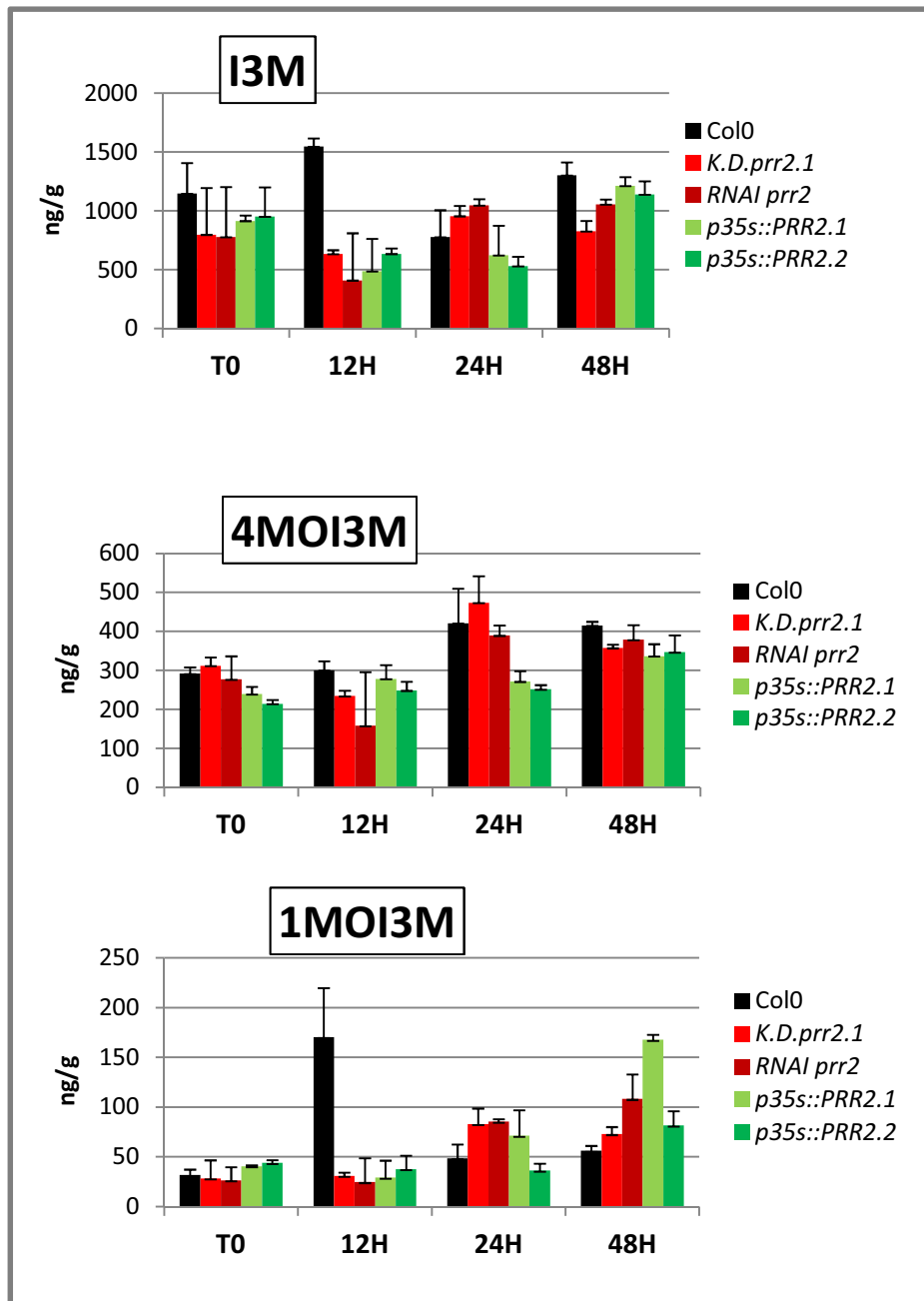


Figure S2 Quantification de la production de différentes formes de glucosinolates indoliques au sein des différents génotypes d'*Arabidopsis* lors d'une infection par *Pst* DC3000.

La quantification de l'accumulation de I3M (a), 4MOI3M (b), 3MOI3M (c), a été effectuée après infection par *Pst* DC3000 à 10^7 CFU/ml (12h, 24h, 48h) ou dans des conditions contrôles (*mock*, T0). Les concentrations ont été estimées à partir de 3 réplicats biologiques indépendants à partir de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines lors des tests. Les barres d'erreurs représentent la SEM (erreur standard à la moyenne).

I3M: Indol-3-ylmethyl glucosinolate, 4MOI3M :4-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate, 3MOI3M : 3-Methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate.

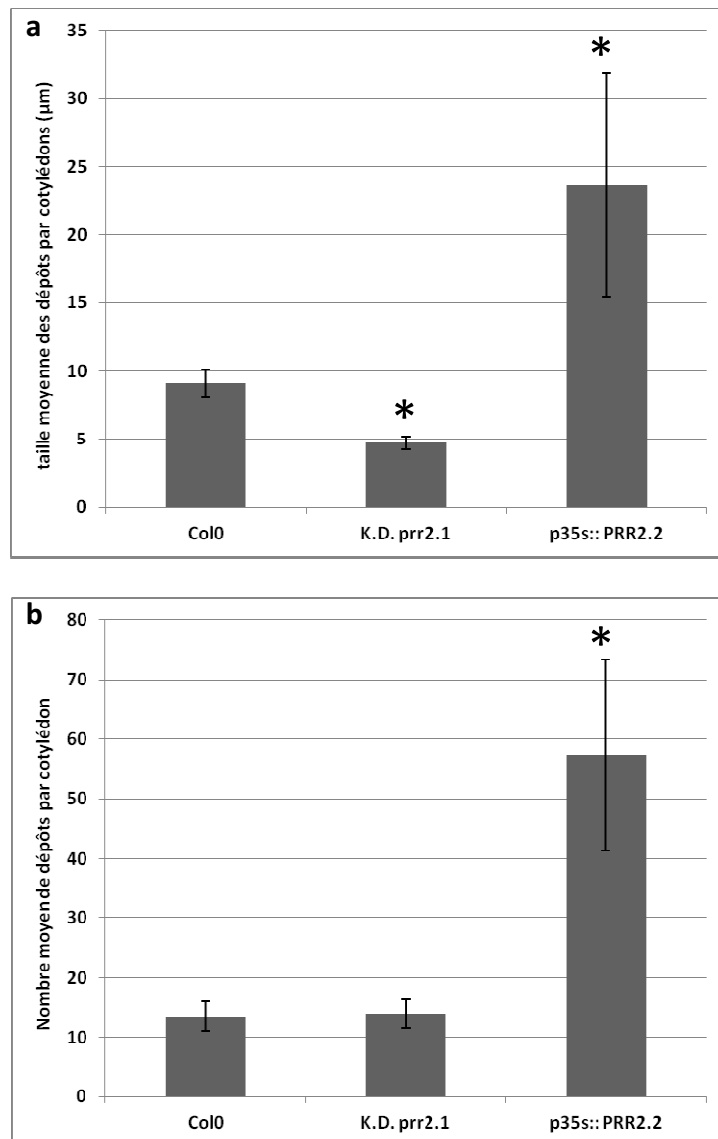


Figure S3: Formation de dépôts de callose en réponse à la flagelline (flg22) chez les différentes lignées PRR2.

