



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Interactions Plantes-Microorganismes*

---

Présentée et soutenue par

*Mathieu Hanemian*  
Le 9 mai 2012

**Titre :** *Rôle de la protéine CLV1 dans la sensibilité d'Arabidopsis thaliana à la bactérie phytopathogène Ralstonia solanacearum*

---

**JURY**

*Dr. Patrick Saindrenan,*  
*Dr. Françoise Simon-Plas,*  
*Dr. Caroline Hartmann,*  
*Dr. Bruno Favery,*  
*Dr. Yves Marco,*  
Président: *Pr. Matthieu Arlat*

---

**Ecole doctorale :**

*Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)*

**Unité de recherche :**

*Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes*

**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Yves Marco*

**Rapporteurs :** *Dr. Françoise Simon-Plas, Dr. Patrick Saindrenan*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury pour avoir juger mes travaux : merci à **Françoise Simon-Plas** et **Patrick Saindrenan** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, à **Caroline Hartmann** et **Bruno Favery** pour en avoir été examinateur et à **Matthieu Arlat** pour avoir accepté de présider ce jury. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour la discussion enrichissante que vous avez apportée.

Je remercie également **Harald Keller** et **Deborah Goffner** pour leur participation lors des comités de thèse. Vos réflexions m'ont beaucoup servi et ont contribué à faire avancer ce travail.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude aux membres de l'équipe grâce à qui j'ai pu réaliser cette thèse dans de très bonnes conditions de travail mais aussi de bonne humeur. Bien sûr **Yves** qui m'a confié ce projet, **Xavier** pour toutes ton aide et ta bonne humeur, à **Laurent** pour m'avoir formé sur de nombreuses techniques et tous ces petits conseils, **Dominique** pour l'ouverture d'esprit, ainsi qu'**Alice**, **Céline**, **Jean-François** et **Binbin**, mes collègues non-perm. Un grand merci à **Ton** et **Yves Martinez** pour m'avoir initié à la microscopie et pour votre participation.

Je remercie également tous les membres du LIPM (et du LRSV, SCSV de mon temps) pour leur sympathie et leur générosité particulièrement les potes de promo du M2R, **Joanne**, **Mathieu**, **Louis-Jérôme** et **Daniel** ; les amis du labo, **Micka**, **Dani**, **Mehdi**, **Tom**, **David** et tout les autres avec qui j'ai partagé des moments de rigolades lors des pauses où au passage, dans les couloirs ; le groupe des filles : **Céline**, **Sandra** et **Lisa**.

Je remercie bien sûr mes potes de toujours, **Marc**, **Matthieu**, **Grégoire**, **Max**, **Mathieu** et bien d'autres avec qui je n'ai pas eu beaucoup de contact pendant 3 ans mais qui restent proches malgré tout, merci d'être passé me voir de temps en temps.

Un immense merci à **mes parents** qui m'ont permis de poursuivre mes études, de m'avoir soutenu et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. J'ai également ici une pensée pour mon **grand-père** qui a mis beaucoup d'espoir en moi. A **mes grand-mères**, **mon oncle**, **mon frère** et **mes cousins....**

Enfin, le meilleur pour la fin, à toi **Margarita**, la plus belle réussite au cours de ces 3 dernières années est sans aucun doute notre union. Je ne te remercierai jamais assez pour ta patience ton dévouement et ta bienveillance au cours de ces 8 derniers mois, tu m'as apporté tout le soutien dont j'avais besoin pour finaliser mes travaux. Mais surtout merci pour toute la joie que tu m'apporte chaque jour qui passe.

## **ABREVIATIONS**

**ABA** : ABscisic Acid  
**AIA** : Acetic Indol Acid  
**ARR** : Arabidopsis Response Regulator  
**Avr** : Avirulence  
**BAK1** :BRI1-Associated Kinase 1  
**BIK1** : Botrytis-Induced Kinase 1  
**BR** : BRassinostéroïdes  
**BRI1** : Brassinosteroid Insensitive 1  
**BZR** : BrassinoZole Resistant  
**CC** : Coiled-Coil  
**CDPK** : Calcium-Dependent Protein Kinases  
**CK** : CytoKinin  
**CLV** : CLAVATA  
**DAMP** : Damage-Associated Molecular Patterns  
**EFR** : EF-tu Receptor  
**EF-Tu** : Elongation Factor Thermo Unstable  
**EPS** : ExoPolySaccharides  
**ER** : ERECTA  
**ERF/AP2** : Ethylen Responsive Factor/APetala2  
**ET** : EThylen  
**ETI** : Effector-Triggered Immunity  
**ETS** : Effector-Triggered Susceptibility  
**flg22** : flagelline 22  
**FLS2** : FLagellin Sensing 2  
**GA** : Gibberellic Acid  
**HR** : Hypersensitive Response  
**hrp** : HR & Pathogenicity  
**HST** : Host Specific Toxin  
**ISR** : Induced Systemic Resistance  
**JA** : Jasmonic Acid  
**LRR** : Leucin Rich Repeat  
**LysM** : Lysin Motif  
**MAMPs** : Microbe-Associated Molecular Pattern  
**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinases  
**MTI** : MAMP-Triggered Immunity  
**NB-LRR** : Nucleotide-Binding-Leucin Rich Repeat  
**PR** : Pathogenesis-related  
**PRRs** : Pattern Recognition Receptors  
**PTGS** : Post-Transcriptional Gene Silencing  
**R** : Resistance  
**RLCK** : Receptor-Like Cytoplasmic Kinases  
**RLK** : Receptor-Like Kinase

**RLP** : Receptor-Like Protein  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**SA** : Salicylic Acid  
**SAR** : Systemic Acquired Resistance  
**SERK** : Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase  
**SST3** : Système de Sécrétion de Type III  
**STM** : ShootMeristemLess  
**TALe** : Transcription Activator-Like effector  
**TIR** : Toll Interleukin-1 Receptor  
**TMM** : Too Many Mouths  
**VSR** : Viral Suppressors of RNA-silencing

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>5</b>
<b>PARTIE I : GENERALITE DE PATHOLOGIE VEGETALE</b>	<b>5</b>
<b>A. LES CLASSES DE MICROORGANISMES PATHOGENES</b>	<b>5</b>
<b>B. CONCEPTS GENERAUX</b>	<b>5</b>
<b>C. LES MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES</b>	<b>6</b>
<b>PARTIE II : LES MECANISMES DE RESISTANCE</b>	<b>7</b>
<b>A. RESISTANCES PREFORMEES</b>	<b>7</b>
<b>B. RESISTANCES INDUITES</b>	<b>8</b>
<b>1. Généralités : le modèle zig-zag</b>	<b>8</b>
<b>2. Les acteurs de la résistance basale</b>	<b>9</b>
2.1. Les éliciteurs	9
2.1.1. <i>Les éliciteurs exogènes</i>	9
2.1.2. <i>Les éliciteurs endogènes</i>	9
2.2. Les PRR	10
2.2.1. <i>Les RLKs</i>	10
2.2.1.1. <i>RLKs (avec un domaine extracellulaire)</i>	10
2.2.1.2. <i>RLCKs</i>	13
2.2.2. <i>Les RLPs</i>	13
<b>3. Les acteurs de la résistance spécifique (ETI)</b>	<b>14</b>
3.1. Les effecteurs, facteurs de virulence ou d'avirulence	14
3.2. Les protéines R, récepteurs de la résistance spécifique	15
3.2.1. <i>Les protéines R intracellulaires</i>	15
3.2.2. <i>Les protéines R extracellulaires</i>	16
3.2.3. <i>Les protéines R de structure atypique</i>	16
3.3. La reconnaissance R/Avr	16
3.3.1. <i>Le modèle ligand récepteur</i>	16
3.3.2. <i>Le modèle de garde</i>	17
3.3.3. <i>Le modèle du leurre</i>	17
<b>4. Distinction résistance basale et spécifique</b>	<b>17</b>
4.1. MAMP ou effecteurs	18
4.2. PRR ou protéines R	18
<b>5. Les voies de signalisation menant à la résistance</b>	<b>19</b>
5.1. Les flux ioniques	19
5.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	19
5.3. La signalisation par les MAPKs	20
5.4. Reprogrammation transcriptionnelle	20
<b>6. Défenses mises en place</b>	<b>21</b>
<b>7. Rôle des hormones</b>	<b>21</b>
7.1. Voie de signalisation dépendante du SA	22
7.2. Voie de signalisation dépendante de l'ET et du JA	22
7.3. Voie de signalisation dépendante de l'AIA	23
7.4. Voie de signalisation dépendante des CKs	23
7.5. Voie de signalisation dépendante de l'ABA	24
<b>8. Résistance et Sensibilité</b>	<b>25</b>

<b>PARTIE III : LES MECANISMES DE SENSIBILITE</b>	<b>26</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	26
<b>Approches développées pour identifier les facteurs de compatibilité</b>	26
<b>B. MANIPULATION DES MECANISMES DE DEFENSE DE LA PLANTES PAR LES AGENTS PHYTOPATHOGENES</b>	27
<b>1. Les effecteurs, des acteurs essentiels de virulence des agents phytopathogènes</b>	27
1.1. Méthodes d'identification des effecteurs	28
1.2. Système de sécrétion d'effecteurs	28
1.2.1. <i>Système de sécrétion de type III (SST3)</i>	29
1.2.2. <i>Système de sécrétion/translocation des effecteurs de champignons et oomycètes</i>	29
1.3. Inhibition de l'immunité végétale	30
1.3.1. <i>Effecteur de protection</i>	30
1.3.2. <i>Effecteur de camouflage</i>	31
1.3.3. <i>Mécanismes d'évasion</i>	31
1.3.4. <i>Ciblage des étapes de perception</i>	31
1.3.5. <i>Inhibition de la cascade des MAPKs</i>	31
1.3.6. <i>Inhibition du transport de composés de défense</i>	32
1.3.7. <i>Modulation de la régulation (post-)transcriptionnelle</i>	32
1.3.7.1. <i>Activation transcriptionnelle : les effecteurs TAL</i>	32
1.3.7.2. <i>Stabilité des ARNs</i>	34
1.3.7.3. <i>Voie des microARNs</i>	34
<b>2. Manipulation de la balance hormonale</b>	35
2.1. Synthèse d'hormones par les agents pathogènes	35
2.2. Manipulation de la signalisation hormonale par les effecteurs	35
<b>3. Facteurs de compatibilité végétaux</b>	36
3.1. Signaux végétaux attracteurs et/ou inducteurs des mécanismes de virulence de l'agent pathogène	36
3.1.1. <i>Attraction de l'agent pathogène</i>	36
3.1.2. <i>Signaux végétaux induisant les mécanismes de virulence</i>	36
3.1.2.1. <i>Induction des gènes Vir chez Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.1.2.2. <i>Induction du régulon hrp des bactéries Gram-</i>	37
3.1.2.3. <i>Signaux inducteurs de la différenciation de l'appressorium des champignons pathogènes</i>	37
3.2. Sensibilité aux toxines et sensibilité aux agents pathogènes	38
3.3. Les facteurs de compatibilité reflètent la biologie de l'organisme pathogène	38
3.3.1. <i>Virus</i>	39
3.3.1.1. <i>Exploitation de composants structuraux</i>	39
3.3.1.2. <i>Exploitation d'éléments de l'appareil de synthèse protéique</i>	39
3.3.2. <i>Champignons et oomycètes biotrophes (hémibiotrophes)</i>	40
3.3.3. <i>Nématodes endoparasitaires sédentaires et différenciation des sites nourriciers</i>	40
<b>PARTIE IV : LE PATHOSYSTEME R. SOLANACEARUM/A. THALIANA</b>	<b>43</b>
<b>1. Généralités : R. solanacearum, l'agent du flétrissement bactérien</b>	43
<b>2. Classification</b>	43
<b>3. Cycle de vie</b>	43
<b>4. Caractéristiques génomiques du complexe d'espèces de R. solanacearum</b>	44
<b>5. Les facteurs de pathogénicité de R. solanacearum</b>	44
5.1. Exopolysaccharides	45
5.2. Motilité	45
5.3. Production d'hormone	45

5.4. Régulation du SST3 de <i>R. solanacearum</i>	45
<b>6. Quelques effecteurs de la souche GMI1000</b>	<b>46</b>
6.1. PopP1	46
6.2. GALAs	46
<b>7. Le couple R/Avr RRS1-R/PopP2</b>	<b>47</b>
7.1. RRS1-R	47
7.2. PopP2	47
<b>8. Autres approches développées pour étudier la maladie</b>	<b>48</b>
8.1. Approche transcriptomique	48
8.2. Approches génétiques	48
8.2.1. <i>Ciblée</i>	48
8.2.2. <i>Globale ou sans à priori</i>	49

## **PARTIE V : VOIE DE SIGNALISATION CLAVATA** **51**

### **LE MERISTEME CAULINAIRE** **51**

<b>1. Généralités</b>	<b>51</b>
<b>2. Structure</b>	<b>51</b>
<b>3. Régulation de la maintenance du méristème caulinaire</b>	<b>52</b>
3.1. Voie CLAVATA3-WUS	52
3.1.1. <i>Les composants de la voie de signalisation</i>	52
3.1.1.1. <i>CLV3</i>	52
3.1.1.2. <i>CLV1 (et ses homologues)</i>	52
3.1.1.3. <i>CLV2 et CRN</i>	53
3.1.1.4. <i>WUS</i>	53
3.1.1.5. <i>Les protéines phosphatase</i>	53
3.2. Voie ShootMeristemLess (STM)	54
3.3. Voies hormonales	54
3.3.1. <i>Les cytokinines (CKs)</i>	54
3.3.2. <i>L'auxine (AIA)</i>	55