Quantification de la taille des papilles (a) et du nombre de papilles de callose par cotylédon (b) en réponse à la flg22 (1µM) à l'aide du logiciel image J. Les valeurs sont représentatives de la moyenne de 3 réplicats biologiques indépendants (\pm SEM, $n > 10$ pour chaque réplicat indépendant). Les étoiles (*) représentent les différences significatives en comparaison au Wt (Col0). Les différences significatives ont été déterminées d'après une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Newman-Keuls. (*) indique une différence significative en comparaison au Wt pour une p-value < 0.05 .

Table S1: gènes dérégulés dans l'analyse Fluidigm chez les lignées PRR2

GENE	DESCRIPTION
TRHX5	régulateur de la signalisation SA
NPR3	perception du SA
EDS5	biosynthèse du SA
ACS2	biosynthèse de l'ET
NIMIN1	régulateur de la signalisation SA
PR1	marqueur voie SA
CYP81D11	marqueur voie JA
WRKY54	marqueur de stress/sénescence
WRKY75	marqueur de stress/sénescence
NPR1	régulateur de la signalisation SA
WRKY70	marqueur sénescence
MYBL2	marqueur de stress/anthocyanes
FLS3	marqueur de stress/anthocyanes
NDR1	régulateur de la signalisation SA
ICS2	biosynthèse du SA
CAMTA3	marqueur voie SA
AOC2	biosynthèse de l'ET
MYB75	marqueur de stress/sénescence
PR2	marqueur voie SA
UGT78D3	marqueur de stress/anthocyanes
LDOX	biosynthèse du JA
DFR	marqueur de stress/anthocyanes
CHS	marqueur de stress/anthocyanes
FRK1	marqueur de la voie flg22
ICS1	biosynthèse du SA
LOX1	biosynthèse du JA
TGA2	régulateur signalisation SA
PMR4/GSL5	biosynthèse de callose/glucosinolates
TGA3	régulateur signalisation SA
TGA4	régulateur signalisation SA
PEN2	biosynthèse de callose/glucosinolates
BIK1	marqueur de la voie flg22/elf18
CALS1/GSL6	biosynthèse de callose/glucosinolates
EFR	marqueur de la voie flg22/elf18
PEN3/PDR8	biosynthèse de callose/glucosinolates
JAR1	régulateur signalisation JA
OPR3	régulateur signalisation JA
WRKY29	marqueur de la voie flg22/elf18
SAG101	régulateur voie SA/ sénescence
COI1	récepteur JA
TGA6	régulateur signalisation SA
DEFL	marqueur de défense
4CL3	marqueur de stress/anthocyanes

Table S2: gènes dérégulés dans l'analyse CATMA en réponse à la flg22

CLUSTER1		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	15 of 56 genes, 26.79%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	11 of 56 genes, 19.64%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	7 of 56 genes, 12.50%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
anatomical structure development (GO:0048856)	6 of 56 genes, 10.71%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
transport (GO:0006810)	5 of 56 genes, 8.93%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	5 of 56 genes, 8.93%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
immune system process (GO:0002376)	4 of 56 genes, 7.14%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
growth (GO:0040007)	4 of 56 genes, 7.14%	964 of 30328 annotated genes, 3.18%
lipid metabolic process (GO:0006629)	4 of 56 genes, 7.14%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
cell morphogenesis (GO:0000902)	3 of 56 genes, 5.36%	714 of 30328 annotated genes, 2.35%
cell differentiation (GO:0030154)	3 of 56 genes, 5.36%	1176 of 30328 annotated genes, 3.88%
reproduction (GO:0000003)	2 of 56 genes, 3.57%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
protein targeting (GO:0006605)	2 of 56 genes, 3.57%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
signal transduction (GO:0007165)	2 of 56 genes, 3.57%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%
cell death (GO:0008219)	2 of 56 genes, 3.57%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
cellular protein modification process (GO:0006464)	2 of 56 genes, 3.57%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
secondary metabolic process (GO:0019748)	2 of 56 genes, 3.57%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	1 of 56 genes, 1.79%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
developmental maturation (GO:0021700)	1 of 56 genes, 1.79%	338 of 30328 annotated genes, 1.11%
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	1 of 56 genes, 1.79%	500 of 30328 annotated genes, 1.65%
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	1 of 56 genes, 1.79%	1558 of 30328 annotated genes, 5.14%
cofactor metabolic process (GO:0051186)	1 of 56 genes, 1.79%	546 of 30328 annotated genes, 1.80%
cell wall organization or biogenesis (GO:0071554)	1 of 56 genes, 1.79%	884 of 30328 annotated genes, 2.91%
aging (GO:0007568)	1 of 56 genes, 1.79%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
membrane organization (GO:0061024)	1 of 56 genes, 1.79%	493 of 30328 annotated genes, 1.63%
anatomical structure formation involved in morphogenesis (GO:0048646)	1 of 56 genes, 1.79%	489 of 30328 annotated genes, 1.61%
CLUSTER2		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	9 of 39 genes, 23.08%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	8 of 39 genes, 20.51%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	5 of 39 genes, 12.82%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	3 of 39 genes, 7.69%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
immune system process (GO:0002376)	2 of 39 genes, 5.13%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
anatomical structure development (GO:0048856)	2 of 39 genes, 5.13%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
lipid metabolic process (GO:0006629)	2 of 39 genes, 5.13%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
secondary metabolic process (GO:0019748)	2 of 39 genes, 5.13%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	1 of 39 genes, 2.56%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
reproduction (GO:0000003)	1 of 39 genes, 2.56%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	1 of 39 genes, 2.56%	1558 of 30328 annotated genes, 5.14%
cofactor metabolic process (GO:0051186)	1 of 39 genes, 2.56%	546 of 30328 annotated genes, 1.80%
transport (GO:0006810)	1 of 39 genes, 2.56%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%