## **RESULTATS** **56**

### **PARTIE I : ROLE DE LA PROTEINE CLV1 DANS LA SENSIBILITE D'ARABIDOPSIS THALIANA A LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE RALSTONIA SOLANACEARUM** **56**

#### **ARTICLE 1 (EN PREPARATION):**

#### **DISRUPTION OF THE RECEPTOR-LIKE KINASE *CLAVATA1* GENE LEADS TO DECREASED MIR169 ACCUMULATION AND ENHANCES DISEASE RESISTANCE TO *RALSTONIA SOLANACEARUM* IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

### **PARTIE II : RESULTATS COMPLEMENTAIRES** **102**

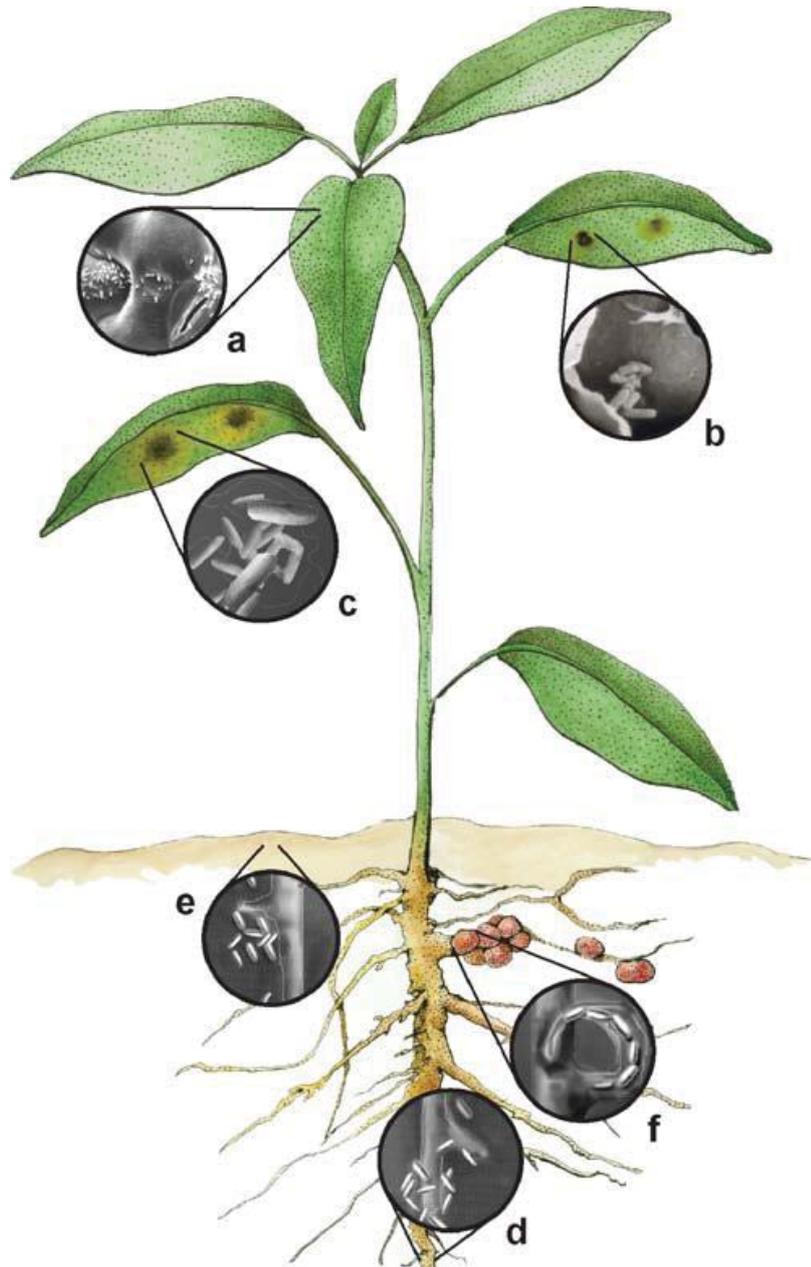
<b>A. ROLE DE CLV1 AU COURS DE L'INFECTION PAR <i>H. ARABIDOPSISIDIS</i></b>	<b>102</b>
<b>1. Complémentation des mutants <i>clv1</i> en réponse à <i>H. arabidopsisidis</i></b>	<b>102</b>
<b>2. Les mécanismes de résistance des plantes <i>clv1</i> à <i>H. arabidopsisidis</i> et <i>R. solanacearum</i> sont-ils conservés ?</b>	<b>102</b>
<b>3. Conclusion et perspectives</b>	<b>103</b>
<b>B. ROLE DE CLV2 ET CRN AU COURS DE L'INFECTION PAR <i>R. SOLANACEARUM</i></b>	<b>104</b>
<b>1. Les mécanismes de résistance des plantes <i>clv1</i>, <i>clv2</i> et <i>crn</i> à <i>R. solanacearum</i> sont-ils similaires ?</b>	<b>104</b>
<b>2. Conclusion et perspectives</b>	<b>104</b>

<b>PARTIE III : LES MECANISMES DE CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN CAUSEE PAR <i>R. SOLANACEARUM</i></b>	<b>105</b>
Introduction générale : les moyens de lutte contre les maladies des plantes	105
<b>ARTICLE 2: BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL WILT IN ARABIDOPSIS THALIANA INVOLVES ABSCISSIC ACID SIGNALLING</b>	
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>109</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>109</b>
<b>PARTIE I : CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN</b>	<b>111</b>
<b>PARTIE II : RESISTANCE ACCRUE DES MUTANTS <i>CLV1</i> A <i>R. SOLANACEARUM</i></b>	<b>113</b>
1. Les LRR-RLKs à la croisée du développement et des réponses d'adaptation aux stress	113
2. La résistance accrue des mutants <i>clv1</i> est-elle dépendante de composantes des voies de signalisation CLAVATA ?	114
3. Les récepteurs CLV1, CLV2 et CRN agirait-ils au sein d'un même complexe ?	114
4. Reconnaissance d'autres membres de la famille des gènes <i>CLE</i> par les récepteurs CLV1, CLV2 et CRN	115
5. CLV1, CLV2 et CRN sont-ils impliqués dans la perception d'un signal bactérien ?	115
6. Quels sont les domaines de CLV1 et CLV2 importants pour l'établissement de la maladie ?	116
7. Y-a-t-il une relocalisation subcellulaire de CLV1 en réponse à <i>R. solanacearum</i>	116
8. Quels sont les mécanismes qui sous-tendent la résistance accrue des plantes <i>clv1</i> à <i>R. solanacearum</i> ?	116
9. Des hormones sont-elles impliquées dans la résistance des plantes <i>clv1</i> ?	116
10. Rôle des gènes <i>NF-YA</i> et des miR169 dans la résistance accrue à <i>R. solanacearum</i>	117
- Les gènes <i>NF-YA</i> , des facteurs de transcription encore peu connus chez les végétaux	117
- Les microARNs miR169, modulateurs des réponses à différents stimuli environnementaux	118
- Les miR169 sont-ils impliqués dans le développement du méristème caulinaire ?	119
11. Rôle de CLV1 et CLV2 dans les interactions symbiotiques	120
<b>CONCLUSION : ROLE GENERALE DE CLV1 DANS LES INTERACTIONS PLANTES-MICROORGANISMES</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>121</b>

# Introduction

---

---



**Figure 1. Schématisation de l'interaction entre une plante et des bactéries pathogènes et symbiotiques (D'après Grant *et al.*, 2006).**

(a) *Pseudomonas syringae* se développant en épiphytes proches d'un stomate à la surface de la feuille

(b) *Pseudomonas syringae* localisée dans l'apoplaste d'une feuille infectée visualisée par microscopie électronique à balayage

(c) *Erwinia carotovora atroseptica* dans une feuille infectée

(d) *Ralstonia solanacearum* associée aux racines

(e) *Pseudomonas fluorescens* sur une racine

(f) *Rhizobium* spp dans un poil absorbant formant une structure en crosse de berger. Des nodules sont schématisés sur la racine indiquée.

# INTRODUCTION GENERALE

## **PARTIE I : GENERALITE DE PATHOLOGIE VEGETALE**

Dans leur environnement naturel, les plantes sont en contact avec une grande diversité de populations microbiennes (Barrett *et al.*, 2009) avec lesquelles elles établissent différents types d'interactions. Certains microorganismes établissent une relation symbiotique avec la plante profitant aux deux partenaires. D'autres vivent en épiphytes sur les plantes qui leurs fournissent une niche et n'ont apparemment aucun effet. Enfin, certains microorganismes parasites nuisent aux plantes et affectent leur croissance et leur reproduction de manière plus ou moins importante (Fig. 1). Par définition, les microorganismes pathogènes se distinguent par leur capacité à provoquer l'apparition de symptômes associés au développement de diverses maladies (Fig. 2).

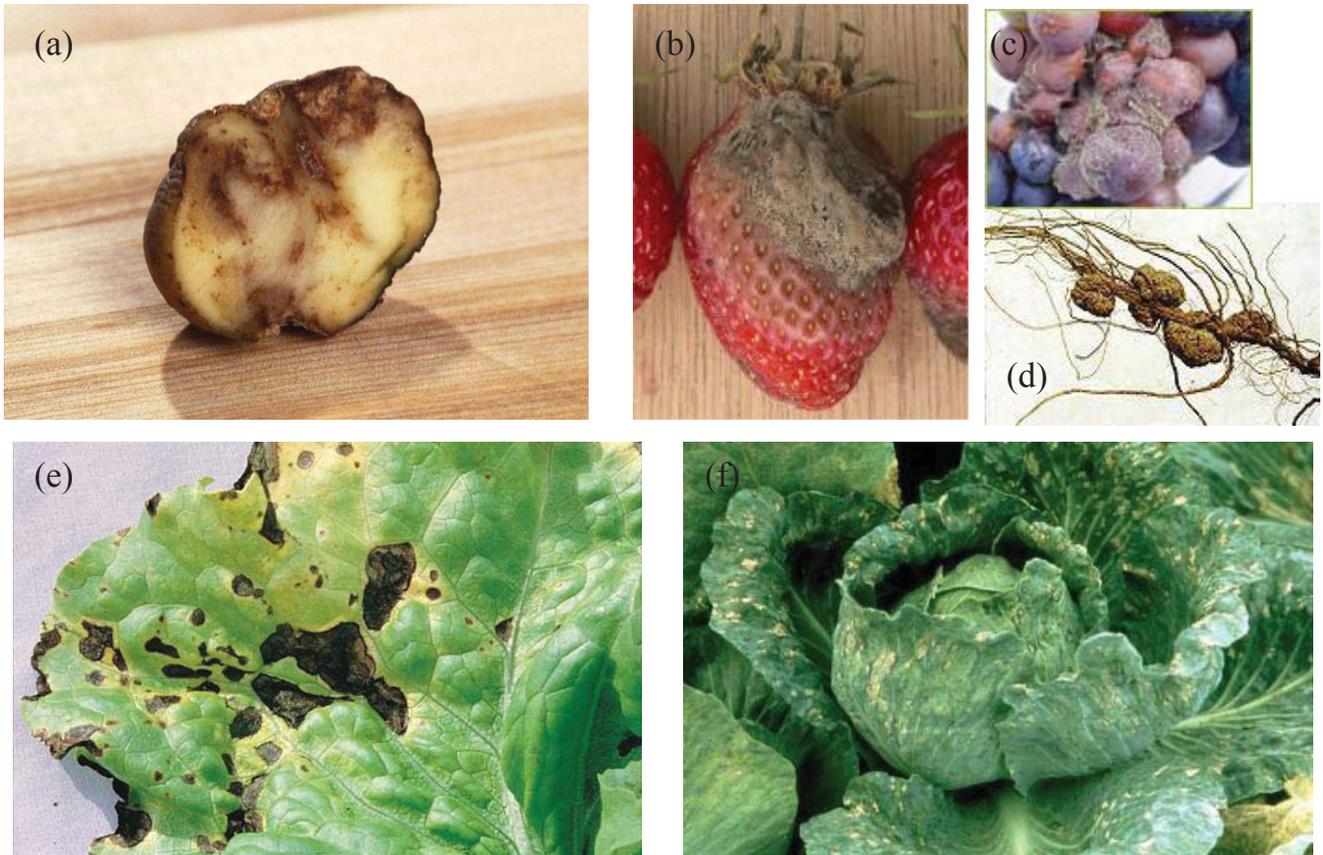
### **A. Les classes de microorganismes pathogènes**

D'un point de vue phylogénétique, la diversité des organismes potentiellement pathogènes est très large, des insectes au virus en passant par les nématodes, les champignons, les oomycètes ou les bactéries... Néanmoins, ils peuvent être classifiés plus simplement en fonction de leur mode de vie et de la façon dont ils exploitent la plante pour la coloniser et se multiplier. Les agents pathogènes végétaux se divisent en trois classes. Les organismes **biotrophes**, qui se nourrissent de nutriments détournés de tissus végétaux vivants sans produire de mort cellulaire. Ils s'opposent aux **nécrotrophes**, qui se nourrissent de la matière issue de tissus morts. Il convient d'ajouter une troisième catégorie, les organismes **hémibiotrophes**. Ces organismes se comportent à la fois en tant que biotrophes et nécrotrophes, en fonction des conditions environnementales dans lesquelles ils se trouvent, ou du stade de leur cycle de vie.

### **B. Concepts généraux**

Au cours des dernières décennies, les études portant sur les interactions entre les plantes et les microorganismes pathogènes se sont principalement focalisées sur les mécanismes de résistance mis en place par la plante. On en distingue désormais deux grandes classes.

Lorsque l'ensemble des variétés d'une espèce végétale est résistante à n'importe quel isolat d'un microorganisme pathogène donné, le terme de résistance **non hôte** est employé. Cette résistance est la plus répandue et la plus durable chez les plantes (Heath, 2000). Dans ce cas, l'agent pathogène n'est pas adapté à la plante qu'il tente d'infecter et il se heurte à l'une des



**Figure 2. Diversité des symptômes provoqués par les microorganismes phytopathogènes**

- (a) Le mildiou de la pomme de terre, maladie causée par l'oomycète *Phytophthora infestans*, et responsable de la famine en Irlande au milieu du 19<sup>e</sup> siècle
- (b) La pourriture grise (ou noble), provoquée par le champignon *Botrytis cinerea*, sur une fraise (c) ou une grappe de raisin
- (d) Galles de racines induites par le nématode *Meloidogyne incognita*
- (e) Tâches bactériennes sur une feuille de laitue causée par *Xanthomonas campestris*
- (f) Nécrose sur chou causée par le virus de la mosaïque jaune du navet

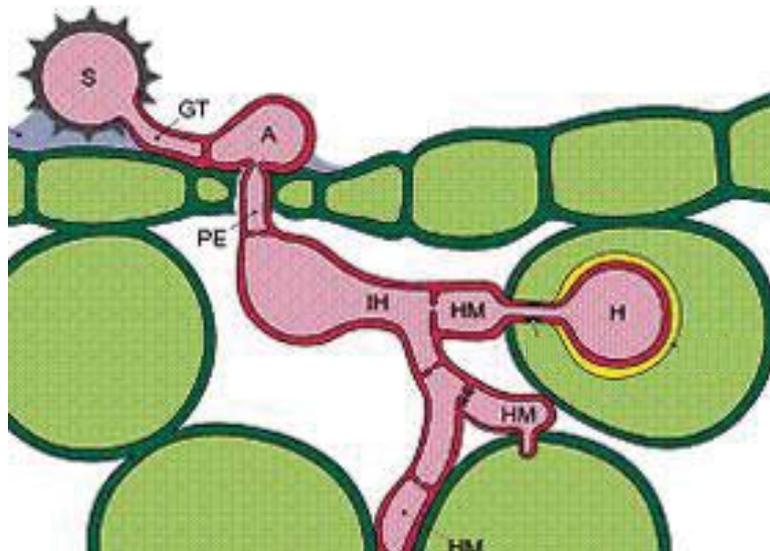
nombreuses barrières que possède la plupart des espèces végétales (Thordal-Christensen, 2003).

En revanche, lorsque l'agent pathogène est capable d'infecter une espèce végétale mais que certains génotypes (cultivars) de cette espèce sont résistants, on parle de résistance hôte. Dans ce cas, la plante est dite **résistante**, l'agent pathogène **avirulent**, et l'interaction entre ces deux partenaires est dite **incompatible**. A l'opposé, lorsque l'infection par un agent pathogène aboutit au développement de symptômes de maladie, l'interaction est dite **compatible**, la plante est **sensible** au microorganisme pathogène **virulent**.

### C. Les mécanismes de défense des plantes

Contrairement aux animaux, les plantes ne possèdent pas de cellules mobiles, ni de système immunitaire adaptatif. Leur mécanisme de défense repose sur le pouvoir immunitaire autonome de chaque cellule qui possède un large répertoire de protéines capables de percevoir le non-soi. La détection efficace d'un agent pathogène et le déclenchement rapide des réactions de défense constituent une étape cruciale qui détermine l'issue de l'interaction entre une plante et un agent pathogène.

Pour parvenir à coloniser une plante, un agent pathogène doit être capable de franchir un certain nombre de barrières. Les plantes disposent de deux principaux types de défense. Le premier est constitué de nombreuses barrières préformées. Celles-ci incluent non seulement des barrières physiques telles que la cuticule et la paroi des cellules végétales mais également des composés du métabolisme secondaire naturellement produits durant le développement des plantes et qui possèdent des activités antimicrobiennes (Field *et al.*, 2006). Ce sont les **défenses constitutives ou préformées** qui ne sont pas induites en réponse à l'infection et dont le rôle est d'empêcher, de retarder ou de limiter l'invasion d'un agent pathogène.



**Figure 3. Structures d'infections précoces de champignons biotrophes** (Université de Constance).

Suite à l'adhésion à la surface de la plante, le spore (S) de champignon va germer. Un tube de germination (GT) émerge et va se différencier en appressorium (A) au niveau d'un stomate par lequel le champignon va pénétrer dans la plante en appliquant une pression mécanique. Un hyphe de pénétration (PE) s'introduit alors dans la chambre sous-stomatale et s'allonge via un hyphe d'infection (IH). Lorsque cet hyphe entre en contact avec la paroi végétale de l'hôte, une cellule mère haustoriale (HM) se forme et développe une haustorie (H) qui s'invagine dans la cellule végétale. L'hyphe d'infection se divise ensuite pour créer d'autres haustories par les mêmes mécanismes

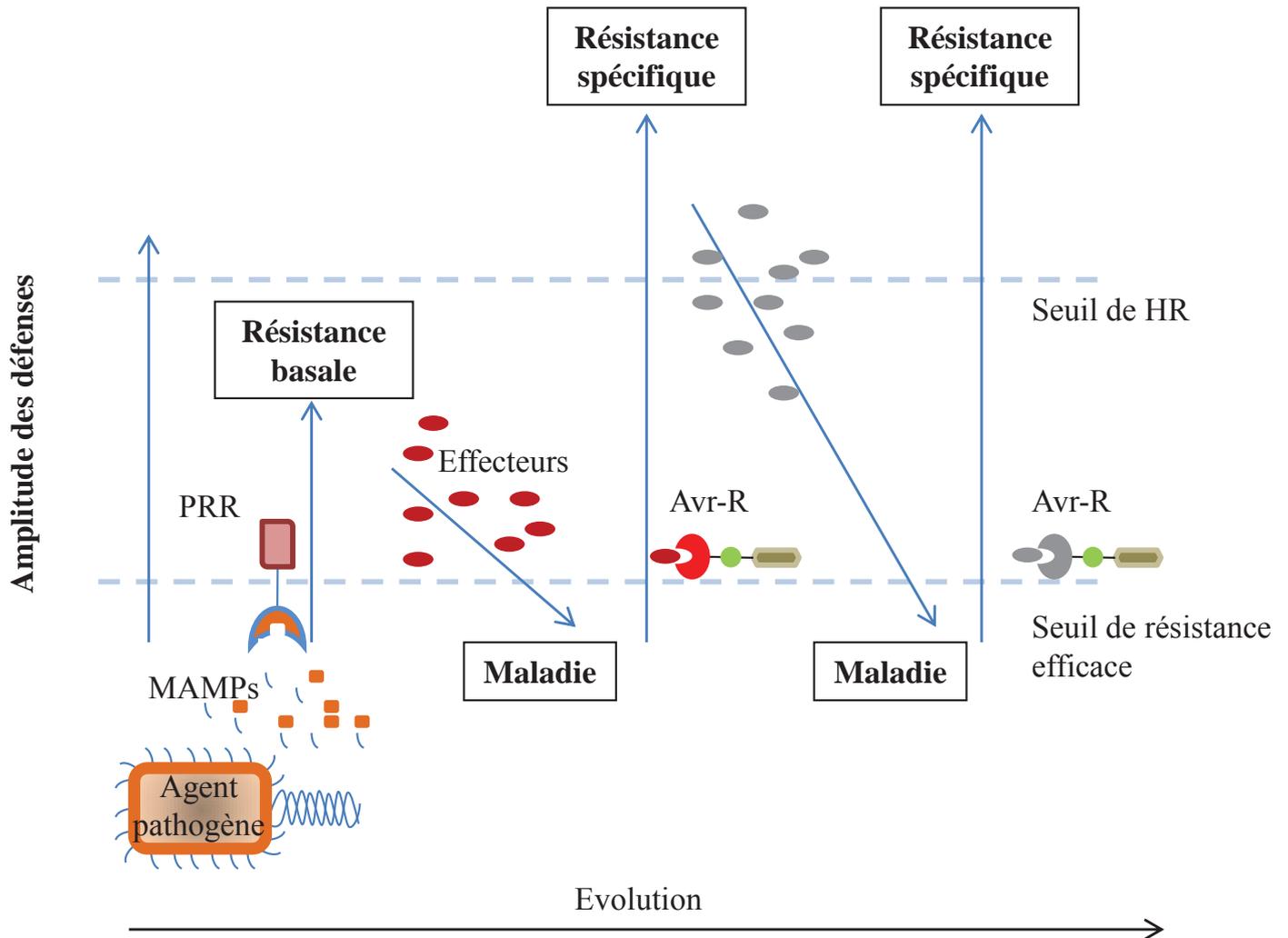
## PARTIE II : LES MECANISMES DE RESISTANCE

### A. Résistances préformées

La paroi végétale, la cuticule, ainsi que les cires constituent les **défenses physiques** principales que possèdent les plantes. La cuticule est une structure lipidique qui recouvre toute la surface des feuilles et constitue donc l'interface de la plante avec son environnement. Certains champignons utilisent des enzymes spécialisées telles que des cutinases pour traverser cette barrière (Skamnioti & Gurr, 2007). Les cires quant à elles, ont la propriété d'empêcher la formation de biofilms, propices au développement des bactéries ou à la germination des spores (Zabka *et al.*, 2008). La paroi végétale, quant à elle, forme un exosquelette autour de la cellule végétale. Elle est composée d'un réseau très complexe de polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de protéines de structures. C'est une structure très dynamique, qui est sans cesse remodelée et modifiée en fonction de la croissance et du développement de la plante, mais aussi en réponse aux signaux environnementaux (Hematy *et al.*, 2009). La paroi constitue donc une autre barrière que les agents pathogènes doivent franchir pour atteindre la cellule végétale proprement dite. Pour y parvenir, certains champignons et oomycètes ont développé une structure spécialisée de pénétration, appelée appressorium, qui va exercer une pression sur la paroi (Fig. 3.). Les agents pathogènes peuvent aussi sécréter toute une panoplie d'enzymes de dégradation telles que les exo- ou endopolygalacturonases, les pectine méthylestérases, les pectate lyases, xylanases et diverses endoglucanases (Wu *et al.*, 2006 ; Juge, 2006) ouvrant ainsi le passage vers la cellule.

En plus de ces défenses mécaniques, il existe des **défenses chimiques** constitutives qui empêchent la multiplication des agents pathogènes. Ce sont des composés ayant des propriétés antimicrobiennes et qui sont présents en quantité plus ou moins importante dans la cellule végétale (composés phénoliques, tannins, saponines...) (Morrissey & Osbourn 1999 ; Breuil *et al.*, 1999 ; Carrillo *et al.*, 2011).

Même si ces défenses physiques et chimiques (dont la liste présentée ci-dessus est loin d'être exhaustive) sont généralement efficaces, elles ne suffisent pas toujours à empêcher l'invasion par des agents pathogènes. D'autres types de défenses ont donc été mis en place par les plantes au cours de l'évolution.



**Figure 4. Le modèle « zigzag » illustre l'intensité des réponses des défenses végétales mises en place au cours du dialogue entre la plante et la bactérie (D'après Jones & Dangl, 2006).**

Dans une première phase, les plantes perçoivent les MAMPs grâce à leurs PRRs qui déclenchent la résistance basale. Dans une deuxième phase, les agents pathogènes libèrent des effecteurs qui vont interférer avec la résistance basale, et/ou promouvoir leur multiplication et leur nutrition, ce qui aboutit à la maladie. Dans une troisième phase, un effecteur sera reconnu par une protéine R qui activera la résistance spécifique, une version plus intense de la résistance basale, souvent associée à une mort cellulaire programmée ou HR. Dans une quatrième phase, l'agent pathogène évolue, en perdant les effecteurs reconnus par les protéines R ou en acquérant de nouveaux effecteurs capables de supprimer la résistance spécifique. De nouvelles protéines R apparaissent au cours de l'évolution, capables de percevoir ces nouveaux effecteurs, résultant à nouveau dans une résistance spécifique.

## B. Résistances induites

- La **résistance basale**, de faible intensité, est mise en place après reconnaissance de molécules appelées **éliciteurs généraux** de défense peu spécifiques et très conservés au sein de familles microbiennes.
- La **résistance spécifique** se met en place suite à la reconnaissance d'une molécule spécifique d'un agent pathogène donné.

### 1. Généralités : le modèle zig-zag

L'agression continue de microorganismes potentiellement pathogènes au cours de l'évolution a conduit à la sélection de plantes ayant développé les moyens de défense les plus adaptés. Le modèle en Zigzag (Jones and Dangl, 2006) permet d'intégrer les stratégies mises en place par les plantes et les agents pathogènes pour arriver à leurs fins, tout en tenant compte du caractère évolutif de cette relation (Fig. 4).