table S2

protein targeting (GO:0006605)	1 of 39 genes, 2.56%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
cell morphogenesis (GO:0000902)	1 of 39 genes, 2.56%	714 of 30328 annotated genes, 2.35%
cell differentiation (GO:0030154)	1 of 39 genes, 2.56%	1176 of 30328 annotated genes, 3.88%
cell death (GO:0008219)	1 of 39 genes, 2.56%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
cellular protein modification process (GO:0006464)	1 of 39 genes, 2.56%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
growth (GO:0040007)	1 of 39 genes, 2.56%	964 of 30328 annotated genes, 3.18%
CLUSTER3		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	52 of 134 genes, 38.81%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	40 of 134 genes, 29.85%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
immune system process (GO:0002376)	34 of 134 genes, 25.37%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
signal transduction (GO:0007165)	33 of 134 genes, 24.63%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%
transport (GO:0006810)	26 of 134 genes, 19.40%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	22 of 134 genes, 16.42%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
cell death (GO:0008219)	18 of 134 genes, 13.43%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
protein targeting (GO:0006605)	17 of 134 genes, 12.69%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	16 of 134 genes, 11.94%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
cellular protein modification process (GO:0006464)	11 of 134 genes, 8.21%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
anatomical structure development (GO:0048856)	8 of 134 genes, 5.97%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
membrane organization (GO:0061024)	6 of 134 genes, 4.48%	493 of 30328 annotated genes, 1.63%
reproduction (GO:0000003)	5 of 134 genes, 3.73%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
catabolic process (GO:0009056)	5 of 134 genes, 3.73%	1891 of 30328 annotated genes, 6.24%
secondary metabolic process (GO:0019748)	5 of 134 genes, 3.73%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
lipid metabolic process (GO:0006629)	4 of 134 genes, 2.99%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	3 of 134 genes, 2.24%	500 of 30328 annotated genes, 1.65%
homeostatic process (GO:0042592)	3 of 134 genes, 2.24%	375 of 30328 annotated genes, 1.24%
aging (GO:0007568)	3 of 134 genes, 2.24%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
nucleobase-containing compound catabolic process (GO:0034655)	2 of 134 genes, 1.49%	187 of 30328 annotated genes, 0.62%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	1 of 134 genes, 0.75%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
cell morphogenesis (GO:0000902)	1 of 134 genes, 0.75%	714 of 30328 annotated genes, 2.35%
cell wall organization or biogenesis (GO:0071554)	1 of 134 genes, 0.75%	884 of 30328 annotated genes, 2.91%
mRNA processing (GO:0006397)	1 of 134 genes, 0.75%	153 of 30328 annotated genes, 0.50%
cell differentiation (GO:0030154)	1 of 134 genes, 0.75%	1176 of 30328 annotated genes, 3.88%
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	1 of 134 genes, 0.75%	756 of 30328 annotated genes, 2.49%
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	1 of 134 genes, 0.75%	615 of 30328 annotated genes, 2.03%
embryo development (GO:0009790)	1 of 134 genes, 0.75%	747 of 30328 annotated genes, 2.46%
growth (GO:0040007)	1 of 134 genes, 0.75%	964 of 30328 annotated genes, 3.18%
photosynthesis (GO:0015979)	1 of 134 genes, 0.75%	419 of 30328 annotated genes, 1.38%
CLUSTER4		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	7 of 21 genes, 33.33%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
immune system process (GO:0002376)	6 of 21 genes, 28.57%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
biosynthetic process (GO:0009058)	5 of 21 genes, 23.81%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	4 of 21 genes, 19.05%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%

table S2

signal transduction (GO:0007165)	2 of 21 genes, 9.52%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%
cell death (GO:0008219)	2 of 21 genes, 9.52%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	2 of 21 genes, 9.52%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
catabolic process (GO:0009056)	2 of 21 genes, 9.52%	1891 of 30328 annotated genes, 6.24%
secondary metabolic process (GO:0019748)	2 of 21 genes, 9.52%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
transport (GO:0006810)	1 of 21 genes, 4.76%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
aging (GO:0007568)	1 of 21 genes, 4.76%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
anatomical structure development (GO:0048856)	1 of 21 genes, 4.76%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
CLUSTER5		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	61 of 113 genes, 53.98%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	38 of 113 genes, 33.63%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
immune system process (GO:0002376)	38 of 113 genes, 33.63%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
signal transduction (GO:0007165)	38 of 113 genes, 33.63%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	22 of 113 genes, 19.47%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
transport (GO:0006810)	20 of 113 genes, 17.70%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	19 of 113 genes, 16.81%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
cell death (GO:0008219)	16 of 113 genes, 14.16%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
protein targeting (GO:0006605)	13 of 113 genes, 11.50%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
cellular protein modification process (GO:0006464)	11 of 113 genes, 9.73%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
anatomical structure development (GO:0048856)	11 of 113 genes, 9.73%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
reproduction (GO:0000003)	8 of 113 genes, 7.08%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
catabolic process (GO:0009056)	6 of 113 genes, 5.31%	1891 of 30328 annotated genes, 6.24%
membrane organization (GO:0061024)	5 of 113 genes, 4.42%	493 of 30328 annotated genes, 1.63%
secondary metabolic process (GO:0019748)	5 of 113 genes, 4.42%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	4 of 113 genes, 3.54%	615 of 30328 annotated genes, 2.03%
lipid metabolic process (GO:0006629)	4 of 113 genes, 3.54%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
cell wall organization or biogenesis (GO:0071554)	3 of 113 genes, 2.65%	884 of 30328 annotated genes, 2.91%
homeostatic process (GO:0042592)	3 of 113 genes, 2.65%	375 of 30328 annotated genes, 1.24%
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	3 of 113 genes, 2.65%	756 of 30328 annotated genes, 2.49%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	2 of 113 genes, 1.77%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	2 of 113 genes, 1.77%	500 of 30328 annotated genes, 1.65%
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	2 of 113 genes, 1.77%	1558 of 30328 annotated genes, 5.14%
embryo development (GO:0009790)	2 of 113 genes, 1.77%	747 of 30328 annotated genes, 2.46%
photosynthesis (GO:0015979)	2 of 113 genes, 1.77%	419 of 30328 annotated genes, 1.38%
cofactor metabolic process (GO:0051186)	1 of 113 genes, 0.88%	546 of 30328 annotated genes, 1.80%
aging (GO:0007568)	1 of 113 genes, 0.88%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
nucleocytoplasmic transport (GO:0006913)	1 of 113 genes, 0.88%	200 of 30328 annotated genes, 0.66%
CLUSTER6		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	54 of 106 genes, 50.94%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	39 of 106 genes, 36.79%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
immune system process (GO:0002376)	38 of 106 genes, 35.85%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
transport (GO:0006810)	35 of 106 genes, 33.02%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
signal transduction (GO:0007165)	28 of 106 genes, 26.42%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%