**La résistance basale ou MTI** (MAMP-Triggered Immunity) fait intervenir des **PRR** (Pattern Recognition Receptors), récepteurs qui perçoivent les éliciteurs généraux des réponses de défense aussi appelés **MAMP** (Microbe-Associated Molecular Pattern). Cette reconnaissance déclenche l'activation de voies de signalisation permettant la mise en place de défenses de faible intensité mais suffisante dans la grande majorité des cas pour contenir l'agent pathogène.

- Face à ce niveau de défense, les agents pathogènes ont développé de nouvelles stratégies afin d'être capables de surmonter ou de contourner ces mécanismes de résistance. Ils ont notamment acquis la capacité de produire des **effecteurs (facteurs de virulence)** qui interfèrent avec la mise en place de la résistance basale (Gohre & Robatzek, 2008). L'incapacité des plantes à établir cette résistance a pour conséquence le développement de la maladie aussi appelée **ETS** (Effector-Triggered Susceptibility).
- En réponse à cette pression mise par les agents pathogènes, les plantes ont quant à elles évolué en acquérant d'autres types de récepteurs, plus spécifiques, appelés **protéines R** (Résistance), capable de détecter ces effecteurs. Dans ce contexte, les effecteurs sont appelés facteurs d'**avirulence** (Avr) car ils sont responsables du déclenchement de réponses de défense menant à terme à la résistance de la plante. Ces défenses sont appelées **ETI** (Effector-Triggered Immunity) ou **résistance spécifique**

et sont très fréquemment associées à l'apparition de symptômes de **HR** (Hypersensitive Response), une mort cellulaire programmée qui se produit au niveau du site de l'infection.

## **2. Les acteurs de la résistance basale**

### 2.1. Les éliciteurs

La première ligne de défense du système immunitaire végétal repose sur la perception de molécules appelées **éliciteurs** généraux qui ont été classés en deux types en fonctions de leur provenance.

#### *2.1.1. Les éliciteurs exogènes*

Ils proviennent du microorganisme et sont aussi appelés **MAMP**. Ils peuvent être de nature protéique, lipidique ou oligosaccharidique (Boller & Felix, 2009). Les MAMP sont définis comme des épitopes invariants dans des molécules indispensables à la vie des microorganismes pathogènes et sont donc conservés. Ils sont absents du règne végétal et sont souvent perçus au sein d'un large spectre d'hôtes potentiels. Les MAMP peuvent être des molécules présentes à la surface des microorganismes. C'est le cas des peptidoglycanes de bactéries Gram positives (Gust *et al.*, 2007), de la chitine des champignons (Felix *et al.*, 1993), ou encore de  $\beta$ -glucanes d'oomycetes (Sharp *et al.*, 1984) qui sont des composants structuraux majeurs de la paroi de ces microorganismes. C'est aussi le cas de la flagelline, une des sous-unités protéiques du flagelle (Gomez-Gomez & Boller, 2002), un organe qui permet aux bactéries de se déplacer. Toutefois, les MAMP ne sont pas nécessairement des molécules de surface. La protéine EF-Tu (Elongation Factor Thermo unstable) (Kunze *et al.*, 2004) par exemple est une des protéines les plus abondantes et conservées chez les bactéries (Jeppesen *et al.*, 2005) et joue un rôle fondamental dans la traduction protéique.

#### *2.1.2. Les éliciteurs endogènes*

Ils sont aussi appelés **DAMP** (Damage-Associated Molecular Patterns) et sont des molécules d'origine végétale libérées suite à l'action d'un microorganisme pathogène. Les DAMPs peuvent être issus de la dégradation passive de la cuticule ou de la paroi des cellules végétales sous l'action d'enzymes d'origine pathogène. C'est par exemple le cas des oligogalacturonides provenant de fragments de la paroi végétale attaquée par des oligogalacturonases de certains champignons (D'Ovidio *et al.*, 2004). Les DAMPs peuvent aussi être des peptides initialement synthétisés dans la cellule végétale, qui sont libérés

lorsque les cellules sont endommagées. Par exemple, la systémine chez la tomate, et *Atpep1* chez *Arabidopsis thaliana*, sont tous deux des peptides jouant le rôle de signaux endogènes de stress. Ils sont libérés suite à une blessure ou la perception de MAMP et induisent des réponses de défense à des concentrations très faibles. (Huffaker *et al.*, 2006 ; Boller, 2005).

Les éliciteurs constituent des signaux d'alerte qui ont été naturellement sélectionnés au cours de l'évolution par les plantes. Ils sont devenus des cibles adéquates de récepteurs spécialisées dans leur perception, ce qui déclenche des réponses de défense.

## 2.2. Les PRR

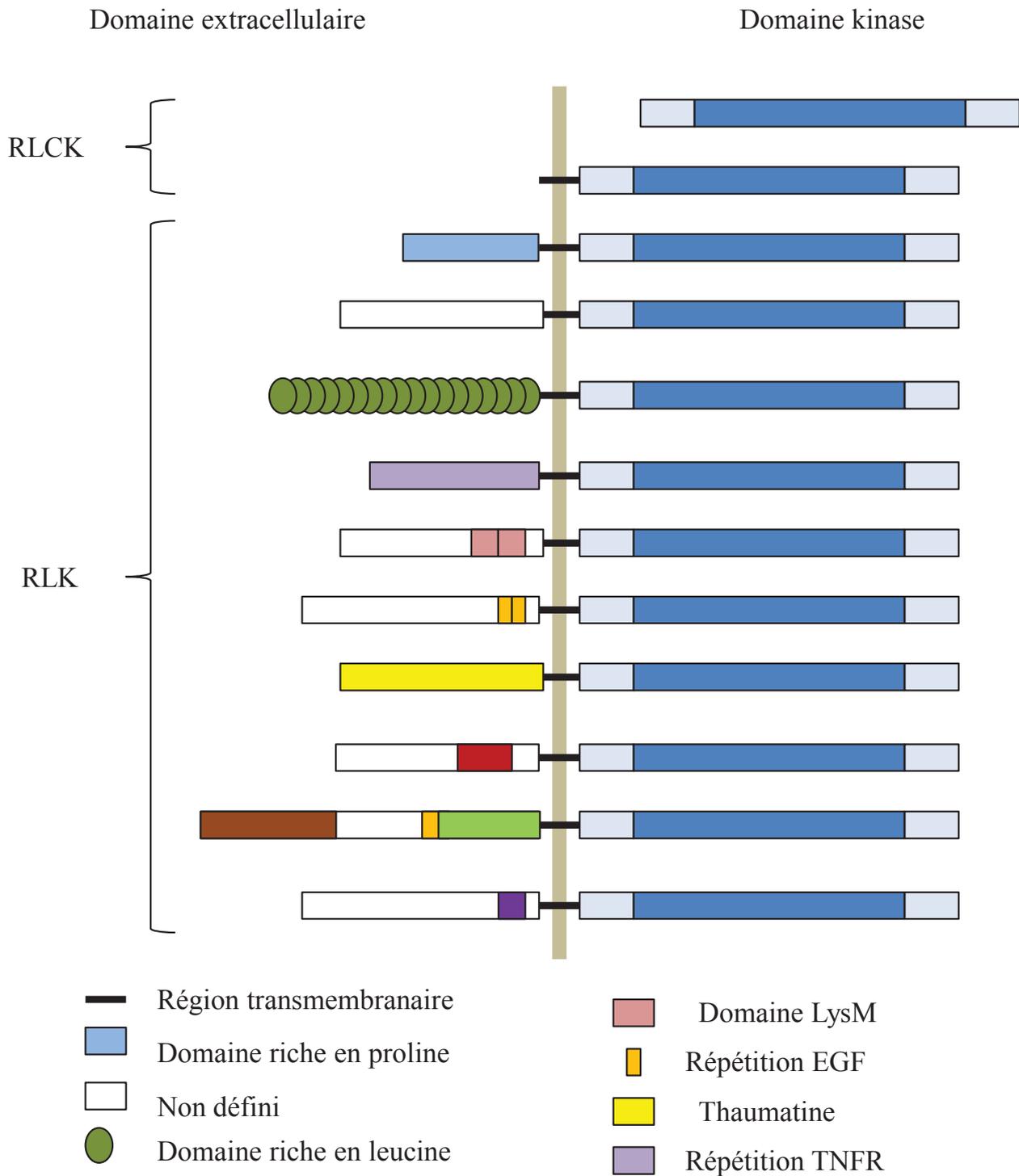
Les éliciteurs sont reconnus par des récepteurs, appelés **PRR**, ancrés dans la membrane plasmique des cellules végétales. Le rôle essentiel des PRR dans l'immunité végétale a été clairement démontré, notamment par la sensibilité accrue de différents mutants de PRR en réponse à des agents pathogènes (Nicaise *et al.*, 2009). A ce jour, la plupart des PRR identifiés sont des protéines de type **RLK** (Receptor Like Kinase) ou **RLP** (Receptor Like Protein).

### 2.2.1. Les RLKs

Chez *A. thaliana*, les RLKs constituent une très grande famille de plus de 600 membres jouant des rôles dans des processus variés comme la croissance, le développement ou la résistance aux maladies. Ils représentent 60% des protéines kinases totales prédites chez *A. thaliana*. Ils ont été classés en 45 sous-familles en se basant sur la séquence codant leur domaine kinase mais aussi sur le type et l'arrangement de leur domaine extracellulaire (Shiu & Bleecker, 2001). Toutefois, la présence ou l'absence du domaine extracellulaire permet de les séparer en deux principales classes.

#### 2.2.1.1. RLKs (avec un domaine extracellulaire)

Environ deux tiers des membres de cette famille de protéines ont une configuration typique de récepteurs transmembranaires. Ils sont appelés RLKs et sont composés d'un domaine extracellulaire, d'une partie transmembranaire et une région sérine/thréonine kinase intracellulaire en position C-terminale. Ces protéines ont un rôle crucial dans la communication des cellules avec leur environnement mais aussi entre cellules. Elles sont impliquées dans des fonctions très variées tant au niveau du développement qu'en réponse à des stress biotiques ou abiotiques (Becraft, 2002 ; Gish & Clark, 2011). Plusieurs sous-



**Figure 5. Schématisation des différentes sous-familles de RLK (D'après Shiu & Bleecker, 2001)**

Les membres de cette famille sont divisés en deux catégories sur la base de la présence ou absence de domaine extracellulaire, : les RLKs et les RLCKs. Les sous-familles sont catégorisées en se basant sur la phylogénie du domaine kinase, et le schéma présenté correspond à l'organisation de la majorité des membres de chaque sous-famille. Le nombre, l'agencement et l'organisation de certains domaines extracellulaires, notamment les domaines LRR, peuvent varier.

DUF, Domain of Unknown Function; EGF, Epidermal Growth Factor; C lectin, C-type Lectin; L-lectin, Legume Lectin; PAN, Plasminogen/Apple/Nematode protein domain; TM, TransMembrane region; TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor

familles de RLK peuvent être distinguées en fonction notamment de leur domaine extracellulaire (Fig. 5) impliqué dans la reconnaissance du ligand. Cette perception constitue un signal conduisant à l'activation de protéines végétales par phosphorylation réalisée grâce au domaine kinase des RLKs (Fig. 5).

Chez *A. thaliana*, les LRR (Leucin Rich Repeat)-RLKs représentent la plus grande sous-famille de RLKs avec plus de 200 membres (Lehti-Shiu *et al.*, 2009). Le domaine LRR est connu pour être impliqué dans des processus de reconnaissance entre protéines (Kobe and Kajava, 2001). Les protéines appartenant à cette sous-famille incluent notamment FLS2 (FLagellin Sensing 2) et EFR (EF-Tu Receptor), qui perçoivent des MAMP (Boller & Felix, 2009), ERECTA (ER) qui spécifie les inflorescences (Shpak *et al.*, 2004), les SERKs (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) qui jouent un rôle dans la reproduction (Albrecht *et al.*, 2005), CLAVATA1 (CLV1) qui régule la taille du méristème apical de la tige et qui fait l'objet de cette thèse (Clark *et al.*, 1997).

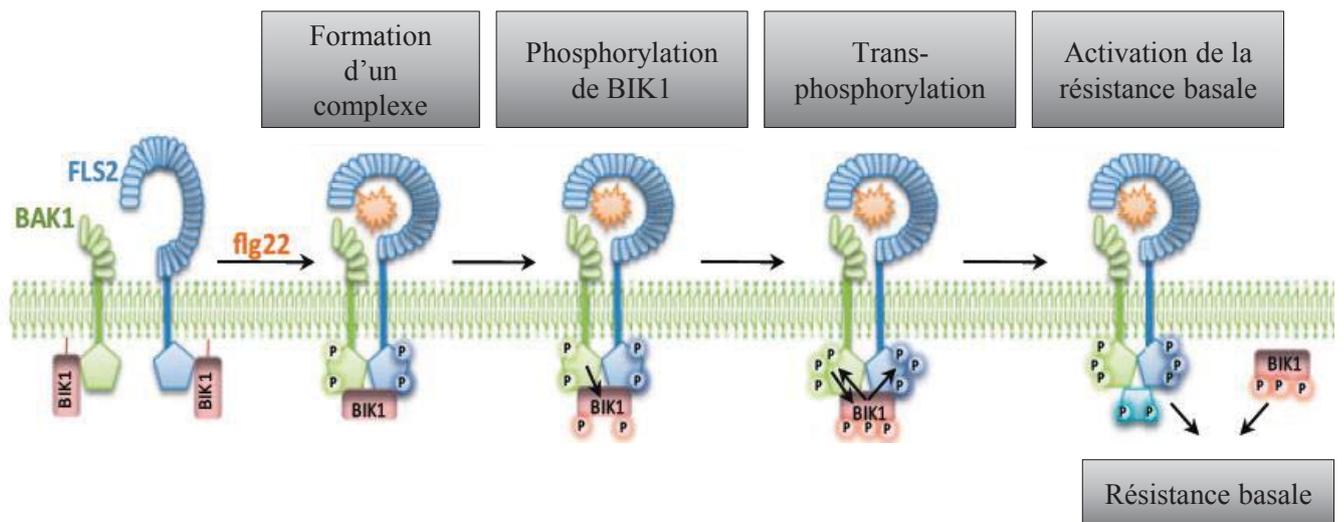
Pour illustrer les rôles biologiques complexes et variés que peuvent avoir les LRR-RLKs, j'ai choisi de présenter deux exemples :

#### - Perception des brassinostéroïdes (BRs)

Les BRs sont des hormones stéroïdes végétales principalement connues pour leur rôle dans de nombreux processus développementaux tels l'architecture, la différenciation vasculaire, la fertilité, la floraison, la sénescence, la photomorphogenèse mais ils sont aussi impliqués dans les réponses aux conditions environnementales des plantes comme les stress biotiques et abiotiques (Kim & Wang, 2010).

BRI1 (Brassinosteroid Insensitive 1), le récepteur des BRs, a été identifié lors d'un crible de mutants insensibles aux BRs (Clouse *et al.*, 1996). Suite à la perception des BRs, ce récepteur s'homodimérise et s'associe avec un autre LRR-RLK appelé BAK1 (BRI1-Associated Kinase 1). La transphosphorylation de leur domaine kinase conduit à l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire qui aboutit à l'induction de gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription appelés BZR (BrassinoZole Resistant) (Kim & Wang, 2010). Au-delà de ce rôle dans la signalisation associée aux BRs, BAK1 constitue également une composante essentielle de la résistance basale, comme nous le verrons ci-dessous.

#### - Perception de la flagelline



**Figure 6. Modèle sur l'implication de BIK1 au cours de la perception de la flagelline** (D'après Lu *et al.*, 2010)

En absence de flagelline (flg22), BIK1 s'associe avec FLS2 et BAK1 dans un état inactif. La liaison de la flagelline à FLS2 induit l'association entre FLS2 et BAK1 ainsi que leur phosphorylation. Cette forme activée de BAK1 phosphoryle BIK1 qui va phosphoryler le complexe FLS2-BAK1 en retour. Le complexe FLS2-BAK1 complètement activé pourra ensuite phosphoryler BIK1 ainsi que d'autres substrats. A ce stade, BIK1 serait relargué du complexe FLS2-BAK1 pour activer les voies de signalisation intracellulaires.

La flagelline est perçue par un certain nombre d'espèces végétales (Felix *et al.*, 1999) et animales (Underhill and Ozinsky, 2002). Alors que les extrémités N- et C-terminales sont très conservées chez les eubactéries, la région centrale de cette protéine est variable. Chez *A. thaliana*, un peptide de 22 acides-aminés, correspondant à la portion la plus conservée de la région N-terminale de la flagelline (**flg22**) est suffisant pour déclencher des réponses de défense de façon aussi efficace que la protéine entière (Felix *et al.*, 1999).

Un crible de mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'effet inhibiteur de flg22 sur la croissance de plantules (Gomez-Gomez *et al.*, 1999) a permis d'identifier **FLS2**, le récepteur de la flagelline (Gomez-Gomez & Boller, 2000). En se liant à flg22, cette protéine de type LRR-RLK induit des réponses de défense capables d'inhiber la croissance bactérienne dans la plante (Zipfel *et al.*, 2004 ; Chinchilla *et al.*, 2006).

La transduction du signal déclenchée suite à la perception de la flagelline par FLS2 nécessite d'autres partenaires protéiques tels que **BAK1** et **BIK1** (Botrytis-Induced Kinase 1), une protéine de type RLCK (cf. partie II.B.2.2.1.2 ci-dessous) (Lu *et al.*, 2010). BAK1 s'associe aussi avec d'autres récepteurs tels que BRI1, le récepteur des BRs, et EFR, le récepteur du MAMP EF-Tu (Chinchilla *et al.*, 2009 ; Schwessinger *et al.*, 2011). BIK1, est impliqué dans la résistance contre *Botrytis cinerea*, un agent pathogène fongique (Veronese *et al.*, 2006).

Après un traitement avec flg22, BAK1 s'associe rapidement avec FLS2, entraînant la transphosphorylation de leur domaine kinase (Schulze *et al.*, 2010). BIK1, qui est associé au domaine kinase de FLS2 et BAK1, est alors activé à son tour par phosphorylation, puis se dissocie du complexe de récepteurs. Il pourra ensuite activer des voies de signalisation en aval (Lu *et al.*, 2010) (Fig. 6). Ces évènements de phosphorylation constituent une étape initiale clé de la transduction du signal dans la cellule suite à la perception de flg22.

La reconnaissance de flg22 déclenche aussi l'internalisation rapide de FLS2 dans des vésicules intracellulaires, ce qui provoque son accumulation dans le cytosol où il serait capable d'activer des composantes de signalisation avant d'être dégradé (Robatzek *et al.*, 2006)

Afin d'éviter une réponse immunitaire trop intense ou trop longue qui serait délétère pour la plante, un contrôle très fin de la signalisation déclenchée par les PRR est essentielle. Une étude très récente a montré que la perception de flg22 entraîne le recrutement au complexe protéique formé par FLS2 et BAK1, de deux E3 Ubiquitine-ligase, PUB12 et PUB13. Elles

sont activées par BAK1 par phosphorylation. PUB12 et PUB13 vont ensuite ubiquitiner FLS2, le conduisant vers la voie de dégradation *via* le protéasome et atténuent ainsi l'activation des réponses de défense (Lu *et al.*, 2011).

De façon intéressante, FLS2 peut reconnaître différents ligands dont la perception déclenche les mêmes voies de signalisation que celle induite par flg22 (Danna *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2011). Parmi ces ligands, il convient de mentionner Ax21, un MAMP sécrété par les bactéries du genre *Xanthomonas* qui déclenche la résistance basale chez le riz grâce au PRR XA21 ainsi que CLAVATA3 (CLV3), un peptide sécrété par les cellules du méristème apical caulinaire (cf. partie V) (Song *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 2009). Les MAMP étant probablement présents à de faibles concentrations, la détection simultanée de plusieurs d'entre eux pourrait renforcer l'intensité des défenses activées. La perception de plusieurs MAMP par un seul PRR permettrait par ailleurs une optimisation du système immunitaire végétal par l'utilisation d'un nombre limité de PRR permettant la perception d'une large gamme de MAMP. Quant à CLV3, sa perception par FLS2 permettrait une activation des défenses au niveau de cet organe essentiel que représente le méristème (Lee *et al.*, 2011).

#### 2.2.1.2. RLCKs

Les RLCKs (Receptor-Like Cytoplasmic Kinases), ne possèdent pas de domaine extracellulaire et ont été regroupés dans la famille des RLKs à cause de la similarité de séquence de leur domaine kinase (Fig. 5) (Shiu & Bleeker, 2001). Ces protéines seraient plutôt impliquées dans l'étape de transduction du signal (Lu *et al.*, 2009). Malgré leur nombre important (environ un tiers des membres de la famille des RLKs), leur fonction biologique est beaucoup moins connue. Les quelques RLCKs caractérisés à ce jour jouent un rôle dans les réponses immunitaires. Par exemple, la protéine CaPIK1 est induite chez le poivron (*Capsicum annuum*) en réponse à la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. La surexpression de ce gène chez *A. thaliana* entraîne un accroissement de la résistance face à la bactérie *Pseudomonas syringae* et à l'oomycete *Hyaloperonospora parasitica*, résistance associée à l'augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et de SA (Salicylic Acid) (Kim & Hwang, 2011).

#### 2.2.2. Les RLPs

Les protéines de type RLP sont des récepteurs présents à la surface des cellules végétales et constituent chez *A. thaliana* une famille d'environ 60 membres. Ils sont composés d'un

Plante / Agent pathogène	<i>R</i>	<i>r</i>
<i>Avr</i>	Résistance/HR	Maladie
<i>avr</i>	Maladie	Maladie

**Figure 7. Modèle génétique de la relation « gène pour gène ».**

La résistance de la plante, souvent associé à la HR, ne s'établit que si la plante possède un gène *R* correspondant à un gène *Avr* de l'agent pathogène. Dans tous les autres cas, la maladie se met en place (Flor, 1971)

domaine LRR extracellulaire, d'une région transmembranaire et diffèrent des RLKs par l'absence de domaine kinase intracellulaire. Cette famille de protéines joue aussi des rôles variés dans le développement et la résistance aux maladies. Chez *A. thaliana*, seule la fonction biologique de quelques RLPs a été démontrée dans un contexte développemental. La protéine TMM (Too Many Mouths) régule la distribution des stomates dans l'épiderme (Nadeau and Sack, 2002) mais son mode d'action n'est pas encore connu. CLAVATA2 (CLV2), quant à lui, joue un rôle dans le développement du méristème apical caulinaire. CLV2 perçoit le peptide CLV3 et est associé avec un autre RLK, CORYNE (CRN), probablement pour relayer le signal à l'intérieur de la cellule (Bleckmann *et al.*, 2010, Zhu *et al.*, 2010). Cet exemple sera détaillé dans la partie V.

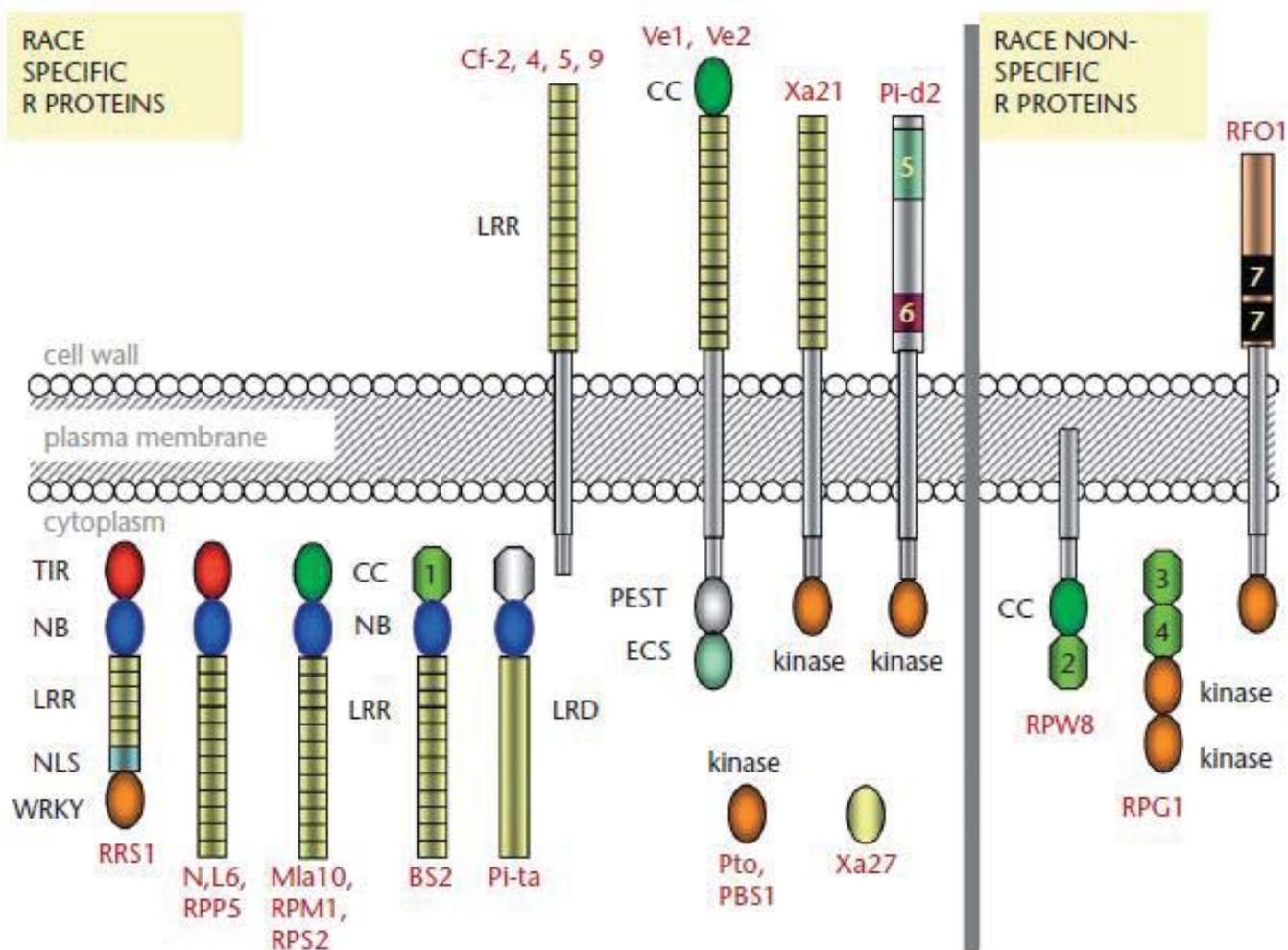
Les RLPs jouent aussi un rôle important dans la mise en place des réponses de défense tant au niveau de la résistance basale, qu'au niveau de la résistance spécifique comme nous le verrons ci-dessous.