table S2

small molecule metabolic process (GO:0044281)	22 of 106 genes, 20.75%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
cell death (GO:0008219)	20 of 106 genes, 18.87%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
protein targeting (GO:0006605)	18 of 106 genes, 16.98%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	17 of 106 genes, 16.04%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
secondary metabolic process (GO:0019748)	11 of 106 genes, 10.38%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
cellular protein modification process (GO:0006464)	9 of 106 genes, 8.49%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
catabolic process (GO:0009056)	9 of 106 genes, 8.49%	1891 of 30328 annotated genes, 6.24%
membrane organization (GO:0061024)	7 of 106 genes, 6.60%	493 of 30328 annotated genes, 1.63%
anatomical structure development (GO:0048856)	6 of 106 genes, 5.66%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
reproduction (GO:0000003)	4 of 106 genes, 3.77%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	4 of 106 genes, 3.77%	756 of 30328 annotated genes, 2.49%
lipid metabolic process (GO:0006629)	4 of 106 genes, 3.77%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	4 of 106 genes, 3.77%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
cell wall organization or biogenesis (GO:0071554)	3 of 106 genes, 2.83%	884 of 30328 annotated genes, 2.91%
homeostatic process (GO:0042592)	3 of 106 genes, 2.83%	375 of 30328 annotated genes, 1.24%
transmembrane transport (GO:0055085)	3 of 106 genes, 2.83%	301 of 30328 annotated genes, 0.99%
embryo development (GO:0009790)	2 of 106 genes, 1.89%	747 of 30328 annotated genes, 2.46%
aging (GO:0007568)	2 of 106 genes, 1.89%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
developmental maturation (GO:0021700)	1 of 106 genes, 0.94%	338 of 30328 annotated genes, 1.11%
protein folding (GO:0006457)	1 of 106 genes, 0.94%	290 of 30328 annotated genes, 0.96%
cell differentiation (GO:0030154)	1 of 106 genes, 0.94%	1176 of 30328 annotated genes, 3.88%
cellular component assembly (GO:0022607)	1 of 106 genes, 0.94%	773 of 30328 annotated genes, 2.55%
macromolecular complex assembly (GO:0065003)	1 of 106 genes, 0.94%	624 of 30328 annotated genes, 2.06%
protein complex assembly (GO:0006461)	1 of 106 genes, 0.94%	593 of 30328 annotated genes, 1.96%
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	1 of 106 genes, 0.94%	500 of 30328 annotated genes, 1.65%
cofactor metabolic process (GO:0051186)	1 of 106 genes, 0.94%	546 of 30328 annotated genes, 1.80%
pigmentation (GO:0043473)	1 of 106 genes, 0.94%	113 of 30328 annotated genes, 0.37%
CLUSTER7		
BOLOGICAL PROCESS		
GO Term (GO ID)	GO Term Usage in Gene List	Genome Frequency of Use
response to stress (GO:0006950)	110 of 194 genes, 56.70%	4018 of 30328 annotated genes, 13.25%
biosynthetic process (GO:0009058)	70 of 194 genes, 36.08%	6908 of 30328 annotated genes, 22.78%
signal transduction (GO:0007165)	70 of 194 genes, 36.08%	1614 of 30328 annotated genes, 5.32%
immune system process (GO:0002376)	63 of 194 genes, 32.47%	1030 of 30328 annotated genes, 3.40%
transport (GO:0006810)	58 of 194 genes, 29.90%	3012 of 30328 annotated genes, 9.93%
small molecule metabolic process (GO:0044281)	43 of 194 genes, 22.16%	2843 of 30328 annotated genes, 9.37%
cell death (GO:0008219)	38 of 194 genes, 19.59%	507 of 30328 annotated genes, 1.67%
protein targeting (GO:0006605)	36 of 194 genes, 18.56%	892 of 30328 annotated genes, 2.94%
cellular nitrogen compound metabolic process (GO:0034641)	22 of 194 genes, 11.34%	4520 of 30328 annotated genes, 14.90%
cellular protein modification process (GO:0006464)	17 of 194 genes, 8.76%	1641 of 30328 annotated genes, 5.41%
secondary metabolic process (GO:0019748)	16 of 194 genes, 8.25%	841 of 30328 annotated genes, 2.77%
catabolic process (GO:0009056)	15 of 194 genes, 7.73%	1891 of 30328 annotated genes, 6.24%
membrane organization (GO:0061024)	14 of 194 genes, 7.22%	493 of 30328 annotated genes, 1.63%
anatomical structure development (GO:0048856)	7 of 194 genes, 3.61%	3651 of 30328 annotated genes, 12.04%
cell wall organization or biogenesis (GO:0071554)	6 of 194 genes, 3.09%	884 of 30328 annotated genes, 2.91%
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	6 of 194 genes, 3.09%	500 of 30328 annotated genes, 1.65%
growth (GO:0040007)	6 of 194 genes, 3.09%	964 of 30328 annotated genes, 3.18%

table S2

lipid metabolic process (GO:0006629)	5 of 194 genes, 2.58%	1423 of 30328 annotated genes, 4.69%
sulfur compound metabolic process (GO:0006790)	5 of 194 genes, 2.58%	558 of 30328 annotated genes, 1.84%
reproduction (GO:0000003)	4 of 194 genes, 2.06%	2522 of 30328 annotated genes, 8.32%
homeostatic process (GO:0042592)	4 of 194 genes, 2.06%	375 of 30328 annotated genes, 1.24%
cellular amino acid metabolic process (GO:0006520)	4 of 194 genes, 2.06%	756 of 30328 annotated genes, 2.49%
photosynthesis (GO:0015979)	4 of 194 genes, 2.06%	419 of 30328 annotated genes, 1.38%
carbohydrate metabolic process (GO:0005975)	4 of 194 genes, 2.06%	1558 of 30328 annotated genes, 5.14%
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	3 of 194 genes, 1.55%	615 of 30328 annotated genes, 2.03%
cell cycle (GO:0007049)	3 of 194 genes, 1.55%	813 of 30328 annotated genes, 2.68%
cell differentiation (GO:0030154)	2 of 194 genes, 1.03%	1176 of 30328 annotated genes, 3.88%
cellular component assembly (GO:0022607)	2 of 194 genes, 1.03%	773 of 30328 annotated genes, 2.55%
symbiosis, encompassing mutualism through parasitism (GO:0044403)	2 of 194 genes, 1.03%	129 of 30328 annotated genes, 0.43%
cofactor metabolic process (GO:0051186)	2 of 194 genes, 1.03%	546 of 30328 annotated genes, 1.80%
aging (GO:0007568)	2 of 194 genes, 1.03%	157 of 30328 annotated genes, 0.52%
developmental maturation (GO:0021700)	1 of 194 genes, 0.52%	338 of 30328 annotated genes, 1.11%
protein folding (GO:0006457)	1 of 194 genes, 0.52%	290 of 30328 annotated genes, 0.96%
macromolecular complex assembly (GO:0065003)	1 of 194 genes, 0.52%	624 of 30328 annotated genes, 2.06%
nucleobase-containing compound catabolic process (GO:0034655)	1 of 194 genes, 0.52%	187 of 30328 annotated genes, 0.62%
cytoskeleton organization (GO:0007010)	1 of 194 genes, 0.52%	492 of 30328 annotated genes, 1.62%
translation (GO:0006412)	1 of 194 genes, 0.52%	1238 of 30328 annotated genes, 4.08%
protein complex assembly (GO:0006461)	1 of 194 genes, 0.52%	593 of 30328 annotated genes, 1.96%
cell morphogenesis (GO:0000902)	1 of 194 genes, 0.52%	714 of 30328 annotated genes, 2.35%
mRNA processing (GO:0006397)	1 of 194 genes, 0.52%	153 of 30328 annotated genes, 0.50%
cell division (GO:0051301)	1 of 194 genes, 0.52%	358 of 30328 annotated genes, 1.18%

PARTIE V: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2851–2856.
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* *17*, 73–90.
- 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.
- Allan, A.C., and Fluhr, R. (1997). Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell* *9*, 1559–1572.
- Allen, C., Gay, J., and Simon-Buela, L. (1997). A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *MPMI* *10*, 1054–1064.
- Alvarez, M.E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* *44*, 429–442.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *16*, 3460–3479.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H.T., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., et al. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* *24*, 2579–2589.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailliau, 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.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* *415*, 977–983.
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* *69*, 473–488.
- Baron, C., and Coombes, B. (2007). Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infect. Disord. Drug Targets* *7*, 19–27.
- Batistic, O., and Kudla, J. (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 985–992.

- Bechinger, Giebel, Schnell, Leiderer, Deising, and Bastmeyer (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285, 1896–1899.
- Bednarek, P. (2012a). Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 407–414.
- Bednarek, P. (2012b). Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 407–414.
- Bednarek, P. (2012c). Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 407–414.
- Bekaert, M., Edger, P.P., Hudson, C.M., Pires, J.C., and Conant, G.C. (2012). Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense: systems biology of glucosinolate synthesis. *New Phytol.* 196, 596–605.
- Bernoux, M., Ellis, J.G., and Dodds, P.N. (2011). New insights in plant immunity signaling activation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 512–518.
- Berrin, J.-G., Pierrugues, O., Brutusco, C., Alonso, B., Montillet, J.-L., Roby, D., and Kazmaier, M. (2005). Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 273, 10–19.
- Besseau, S., Li, J., and Palva, E.T. (2012). WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 63, 2667–2679.
- Bethke, G., Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Tsuda, K., Katagiri, F., Glazebrook, J., Scheel, D., and Lee, J. (2012). Activation of the *Arabidopsis thaliana* Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide, flg22. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 471–480.
- Bhattarai, K.K., Atamian, H.S., Kaloshian, I., and Eulgem, T. (2010). WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *Plant J.* 63, 229–240.
- 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.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., et al. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 47, 851–863.
- Birkenbihl, R.P., Diezel, C., and Somssich, I.E. (2012). *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol.* 159, 266–285.
- Block, A., and Alfano, J.R. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 39–46.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 396–403.

- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509–1512.
- Boonburapong, B., and Buaboocha, T. (2007). Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol.* 7, 4.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature* 464, 418–422.
- Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M., and Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 3710–3715.
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., and Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62, 471–481.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9452–9457.
- Cao, T., Kirkpatrick, B.C., Shackel, K.A., and DeJong, T.M. (2011). Influence of mineral nutrients and freezing-thawing on peach susceptibility to bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Fruits* 66, 441–452.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C.K., and Wildermuth, M.C. (2010). Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 460–465.
- Chen, X.-Y., and Kim, J.-Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 489–492.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., and Kunkel, B.N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20131–20136.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 493–496.
- Cheng, S.-H., Willmann, M.R., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 129, 469–485.
- 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.
- 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.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., and Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 19, 284–295.

- 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.
- Coca, M., and San Segundo, B. (2010). AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant J* 63, 526–540.
- Cui, H., Wang, Y., Xue, L., Chu, J., Yan, C., Fu, J., Chen, M., Innes, R.W., and Zhou, J.-M. (2010). *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs Arabidopsis hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell Host Microbe* 7, 164–175.
- Da Cunha, L., Sreerekha, M.-V., and Mackey, D. (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 349–357.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 53–60.
- 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.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* 8, 1793–1807.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P. (2012). The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity[W][OA]. *Plant Cell* 24, 275–287.
- 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. U. S. A.* 101, 9927–9932.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol. Plant* 1, 423–445.
- Deslandes, L., and Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* 17, 644–655.
- 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. *MPMI* 11, 659–667.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8024–8029.

- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S., and Raghothama, K.G. (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *143*, 1789–1801.
- Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., and Verma, D.P.S. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta* *229*, 87–98.
- Du, L., and Poovaiah, B.W. (2005). Ca²⁺/calmodulin is critical for brassinosteroid biosynthesis and plant growth. *Nature* *437*, 741–745.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *42*, 185–209.
- Felix, G., and Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* *278*, 6201–6208.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* *18*, 265–276.
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C., and Zhou, J.-M. (2012). A Xanthomonas uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* *485*, 114–118.
- Feys, B.J., and Parker, J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *TIG* *16*, 449–455.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* *9*, 275–296.
- Fogliano, V., Ballio, A., Gallo, M., Woo, S., Scala, F., and Lorito, M. (2002). Pseudomonas lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *MPMI* *15*, 323–333.
- Forsyth, A., Mansfield, J.W., Grabov, N., de Torres, M., Sinapidou, E., and Grant, M.R. (2010). Genetic dissection of basal resistance to Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in accessions of Arabidopsis. *MPMI* *23*, 1545–1552.
- Frenkel, M., Külheim, C., Jänkänpää, H.J., Skogström, O., Dall'Osto, L., Ågren, J., Bassi, R., Moritz, T., Moen, J., and Jansson, S. (2009). Improper excess light energy dissipation in Arabidopsis results in a metabolic reprogramming. *BMC Plant Biol.* *9*, 12.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., and Alfano, J.R. (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* *447*, 284–288.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., et al. (2012a). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* *486*, 228–232.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., et al. (2012b). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* *486*, 228–232.

Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *63*, 133–154.

Gay P.A., and Tuzun S. (2000). Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *57*, 201–210.

Geng, X., Cheng, J., Gangadharan, A., and Mackey, D. (2012). The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *Plant Cell* *24*, 4763–4774.

Jimenez-Ibanez, S., Ntoukakis, V., and Rathjen, J.P. (2009). The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* *4*, 539–541.

Glawischnig, E. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in the biosynthesis of camalexin. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1206–1208.

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.

Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., and Dessaux, Y. (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *MPMI* *11*, 156–162.

Goel, A.K., Lundberg, D., Torres, M.A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J.L., and Grant, S.R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *MPMI* *21*, 361–370.

Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* *18*, 1824–1832.

Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* *5*, 1003–1011.

Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* *7*, 251–256.

González, E.T., and Allen, C. (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *MPMI* *16*, 536–544.

González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., and Bouarab, K. (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 3400–3419.

Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* *10*, 751–757.

Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., and Petersen, M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Front. Plant Proteomics* *3*, 209.

Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* *6*, 201–211.