### **3. Les acteurs de la résistance spécifique (ETI)**

La résistance spécifique repose sur la capacité de reconnaissance de certains effecteurs, appelés dans ce contexte facteurs d'avirulence, par les protéines de résistance végétales (R). Le modèle « gène pour gène » (Flor, 1971) propose que la résistance soit contrôlée par la présence simultanée d'une paire de gènes correspondants, le gène de résistance (**R**) de la plante et le gène d'avirulence de l'agent pathogène (**Avr**). L'absence d'un des deux partenaires (ou de la fonctionnalité) du couple R/Avr résulte dans le développement de la maladie (Fig. 7).

#### **3.1. Les effecteurs, facteurs de virulence ou d'avirulence**

Les effecteurs sont des molécules produites par les agents pathogènes afin de manipuler certaines fonctions de l'hôte et générer un environnement qui leur est favorable. Ceci passe notamment par la suppression de la résistance basale et dans ce contexte, les effecteurs sont appelés facteurs de virulence puisqu'ils contribuent à l'établissement de la maladie. Cet aspect sera approfondi dans le chapitre III. Du fait de leur rôle primordial dans le succès de l'infection, les effecteurs et leurs cibles semblent conservés chez les agents pathogènes. Cette caractéristique a été mise à profit par les plantes au cours de l'évolution, afin de créer une deuxième ligne de défense qui surveille la présence d'effecteurs ou les changements qu'ils entraînent. Dans ce contexte, les effecteurs sont appelés facteurs d'avirulence, leur



**Figure 8. Différentes classes de protéines R et leur localisation subcellulaire** (Hammond-Kosack & Kanyuka, 2007).

TIR : Toll and Interleukin 1 receptor-like motif; CC: coiled-coil; NB: nucleotide binding site; LRD: leucine rich domain; LRR: leucine-rich repeat; NLS: nuclear localisation signal; ECS: endocytosis signal; PEST: séquence Pro-Glu-Ser-Thr; WRKY: motif caractéristique de certains facteurs de transcription de plantes; 1, 2, 3, 4, 5: domaines sans homologies connue; Ve1: domaine CC putatif en N-term mais pas de séquence PEST en C-term, Ve2: pas de domaine CC en N-term mais une séquence PEST en C-term

reconnaissance directe ou non par les protéines R végétales conduisant à la mise en place de la résistance spécifique.

### 3.2. Les protéines R, récepteurs de la résistance spécifique

De nombreuses protéines R conférant la résistance contre des espèces diverses d'agents pathogènes ont été isolées au cours des dernières années (Fig. 8). Elles présentent une structure modulaire très conservée, quelque soit la nature de l'agent pathogène perçu et de l'espèce végétale. Elles sont divisées en deux grandes catégories.

#### 3.2.1. Les protéines R intracellulaires

La majorité des protéines R connues sont des protéines intracellulaires de type **NB-LRR** (Nucleotide-Binding-Leucine Rich Repeat) qui comprennent près de 150 membres chez *A. thaliana*. Le domaine NB serait nécessaire à l'activation des protéines R en se liant à des molécules d'ATP (Lukasik and Takken, 2009). Le domaine LRR, quant à lui, est impliqué dans les interactions protéine-protéine et semble être un des déterminants majeurs de la spécificité de reconnaissance des facteurs d'avirulence (Padmanabhan *et al.*, 2009). Les protéines R de type NB-LRR varient dans leur domaine N-terminal (Meyers *et al.*, 2003). On distingue les protéines de type **TIR-NB-LRR** comprenant un domaine **TIR** (Toll Interleukin-1 Receptor) qui est aussi impliqué dans les interactions entre protéines. Il fait référence au domaine intracellulaire de signalisation des récepteurs Toll-like des animaux (Akira & Hemmi, 2003). Les **CC-NB-LRR** sont quant à elles composées d'un domaine N-terminal **CC** (Coiled-Coil) impliqué dans les interactions protéine-protéine.

Le rôle de ces extrémités N-terminales variables commence à être mieux compris notamment grâce à l'étude de la structure des domaines CC de MLA10 et TIR de L6, deux protéines R de l'orge et du lin respectivement. Il a été montré que chacun de ces domaines est capable de déclencher, de manière autonome, des voies de signalisation de défense *in planta* et d'entraîner la formation d'homodimères. En perturbant l'homodimérisation de ces domaines, l'activation des voies de signalisation de défense est altérée (Maekawa *et al.*, 2011 ; Bernoux *et al.*, 2011a).

Le trafic nucléo-cytoplasmique des protéines R joue un rôle important dans l'établissement de la résistance (Garcia & Parker, 2009 ; Deslandes & Rivas, 2011 ; Meier & Somers, 2011). En effet, certaines protéines R sont présentes aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau, mais leur accumulation nucléaire est requise pour induire les réponses de défense (Bernoux *et*

*al.*, 2011b). La protéine MLA10 de l'orge par exemple, est relocalisée dans le noyau en présence de l'effecteur correspondant Avr10 de *Phytophthora infestans*, et s'associe avec des facteurs de transcription pour activer les réponses de défense (Shen *et al.*, 2007). D'autres protéines R activent les réponses de défense à partir du cytosol, et l'équilibre entre les quantités de protéines dans le cytosol et le noyau sont importantes pour réguler cette activité. C'est le cas de la protéine Rx de la pomme de terre dont l'activité est inhibée par la rétention dans le noyau, tandis qu'elle est activée lorsqu'elle s'accumule dans le cytoplasme (Slootweg *et al.*, 2010 ; Tameling *et al.*, 2010).

### 3.2.2. Les protéines R extracellulaires

La deuxième grande classe de protéines de résistance est représentée principalement par des protéines de type RLP. C'est par exemple le cas des protéines Cf de la tomate qui confèrent la résistance au champignon *Cladosporium fulvum* (Rivas & Thomas, 2005). Ces protéines sont capables de percevoir certains effecteurs de ce champignon (Avr2, Avr4 et Avr9) qui sont sécrétés dans l'apoplaste (Shabab *et al.*, 2008).

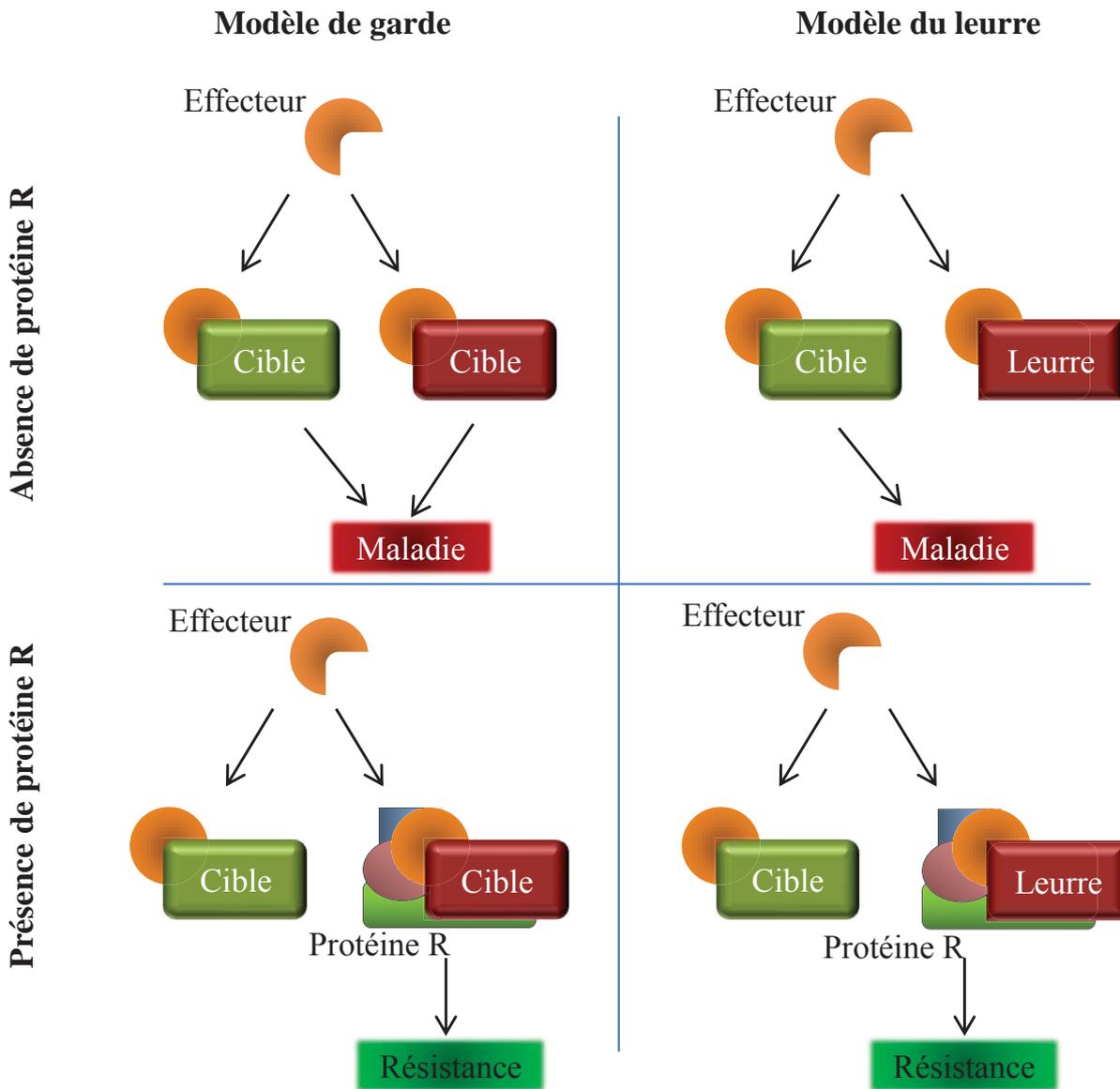
### 3.2.3. Les protéines R de structure atypique

Il existe cependant des protéines de résistance de structure atypique comme par exemple RPW8.1 et RPW81.2. Ces deux protéines possèdent un domaine CC et un domaine transmembranaire en C-terminal qui pourrait intervenir dans la reconnaissance d'un facteur d'avirulence. Elles confèrent chez *A. thaliana* la résistance contre plusieurs champignons du genre *Erysiphe* (Xiao *et al.*, 2003 & 2005). Pi-d2, une protéine de type RLK avec un domaine de liaison à la lectine confère, quant à elle, la résistance contre le champignon *Magnaporthe grisea* chez le riz (Chen *et al.*, 2006).

## 3.3. La reconnaissance R/Avr

### 3.3.1. Le modèle ligand récepteur

Ce modèle propose une association physique directe entre la protéine R de la plante et le facteur d'avirulence de l'agent pathogène. Ainsi, l'interaction directe entre Pi-ta, une protéine R de type CC-NB-LRR du riz avec l'effecteur Avr-Pita de *M. grisea* confère la résistance à ce champignon (Jia *et al.*, 2000). Cette interaction est abolie par des mutations dans le domaine LRR de Pi-ta, ce qui entraîne une perte de la résistance. L'interaction physique directe entre les deux partenaires R/Avr n'a toutefois pu être mise en évidence que dans quelques cas : les protéines L5, L6, L7 et M du lin, avec respectivement les protéines AvrL567 et AvrM du champignon *Melampsora lini* (Dodds *et al.*, 2006 ; Catanzariti *et al.*, 2010) ; la protéine RPP1



**Figure 9. Comparaison du modèle de garde et du modèle du leurre**

- (a) Dans le modèle de garde, la modification de cibles végétales par un effecteur contribue à la virulence de l'agent pathogène et conduit à la maladie. Cependant, chez une plante qui possède une protéine R gardant une des protéines cibles, la modification de cette (ces) cible(s) par l'effecteur est détectée par la protéine R et déclenche la résistance.
- (b) Selon le modèle du leurre, l'altération du leurre par l'effecteur ne participe pas à sa virulence. Dans une plante qui possède une protéine R gardant le leurre, la modification du leurre déclenche la résistance. (Le leurre est donc une cible de l'effecteur nécessaire au fonctionnement de la protéine R mais sans fonction dans les défenses ou la sensibilité végétale en absence de la protéine R correspondante.)

et RRS1 d'*A. thaliana* avec les effecteurs ATR1 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* et PopP2 de *Ralstonia solanacearum*, respectivement (Krasileva *et al.*, 2010 ; Deslandes *et al.*, 2003).

D'autres modèles ont été alors proposés pour expliquer la relation « gène pour gène » en absence d'interaction physique R/Avr.

### 3.3.2. *Le modèle de garde*

Dans le modèle dit « de garde », la modification par le facteur d'avirulence d'une protéine végétale entraîne l'activation de la protéine R (Fig. 9). Ce modèle a également permis d'expliquer pourquoi différents facteurs d'avirulence, qui ciblent la même protéine végétale, déclenchent les réponses de défenses *via* un nombre limité de protéines R.

Le ciblage de la protéine RIN4, un régulateur négatif des réponses de défenses par différents effecteurs en est une illustration. Cette protéine est la cible d'au moins trois effecteurs de *P. syringae* (AvrRpm1, AvrB et AvrRpt2). RIN4 est « gardée » par 2 protéines R de type CC-NB-LRR, RPM1 et RPS2. L'interaction de RIN4 avec les effecteurs aboutit soit à sa phosphorylation qui active RPM1, soit à sa dégradation qui libère RPS2 du complexe activant la résistance (Axtell and Staskawicz, 2003 ; Mackey *et al.*, 2003).

### 3.3.3. *Le modèle du leurre*

Ce mode de reconnaissance est une variante du modèle de garde dans lequel l'agent pathogène cible une composante végétale qui mime une autre protéine de la plante agissant ainsi tel un leurre (Fig. 9).

Ce modèle est illustré par les protéines Pto/Prf de la tomate et l'effecteur AvrPto de *Pseudomonas*. AvrPto cible le domaine kinase de certains PRR tels FLS2 afin d'empêcher leur activation (Xiang *et al.*, 2008). La protéine kinase Pto mimerait le domaine kinase des PRR pour détourner AvrPto de sa fonction première et cette liaison déclencherait les réponses de défense *via* la protéine R Prf .

Ce modèle et le modèle de garde sont très similaires et difficiles à distinguer (Van der Hoorn and Kamoun, 2008). Le modèle du leurre ouvre néanmoins de nouvelles perspectives pour la compréhension des stratégies mises en place par les plantes pour lutter contre les agents pathogènes.

## 4. Distinction résistance basale et spécifique

Les principaux acteurs de l'étape de perception menant à la mise en place des réponses de défense chez les plantes ont été présentés ici de manière succincte et schématique. Toutefois il existe de nombreux exemples qui suggèrent que la distinction entre les résistances basales et spécifiques est assez floue.

#### 4.1. MAMP ou effecteurs

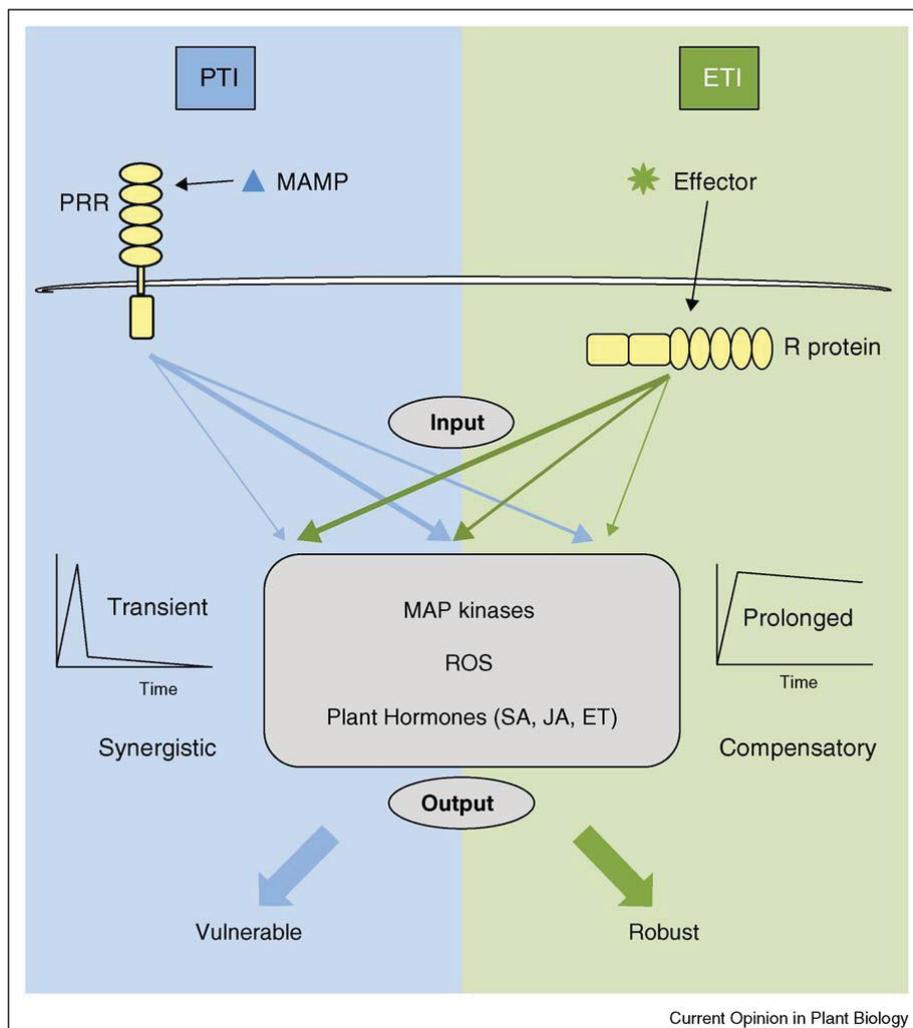
Les MAMP ont été définis comme des molécules très conservées que l'on retrouve donc chez les microorganismes appartenant à une même famille. Toutefois, certains MAMP sont peu conservés. C'est le cas de Pep-13, un fragment de surface d'une transglutaminase qui n'est conservé que chez les champignons appartenant aux espèces *Phytophthora*, mais qui est capable d'induire les réponses de défense chez de nombreuses espèces végétales (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Brunner *et al.*, 2002). De plus, même s'ils sont très largement répandus au sein d'une famille de microorganismes, certains MAMP ne sont reconnus que par un spectre d'hôtes restreint. EF-Tu par exemple, n'est perçu que par les plantes de la famille des crucifères (Zipfel *et al.*, 2006).

Par ailleurs, certaines protéines initialement définies en tant qu'effecteurs, ne sont pas forcément spécifiques d'une souche ou espèce de microorganisme. Il a été montré récemment que les effecteurs possédant des domaines LysM (Lysin Motif), capables de lier des oligosaccharides de chitine, sont très largement répandus chez les champignons (De Jonge & Thomma, 2009). Du point de vue de leur distribution, les effecteurs LysM devraient donc plutôt rentrer dans la classe des MAMP.

#### 4.2. PRR ou protéines R

Les PRR sont considérés comme des récepteurs relativement anciens car ils sont retrouvés dans de nombreuses familles végétales. C'est le cas par exemple des homologues du récepteur de la chitine trouvés à la fois chez le riz et *A. thaliana* (Kaku *et al.*, 2006 ; Miya *et al.*, 2007) ou des homologues de FLS2 retrouvés dans de nombreuses espèces végétales (Boller & Felix, 2009). Pourtant, FLS2 semble avoir subi des modifications évolutives récentes. En effet, une version plus courte de flg22, appelé flg15, est actif chez la tomate mais pas chez *A. thaliana* et le tabac, ce qui confère une certaine spécificité à cet éliciteur (Robatzek *et al.*, 2007).

Les protéines R sont, quant à elles, par définition des récepteurs évoluant rapidement et capables de reconnaître des effecteurs spécifiques de races particulières de microorganismes pathogènes. Néanmoins, certaines protéines R telles Cf-4 chez la tomate sont non seulement capables de percevoir la protéine Avr correspondante du champignon *C. fulvum*, en



**Figure 10. Comparaison des voies de défense activées en cas de perception d'un MAMP ou d'une protéine d'avirulence par la plante (Tsuda & Katagiri, 2010).**

l'occurrence Avr4, mais aussi des orthologues de cette dernière présents chez d'autres champignons phytopathogènes (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

## 5. Les voies de signalisation menant à la résistance

Suite à la perception d'un agent pathogène, des mécanismes similaires semblent être à l'origine de la mise en place de la résistance basale ou de la résistance spécifique (Navarro *et al.*, 2004 ; Desender *et al.*, 2007). Cependant, les réponses induites au cours de l'établissement de la résistance spécifique sont généralement plus intenses et plus durables que celles mises en place dans le cas de la résistance basale (Fig. 10). Par ailleurs, des études transcriptomiques ont montré que différents MAMP et divers effecteurs affectent respectivement une gamme de gènes similaires (Tao *et al.*, 2003 ; Zipfel *et al.*, 2006 ; Gust *et al.*, 2007).

Divers changements physiologiques accompagnent la perception d'un agent pathogène.

### 5.1. Les flux ioniques

Suite à la reconnaissance d'un microorganisme pathogène, des changements de flux ioniques sont observés, constituant une des réponses les plus précoces de la plante. Un efflux de potassium (K<sup>+</sup>) et des influx de protons (H<sup>+</sup>) et de calcium (Ca<sup>2+</sup>) qui s'accumulent dans le cytoplasme en font partie. Les ions Ca<sup>2+</sup> intracellulaires peuvent alors jouer le rôle de seconds messagers pour diriger l'ouverture de canaux membranaires ou activer des protéines kinases dépendantes du calcium appelées CDPK (Calcium-Dependent Protein Kinases) dont le rôle dans la défense basale a récemment été démontré (Boudsocq *et al.*, 2010). La signalisation régulée par les ions calciques stimule également la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS.

### 5.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des dérivés hautement réactifs de l'oxygène contenant des électrons non appariés. Elles sont continuellement produites par les cellules végétales et interviennent comme molécules signal dans de nombreuses voies métaboliques. Leur production rapide et forte dans une cellule attaquée par un agent pathogène constitue ce qu'on appelle le « **burst oxydatif** ». Chez *A. thaliana*, les ROS responsables du « burst oxydatif » sont produites principalement par la NADPH oxidase, AtRbohD (Zhang *et al.*, 2007). Ces composés sont multifonctionnels puisqu'elles peuvent agir directement en tant que composés antimicrobiens ou contribuer indirectement à la défense par exemple en renforçant la paroi végétale. De plus,

les ROS peuvent également contribuer à l'activation rapide d'une batterie de gènes de défense dans la cellule infectée et les cellules avoisinantes, illustrant l'importance de ces molécules lors de l'interaction de la plante avec un agent pathogène (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Torres *et al.*, 2006).

### 5.3. La signalisation par les MAPKs

La perception d'un microorganisme pathogène par la plante entraîne également l'activation de **MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinases). Ces protéines, relativement nombreuses chez les plantes, font probablement partie de voies de signalisation privilégiées lors de stress, notamment suite à la perception de MAMP (Nuhse *et al.*, 2000 ; Nakagami *et al.*, 2005). Ces protéines agissent en cascade par l'activation successive de différentes MAPKs qui régulent l'activité de certains facteurs de transcription ou d'autres protéines kinases (Pedley and Martin, 2005 ; Pitzschke *et al.*, 2009).

### 5.4. Reprogrammation transcriptionnelle

La transduction du signal conduit à des changements d'expression de gènes de défense grâce à certains facteurs de transcription. Certains d'entre eux appartiennent aux familles ERF/AP2 (Ethylen Responsive Factor/APetala2) (Fujimoto *et al.*, 2000 ; Onate-Sanchez & Singh, 2002 ; Ohta *et al.*, 2001 ; Broekert *et al.*, 2006), MYB (Sugimoto *et al.*, 2000 ; Stracke *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2001), TGA (Kim & Delaney, 2002 ; Subramaniam *et al.*, 2001 ; Fan & Dong, 2002) et WRKY (Pandey & Somssich, 2009).

La perception de flg22 ou d'oligogalacturonides par exemple, permet l'activation rapide (60 minutes) de plus de 1500 gènes chez *A. thaliana* dont beaucoup sont communs aux deux éliciteurs (Denoux *et al.*, 2008). Afin d'induire cette reprogrammation génétique, une régulation transcriptionnelle fine est nécessaire. Les facteurs de transcription WRKY par exemple, sont activés dès les premières étapes de l'infection et régulent l'expression de gènes tant négativement que positivement (Pandey & Somssich, 2009). Parmi les 74 membres de la famille WRKY, 43 sont dérégulés en réponse à *P. syringae* et au SA (Fan & Dong, 2002 ; Ulker & Somssich, 2004). Les facteurs de transcription WRKY contribuent notamment à la mise en place des réponses de défense en activant l'expression des gènes *PR* (Pathogenesis-related) qui pour certains, possèdent des propriétés antimicrobiennes.

## 6. Défenses mises en place

Ces voies de signalisation et la reprogrammation transcriptionnelle qu'elles entraînent, conduisent à la mise en place de différents types de défense.

Pour limiter l'infection, les plantes modifient et renforcent leur paroi en synthétisant de nouvelles molécules. La perception de différents MAMP entraîne la formation de dépôts de callose (Gomez-Gomez & Boller, 2000 ; Kunze *et al.*, 2004 ; Iritri & Faoro, 2009), jouant un rôle déterminant dans la résistance contre différents agents pathogènes (Brown *et al.*, 1998). L'accumulation de lignine constitue aussi un mécanisme de résistance qui rend les cellules végétales plus résistantes à la pression mécanique exercée sur les parois par certains champignons pathogènes (Vance *et al.*, 1980 ; Nicholson & Hammerschmidt, 1992 ; Bhuiyan *et al.*, 2009). Une corrélation entre la lignification et la résistance a pu être établie dans de nombreux cas (Soylu, 2006).

Les plantes synthétisent également des molécules aux propriétés antimicrobiennes telles certaines PRs (Van Loon *et al.*, 2006) ou des molécules de faible poids moléculaire dérivés du métabolisme secondaire appelées phytoalexines (Ahuja *et al.*, 2011).