- Guo, F.-Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* *302*, 100–103.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* *57*, 303–333.
- Hall, L.N., Rossini, L., Cribb, L., and Langdale, J.A. (1998). GOLDEN 2: a novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf. *Plant Cell* *10*, 925–936.
- Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 177–193.
- Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* *44*, 321–334.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12217–12222.
- Hepler, P.K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* *17*, 2142–2155.
- Hetherington, A.M., and Brownlee, C. (2004). The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *55*, 401–427.
- Hirai, M.Y., Sawada, Y., Kanaya, S., Kuromori, T., Kobayashi, M., Klausnitzer, R., Hanada, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Saito, K., et al. (2010). Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolic system: metabolic profiling of large-scale bioresources. *J. Plant Res.* *123*, 291–298.
- Hok, S., Danchin, E.G.J., Allasia, V., Panabières, F., Attard, A., and Keller, H. (2011). An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. *Plant Cell Environ.* *34*, 1944–1957.
- Hoorn, R.A.L. van der, and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* *20*, 2009–2017.
- Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., and Yamazaki, T. (2002). Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators. *Plant Cell* *14*, 2015–2029.
- Howden, A.J.M., Rico, A., Mentlak, T., Miguët, L., and Preston, G.M. (2009). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Mol. Plant Pathol.* *10*, 857–865.
- Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 41–66.
- Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10098–10103.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 213–257.

Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* *40*, 733–742.

Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *44*, 122–131.

Ishida, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2008). Expression of the cytokinin-induced type-A response regulator gene ARR9 is regulated by the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *72*, 3025–3029.

Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B. (2003). An *Arabidopsis* Callose Synthase, *GSL5*, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* *15*, 2503–2513.

Johnson, C., Boden, E., and Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *15*, 1846–1858.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323–329.

De Jonge, R., van Esse, H.P., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V., et al. (2012). Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5110–5115.

Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D., and Kroj, T. (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *18*, 3289–3302.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11086–11091.

Kanchiswamy, C.N., Takahashi, H., Quadro, S., Maffei, M.E., Bossi, S., Berteaux, C., Zebelo, S.A., Muroi, A., Ishihama, N., Yoshioka, H., et al. (2010). Regulation of *Arabidopsis* defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling. *BMC Plant Biol.* *10*, 97.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* *7*, 193–195.

Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* *1*, e0039.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. (2007). A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* *318*, 648–651.

Kerstetter, R., and Hake, S. (1997). Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. *Plant Cell* *9*, 1001–1010.

- Kesarwani, M., Yoo, J., and Dong, X. (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *144*, 336–346.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* *121*, 749–759.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T. (2005). The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 264–271.
- Klimecka, M., and Muszyńska, G. (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim. Pol.* *54*, 219–233.
- Knight, H., and Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* *6*, 262–267.
- Knight, H., Brandt, S., and Knight, M.R. (1998). A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. *Plant J* *16*, 681–687.
- Kobayashi, M., Kawakita, K., Maeshima, M., Doke, N., and Yoshioka, H. (2006). Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O₂(-)-generating activity in potato tuber tissues. *J. Exp. Bot.* *57*, 1373–1379.
- Köhler, C., and Neuhaus, G. (2000). Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* *471*, 133–136.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G.P., and Schell, J. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 8467–8471.
- Kotchoni, S.O., and Gachomo, E.W. (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J. Biosci.* *31*, 389–404.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A.S., et al. (2010). Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J. Biol. Chem.* *285*, 13471–13479.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell* *16*, 3496–3507.
- Kurusu, T., Hamada, J., Hamada, H., Hanamata, S., and Kuchitsu, K. (2010). Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signal. Behav.* *5*, 1045–1047.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* *28*, 365–369.

Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2004). Analysis of Nitric Oxide Signaling Functions in Tobacco Cells Challenged by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiol.* *135*, 516–529.

Leba, L.-J., Cheval, C., Ortiz-Martín, I., Ranty, B., Beuzón, C.R., Galaud, J.-P., and Aldon, D. (2012). CML9, an Arabidopsis calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway. *Plant J* *71*, 976–989.

Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* *14*, 2627–2641.

Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* *171*, 249–269.

Lee, S., Yang, D.S., Uppalapati, S.R., Sumner, L.W., and Mysore, K.S. (2013). Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol.* *13*, 65.

Lewis, J.D., Guttman, D.S., and Desveaux, D. (2009). The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 1055–1063.

Li, Z., Peng, J., Wen, X., and Guo, H. (2012). Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of Arabidopsis leaf senescence. *J. Integr. Plant Biol.* *54*, 526–539.

Lin, P.-C., Pomeranz, M.C., Jikumaru, Y., Kang, S.G., Hah, C., Fujioka, S., Kamiya, Y., and Jang, J.-C. (2011). The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses. *Plant J* *65*, 253–268.

Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* *20*, 199–208.

Liu, Y., and Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *16*, 3386–3399.

Logemann, E., Birkenbihl, R.P., Ulker, B., and Somssich, I.E. (2006). An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* *2*, 16.

Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135–162.

VAN LOON, L.C., and VAN STRIEN, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *55*, 85–97.

Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 496–501.

Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., and Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* *14 Suppl*, S389–400.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., et al. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* *16*, 2089–2103.

Maffei, M.E., Mithöfer, A., and Boland, W. (2007). Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends Plant Sci.* *12*, 310–316.

Magnan, F., Ranty, B., Charpentreau, M., Sotta, B., Galaud, J.-P., and Aldon, D. (2008). Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from Arabidopsis thaliana, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J* *56*, 575–589.

Makino, S., Kiba, T., Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (2000). Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* *41*, 791–803.

Mandal, S., and Mitra, A. Reinforcement of cell wall in roots of Lycopersicon esculentum through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *71*, 201–209.

McAinsh, M.R., and Hetherington, A.M. (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends Plant Sci.* *3*, 32–36.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 4–9.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* *126*, 969–980.

Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 101–122.

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. *Mol. Plant Pathol.* *6*, 327–333.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* *9*, 490–498.

Mizuno, T., and Nakamichi, N. (2005). Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant Cell Physiol.* *46*, 677–685.

Mohr, P.G., and Cahill, D.M. (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to Pseudomonas syringae pv. tomato and Peronospora parasitica. *Funct. Plant Biol.* *30*, 461–469.

Monaghan, J., and Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* *15*, 349–357.

Morant, A.V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S.M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B.L., and Bak, S. (2008). beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* *69*, 1795–1813.

- Mudgett, M.B. (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *56*, 509–531.
- Mühlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B., and Karpinski, S. (2008). Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 2339–2356.
- Müller, B., and Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science* *318*, 68–69.
- Munkvold, K.R., and Martin, G.B. (2009). Advances in experimental methods for the elucidation of *Pseudomonas syringae* effector function with a focus on AvrPtoB. *Mol. Plant Pathol.* *10*, 777–793.
- Murray, S.L., Ingle, R.A., Petersen, L.N., and Denby, K.J. (2007). Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *MPMI* *20*, 1431–1438.
- Mysore, K.S., and Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* *9*, 97–104.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2005). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* *46*, 686–698.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., Honma, T., Itoh, H., and Inaba, T. (2007). Arabidopsis Cor15am is a chloroplast stromal protein that has cryoprotective activity and forms oligomers. *Plant Physiol.* *144*, 513–523.
- Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T., and Inaba, T. (2008). Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *72*, 1642–1645.
- Nam, K.H., and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* *110*, 203–212.
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., and Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* *24*, 5123–5141.
- 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.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.G. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* *CB 18*, 650–655.

- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S.L., Mariani, P., and Lorito, M. (2007). Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* 7, 41.
- Nawrath, C., and Métraux, J.P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393–1404.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301, 969–972.
- Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., et al. (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3, 926.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S.-Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 361–368.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., 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.
- Nürnberger, T., and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6, 335–345.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., and Bolwell, G.P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236, 765–779.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E.A., Moussatche, P., Lund, S.T., Jones, J.B., and Klee, H.J. (2003). Susceptible to intolerance—a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant J* 33, 245–257.
- O'Neill, L.A.J. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 226, 10–18.
- Onai, K., and Ishiura, M. (2005). PHYTOCLOCK 1 encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells* 10, 963–972.
- Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., Marshall, A., Jayasuta, S., Baxter, C., van Wijk, R., et al. (2013). Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161, 1476–1485.
- Perochon, A., Dieterle, S., Pouzet, C., Aldon, D., Galaud, J.-P., and Ranty, B. (2010). Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 747–751.
- Perruc, E., Charpentreau, M., Ramirez, B.C., Jauneau, A., Galaud, J.-P., Ranjeva, R., and Ranty, B. (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 38, 410–420.

- 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.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 489–521.
- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., and Hirt, H. (2009). A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol. Plant* *2*, 120–137.
- Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z., Seay, M., Gerstein, M., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4730–4735.
- Qiu, J.-L., Zhou, L., Yun, B.-W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., MacKinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., and Morris, P.C. (2008). Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases MKK1 and MKK2 Have Overlapping Functions in Defense Signaling Mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* *148*, 212–222.
- Ranf, S., Wünnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., and Dietrich, P. (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* *53*, 287–299.
- Ranty, B., Aldon, D., and Galaud, J.-P. (2006). Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal. Behav.* *1*, 96–104.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., and Watkins, C.B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.* *115*, 137–149.
- Rauhut, T., and Glawischnig, E. (2009). Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochemistry* *70*, 1638–1644.
- Reddy, A.S.N., Ali, G.S., Celesnik, H., and Day, I.S. (2011). Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* *23*, 2010–2032.
- Ren, B., Liang, Y., Deng, Y., Chen, Q., Zhang, J., Yang, X., and Zuo, J. (2009). Genome-wide comparative analysis of type-A Arabidopsis response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Res.* *19*, 1178–1190.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5638–5643.
- Rentel, M.C., and Knight, M.R. (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *135*, 1471–1479.
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* *62*, 3321–3338.

- Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2001). A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J* 28, 123–133.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 317–343.
- Rodermel, S., and Park, S. (2003). Pathways of intracellular communication: tetrapyrroles and plastid-to-nucleus signaling. *BioEssays* 25, 631–636.
- Ron, M., and Avni, A. (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* 16, 1604–1615.
- Rossini, L., Cribb, L., Martin, D.J., and Langdale, J.A. (2001). The Maize Golden2 Gene Defines a Novel Class of Transcriptional Regulators in Plants. *Plant Cell* 13, 1231–1244.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15, 2122–2133.
- Rudd, J.J., and Franklin-Tong, V.E. (2001). Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol.* 151, 7–33.
- Von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P., and Schäffner, A.R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell* 23, 4124–4145.
- Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* 24, 703–711.
- Savitch, L.V., Subramaniam, R., Allard, G.C., and Singh, J. (2007). The GLK1 “regulon” encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 234–238.
- Schaller, G.E., Kieber, J.J., and Shiu, S.-H. (2008). Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 6, e0112.
- Schlaeppli, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A., and Mauch, F. (2010). Disease resistance of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant J.* 62, 840–851.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., and Chinchilla, D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem.* 285, 9444–9451.
- Scraser-Field, S.A.M.G., and Knight, M.R. (2003). Calcium: just a chemical switch? *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 500–506.
- Shaw, S.L., and Long, S.R. (2003). Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* Root Hair Cells. *Plant Physiol.* 131, 976–984.

- Shen, Q.-H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315, 1098–1103.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., et al. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* 64, 204–214.
- Singh, S., Pandey, V.P., Naaz, H., and Dwivedi, U.N. (2012). Phylogenetic analysis, molecular modeling, substrate-inhibitor specificity, and active site comparison of bacterial, fungal, and plant heme peroxidases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 59, 283–294.
- Song, J., Durrant, W.E., Wang, S., Yan, S., Tan, E.H., and Dong, X. (2011). DNA repair proteins are directly involved in regulation of gene expression during plant immune response. *Cell Host Microbe* 9, 115–124.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., and Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316–318.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235–270.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215.
- Strand, A. (2004). Plastid-to-nucleus signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 621–625.
- 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). MEK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol.* 143, 661–669.
- Sun, A., and Li, Z. (2012). Regulatory role of nitric oxide in lipopolysaccharides-triggered plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* 8.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., and Bent, A.F. (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* 18, 764–779.
- Susek, R.E., Ausubel, F.M., and Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74, 787–799.
- Tameling, W.I.L., and Takken, F.L.W. (2008). Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. In *Sustainable Disease Management in a European Context*, D.B. Collinge, L. Munk, and B.M. Cooke, eds. (Springer Netherlands), pp. 243–255.
- Tena, G., Boudsocq, M., and Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 519–529.

Thalhammer, A., Hundertmark, M., Popova, A.V., Seckler, R., and Hinch, D.K. (2010). Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1812–1820.

Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 63–68.

Tierens, K.F., Thomma, B.P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (2001). Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125, 1688–1699.

Ton, J., and Mauch-Mani, B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38, 119–130.

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.

De Torres, M., Sanchez, P., Fernandez-Delmond, I., and Grant, M. (2003). Expression profiling of the host response to bacterial infection: the transition from basal to induced defence responses in RPM1-mediated resistance. *Plant J.* 33, 665–676.

De Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bögre, L., and Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* 26, 1434–1443.

Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., and Shirasu, K. (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Curr. Biol. CB* 18, 1396–1401.

Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 459–465.

Uzunova, A.N., and Popova, L.P. (2000). Effect of Salicylic Acid on Leaf Anatomy and Chloroplast Ultrastructure of Barley Plants. *Photosynthetica* 38, 243–250.

Wang, D., Amornsiripanitch, N., and Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* 2, e123.

Wang, L., Makino, S., Subedee, A., and Bogdanove, A.J. (2007). Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8023–8027.

Waters, M.T., Moylan, E.C., and Langdale, J.A. (2008). GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant J.* 56, 432–444.

Waters, M.T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R.G., Saunders, N.J., and Langdale, J.A. (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 1109–1128.

Weber, H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* 7, 217–224.

Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., and Gatz, C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1279–1291.

- Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F.E. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* *181*, 593–603.
- Wittstock, U., and Gershenson, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 300–307.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* *1*, 639–647.
- Wykoff, D.D., Grossman, A.R., Weeks, D.P., Usuda, H., and Shimogawara, K. (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15336–15341.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., et al. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol* *18*, 74–80.
- Xie, C., Zhou, X., Deng, X., and Guo, Y. (2010). PKS5, a SNF1-related kinase, interacts with and phosphorylates NPR1, and modulates expression of WRKY38 and WRKY62. *J. Genet. Genomics* *37*, 359–369.
- Xing, D.-H., Lai, Z.-B., Zheng, Z.-Y., Vinod, K.M., Fan, B.-F., and Chen, Z.-X. (2008). Stress- and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Mol. Plant* *1*, 459–470.
- Yamada, T. (1993). The Role of Auxin in Plant-Disease Development. *Annu. Rev. Phytopathol.* *31*, 253–273.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A.C., Tax, F.E., and Ryan, C.A. (2010). PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* *22*, 508–522.
- Yang, D.-H., Hettenhausen, C., Baldwin, I.T., and Wu, J. (2011). The multifaceted function of BAK1/SERK3: plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* *6*, 1322–1324.
- Yoo, S.-D., Cho, Y., and Sheen, J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends Plant Sci.* *14*, 270–279.
- Yu, L.M. (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4088–4094.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15811–15816.
- Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ* doi: 10.1111/pce.12122.

- Zemojtel, T., Fröhlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., et al. (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* *11*, 524–525; author reply 526–528.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* *6*, 520–527.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al. (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* *1*, 175–185.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., et al. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* *7*, 290–301.
- Zhang, Z., Wu, Y., Gao, M., Zhang, J., Kong, Q., Liu, Y., Ba, H., Zhou, J., and Zhang, Y. (2012). Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host Microbe* *11*, 253–263.
- Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* *11*, 587–596.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *MPMI* *13*, 191–202.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T.K., Li, W., et al. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 12539–12544.
- Zielinski, R.E. (2002). Characterization of three new members of the *Arabidopsis thaliana* calmodulin gene family: conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. *Planta* *214*, 446–455.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* *12*, 414–420.
- 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.

Author: Cécilia CHEVAL

Title: Functional analysis of PRR2, a nuclear target of a calcium sensor (CML9) involved in plant defences against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*

Supervisor: Benoît RANTY

Abstract

Calcium signals are one of the primary mediators of plant defence responses against pathogens. Although rises in cytosolic calcium levels are well described during the plant-pathogen interactions, how calcium signals are sensed and relayed into downstream events is poorly understood. Studies on calcium sensors such as calmodulin and calmodulin-like (CML) proteins have demonstrated a critical role of these calcium signalling components in plants. In this work, evidences were provided indicating that the calmodulin-like protein CML9 is involved in plant immunity in *Arabidopsis*. *CML9* expression is up-regulated during infection with the virulent pathogen *Pseudomonas Syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000) and treatment with flagellin, a pathogenesis associated molecular pattern (PAMP) involved in PAMP-triggered immunity (PTI). Recently, using *cml9* knock-out mutants and *CML9* overexpressors lines, we have demonstrated that CML9 contributes to plant defence mechanisms against *Pst* DC3000 in a flagellin dependant signalling pathway.

To gain further insights into the role of this calcium sensor in defence mechanisms, search for CML9 interacting partners was performed. Among the CML9 binding proteins, an atypical pseudo-response regulator PRR2 was identified. PRR2 shares all the characteristics of a transcription factor with a GARP DNA binding domain but its functions was still unravelled. In a previous work, it was demonstrated that CML9 and PRR2 interact into the nucleus *in planta* where PRR2 is supposed to act as a transcription factor. Then, in my work, a genetic analysis was carried-out and shows that PRR2 is a positive regulator of defence responses when challenged with *Pst* DC3000 or treated with flagellin. The combination of transcriptomic and phenotyping analyses in response to *Pst* DC3000 and flagellin have demonstrated that PRR2 contributes to plant immunity through a salicylic acid signalling pathway. Moreover, our analyses indicate that PRR2 is a positive regulator of camalexin and callose production in response to *Pst* DC3000 and flagellin.

These findings contribute to decipher a novel calcium signalling pathway mediated by a plant specific calcium sensor and a potential transcription factor during biotic stress.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae*, flagellin, defence, hormonal signalling, CaM, CMLs, calcium signalling, GARP, gene regulation.

Auteur: Cécilia CHEVAL

Titre: Contribution d'une «*Calmodulin-like protein*» CML9, et de son partenaire, le facteur de transcription de type GARP PRR2, à la mise en place des réactions de défense chez *Arabidopsis thaliana*

Directeur de thèse: Benoît RANTY

Résumé

Chez les plantes, le calcium (Ca^{2+}) est considéré comme un messager secondaire important permettant d'intégrer à l'échelle cellulaire les fluctuations de l'environnement. Des protéines senseurs du Ca^{2+} , telle la calmoduline (CaM), permettent de décoder ce message. A côté de cette famille de protéines présentes chez tous les Eucaryotes, une famille de protéines apparentées à la CaM mais spécifiques aux plantes, les CMLs pour *Calmodulin-like proteins*, existent. A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur cette famille de protéine. L'objectif de ce travail de thèse a concerné dans un premier temps CML9, une CML d'*Arabidopsis thaliana*. Des approches génétiques nous ont permis de montrer que CML9 contribue à la défense des plantes en réponse à la bactérie virulente *P. syringae* DC3000 (*Pst* DC3000) dans une voie de signalisation dépendante de la perception de la flagelline. L'ensemble de ces résultats ont conduit à formuler l'hypothèse que CML9 contribuerait à moduler certaines réactions de défense chez *A. thaliana*.

Afin de mieux comprendre le rôle de CML9 dans les réactions de défense, la recherche de ses partenaires a permis d'identifier une cible nucléaire de fonction inconnue: PRR2, un régulateur de réponse atypique portant un motif GARP de liaison à l'ADN. Dans une deuxième partie, l'analyse fonctionnelle réalisée sur différentes lignées perte ou gain de fonction a montré que PRR2 est un régulateur positif des réponses de défense en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 ou à un traitement par la flagelline. La combinaison de différentes approches transcriptomiques et de phénotypage en réponse à *Pst* DC3000 et en réponse à la flagelline a révélé que PRR2 contribue à la mise en place des réactions de défense dans une voie de signalisation dépendante de l'acide salicylique. Ces travaux indiquent que PRR2 est un régulateur positif de l'accumulation de callose et de camalexine.

L'ensemble des données obtenues dans ce travail ont permis de mettre en évidence chez *Arabidopsis* une nouvelle voie de signalisation impliquant une *calmodulin-like protein* et un facteur de transcription de type GARP spécifiques au règne végétal au cours de l'immunité.

Mots clefs: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae*, flagelline, défense, signalisation hormonale, CaM, CMLs, signalisation calcium, GARP, régulation génique.

Discipline administrative: Biosciences végétales

Laboratoire d'accueil: Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR5546/CNRS/Université Paul Sabatier, Pôle de Biotechnologies Végétales, 24 Chemin de Borderouge BP 42617 Auzeville 31326 CASTANET TOLOSAN.