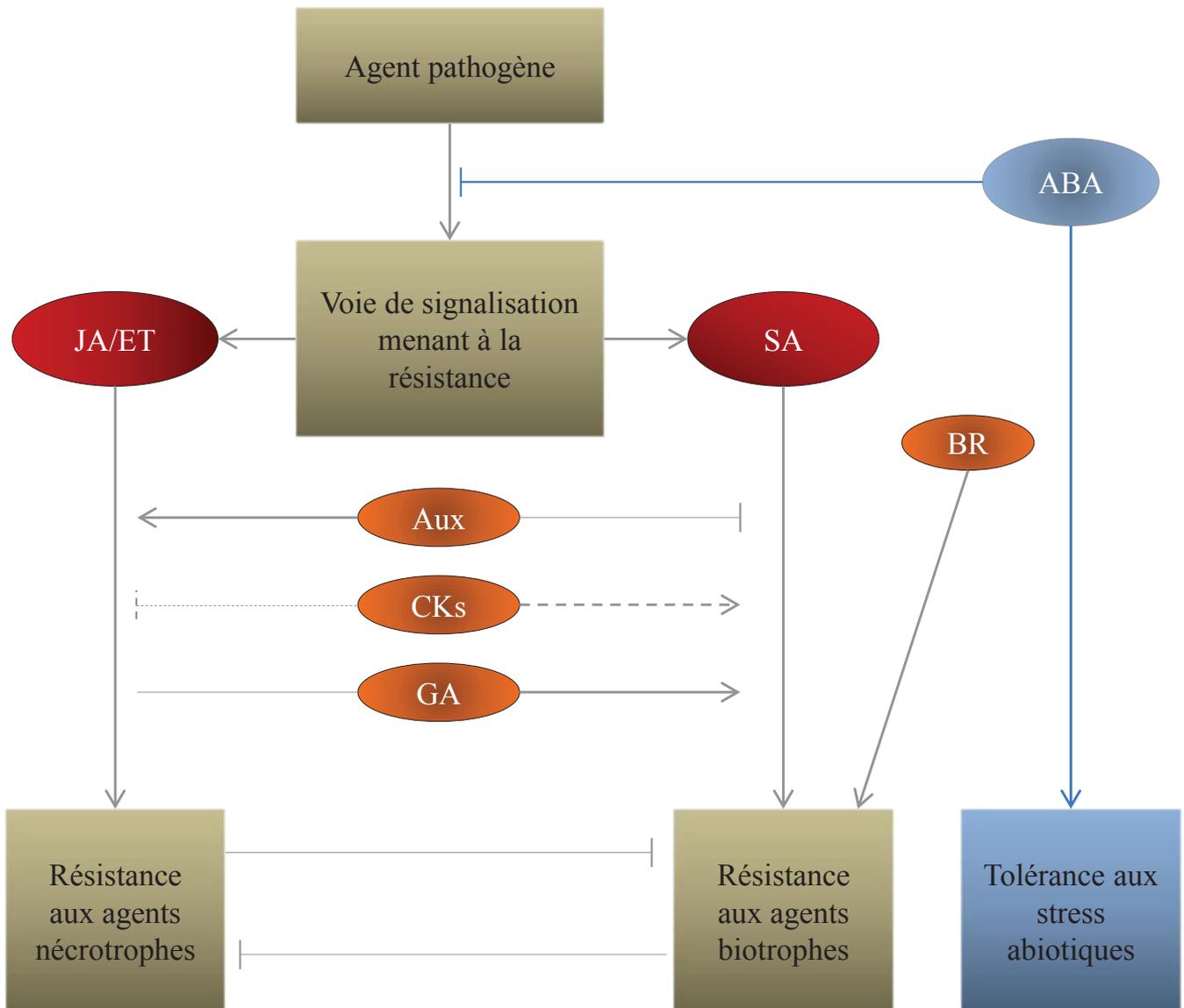
La mise en place de la HR, mort cellulaire localisée au niveau du site d'infection, fait aussi partie des défenses mises en place principalement dans la cadre de la résistance spécifique et permet d'empêcher la propagation des agents pathogènes (Mur *et al.*, 2008).

L'objectif de la plante est de consolider ses barrières structurales pour limiter l'infection, et de dégrader certains constituants des agents pathogènes. Ces mécanismes sont souvent la conséquence de changements dans l'équilibre hormonal de la plante tant localement qu'au niveau de la plante entière.

## 7. Rôle des hormones

Les hormones régulent des processus très variés chez les plantes tels que la croissance et la morphogenèse ainsi que les réponses à de nombreux stress abiotiques ou biotiques.

Certaines d'entre elles sont des régulateurs majeurs des voies de défense : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). D'autres hormones, plus traditionnellement étudiées pour leur rôle dans le développement et/ou les stress abiotiques, ont été plus récemment étudiées dans le contexte des interactions plantes-pathogènes : l'acide abscissique (ABA), l'auxine (AIA), les cytokinines (CK), les gibberellines (GA) et les brassinostéroïdes (BR). Une régulation fine de ces hormones est établie suite à la perception d'un agent



**Figure 11. Modèle d'interaction potentielle entre les différentes voies hormonales au cours des interactions plantes-agents pathogènes (d'après Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007)**

pathogène et permet la mise en place des réponses de défense. Ces différentes voies hormonales sont interconnectées et le réseau qu'elles constituent est très complexe (Fig. 11).

### 7.1. Voie de signalisation dépendante du SA

Le SA est synthétisé par les plantes en réponse à différents agents pathogènes et conduit à l'accumulation de certaines protéines PR ayant des propriétés antimicrobiennes. Des mutants incapables de produire du SA présentent en effet une sensibilité accrue vis-à-vis de certains agents pathogènes (Tsuda *et al.*, 2008 ; Vlot *et al.*, 2009).

En réponse au SA, de nombreux facteurs de transcription sont activés notamment grâce à certains gènes régulateurs centraux tel *NPR1* (Nonexpressor of PR genes 1). Ce gène code pour une protéine à répétitions ankyrine dont la synthèse est induite par le SA et active les défenses en aval de la perception de cette hormone (Cao *et al.*, 1997 ; Durrant & Dong, 2004 ; Loake & Grant, 2007).

Le SA peut être aussi modifiée par méthylation en cas d'attaque pathogène, formant ainsi un ester volatile, le méthyl salicylate qui entraîne la synthèse de protéines PR1 chez des plantes voisines (Loake & Grant, 2007).

L'infection de certains agents pathogènes induit une résistance systémique appelée SAR (Systemic Acquired Resistance). La SAR procure à la plante entière une protection contre un large spectre d'agents pathogènes lors d'une infection ultérieure (Sticher *et al.*, 1997 ; Van Loon *et al.*, 1997). Elle est activée suite à la perception d'un agent pathogène localement que ce soit dans le cas de la résistance basale que dans celui de la résistance spécifique. Chez *A. thaliana*, l'induction de la SAR nécessite la production locale d'un signal mobil qui déclenchera la synthèse systémique de SA (Jung *et al.*, 2009 ; Vlot *et al.*, 2008). Cette accumulation systémique de SA entraîne la synthèse de certaines protéines PRs ayant des propriétés antimicrobiennes. Cette forme de résistance est généralement associée à la résistance contre les agents pathogènes biotrophes.

### 7.2. Voie de signalisation dépendante de l'ET et du JA

L'ET intervient dans de nombreux processus biologiques comme la maturation du fruit, la germination, la sénescence des fleurs et des feuilles, ou encore l'abscission. Chez *A. thaliana*, 5 récepteurs de l'éthylène ont été identifiés : ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 et ERS2 (Hua *et al.*, 1995 ; Sakai *et al.*, 1998). Suite à la perception de l'ET, le gène *EIN2* (Ethylen INsensitive 2) est induit et entraîne une cascade de signalisation aboutissant au facteur de transcription

EIN3 (Shibuya *et al.*, 2004 ; Broekaert *et al.*, 2006). Ce dernier active d'autres facteurs de transcription de la famille ERF (Ethylene Response Factor) pour induire des gènes impliqués dans la défense tels *PR3*, *PR4* et *PDF1.2* (Plant Defensin 1.2).

L'ET possède des rôles complexes qui diffèrent selon les pathosystèmes. Le mutant *ein2* par exemple est plus résistant à certains agents pathogènes biotrophes mais il est plus sensible à certains agents pathogènes nécrotrophes (Shibuya *et al.*, 2004 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

Le JA joue des rôles importants le développement et les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Suite à une infection par de nombreux agents pathogènes, une production de JA est induite, suivie de l'activation de gènes marqueurs tel *PDF1.2* ou *VSP1* (Glazebrook, 2005 ; Norman-Setterblad *et al.*, 2000)

Un autre type de résistance systémique existe, l'ISR, (Induced Systemic Resistance) qui est déclenchée suite à la colonisation racinaire de la plante par certaines souches de bactéries non-pathogènes (Van Loon 2002), est dépendante de l'ET et du JA (Heil & Bostock, 2002). L'ISR est généralement associée à la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes.

### 7.3. Voie de signalisation dépendante de l'AIA

L'AIA exerce non seulement de nombreuses fonctions dans la croissance des plantes, mais aussi en réponse aux agents pathogènes. Les mécanismes d'action de cette hormone dans les stress biotiques demeurent toutefois peu connus. Dans ce contexte, les voies de signalisation de l'AIA agissent principalement de manière antagoniste avec celles du SA. En effet, l'activation des voies associées à l'AIA est corrélée à une sensibilité accrue envers les agents pathogènes biotrophes ainsi qu'à une diminution de la biosynthèse de SA (Navarro *et al.*, 2008). Par exemple, l'apport exogène d'auxine supprime l'expression de *PRI*, un gène fortement induit par le SA (Park *et al.*, 2007 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

### 7.4. Voie de signalisation dépendante des CKs

Les CKs sont des phytohormones très importantes pour la régulation de la croissance des organes racinaires et aériens. Un système à deux composants, similaire à celui retrouvé chez de nombreuses bactéries et champignons (To & Kieber, 2008), permet d'activer la signalisation des CKs suite à leur perception. La liaison des CKs à leur récepteur, les protéines histidines kinase AHK2/3/4, entraîne leur autophosphorylation (Murphy *et al.*,

1997 ; To & Kieber, 2008) déclenchant une cascade de phosphorylation qui active les facteurs de transcription appelés ARR (*A. thaliana* Response Regulator) (To *et al.*, 2007).

Le rôle des CKs dans les interactions plantes microorganismes pathogènes est encore très fragmentaire. Chez *A. thaliana*, la voie de signalisation des CKs semble liée à celle du SA. En effet, la teneur élevée en CKs de certains mutants ou certaines plantes transgéniques s'accompagne d'une résistance accrue à *P. syringae* associée à une augmentation de la biosynthèse de SA (Choi *et al.*, 2010 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a).

#### 7.5. Voie de signalisation dépendante de l'ABA

L'ABA joue un rôle clé dans les stress abiotiques, notamment dans l'adaptation à la sécheresse, au froid et à la salinité ainsi que dans certains processus développementaux. Cette hormone a récemment émergé comme un déterminant majeur dans l'adaptation aux stress biotiques et peut avoir un effet positif comme négatif sur la résistance.

Chez *A. thaliana*, l'apport exogène d'ABA limite l'accumulation de lignine et de protéines PR1 lors de l'interaction avec la bactérie *P. syringae* (Audenaert *et al.*, 2002 ; Thaler *et al.*, 2004). L'infection par cette bactérie entraîne l'augmentation de la biosynthèse d'ABA de la plante pendant la maladie. Dans ce contexte, l'ABA pourrait donc agir comme un facteur de compatibilité en régulant négativement les voies de signalisation du SA. En effet, des mutants de tomate déficients dans la biosynthèse d'ABA présentent une résistance accrue contre *P. syringae*

qui est corrélée avec l'activation de la voie de signalisation du SA (Mauch-Mani *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'ABA peut influencer positivement la mise en place de la résistance contre des agents pathogènes nécrotrophes en agissant de concert avec le JA (Mengiste *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que l'ABA peut aussi interférer avec les voies de l'ET. Ainsi, les mutants *ein2* produisent plus d'ABA (Ghassemian *et al.*, 2000). L'insensibilité à l'ET et/ou l'accumulation d'ABA rend les plantes plus sensibles à certains agents pathogènes tels le champignon *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004).

En interagissant avec les principales phytohormones liées à la défense, l'ABA pourrait jouer un rôle de modulateur entre les stress biotiques et abiotiques. (Cao *et al.*, 2011).

## **8. Résistance et Sensibilité**

Les réponses des plantes aux agents pathogènes font partie d'un continuum allant d'une résistance complète à une sensibilité totale. La reprogrammation transcriptionnelle de la plante qui s'opère au cours des phases précoces d'une interaction incompatible recoupe largement celle observée lors d'évènements plus tardifs d'une interaction compatible. Des composantes communes présentant toutefois des différences d'expression spatio-temporelles seraient donc impliquées dans les 2 types d'interaction (Tao *et al.*, 2003 ; Huibers *et al.*, 2009). La généralisation de ce constat nécessite toutefois d'autres études utilisant des gammes d'agents pathogènes plus larges, la plupart des travaux ayant été réalisés sur un nombre restreint de systèmes modèles.

## **PARTIE III : LES MECANISMES DE SENSIBILITE**

### **A. Introduction**

L'intérêt apporté aux mécanismes gouvernant la résistance des plantes aux agents pathogènes a conduit à l'identification de composantes clés telles que les gènes de résistance, d'avirulence et de façon plus générale, à une meilleure compréhension des mécanismes de défense. Ce n'est que plus récemment que des travaux sur la sensibilité/compatibilité ont été entrepris et révèlent la grande diversité des gènes et fonctions physiologiques associés à ce processus.

Les agents pathogènes emploient différentes stratégies pour envahir et coloniser la plante hôte. Ils perturbent la mise en place de mécanismes de défense et modifient la physiologie de la plante, par exemple en perturbant l'équilibre hormonal afin de favoriser le processus infectieux.

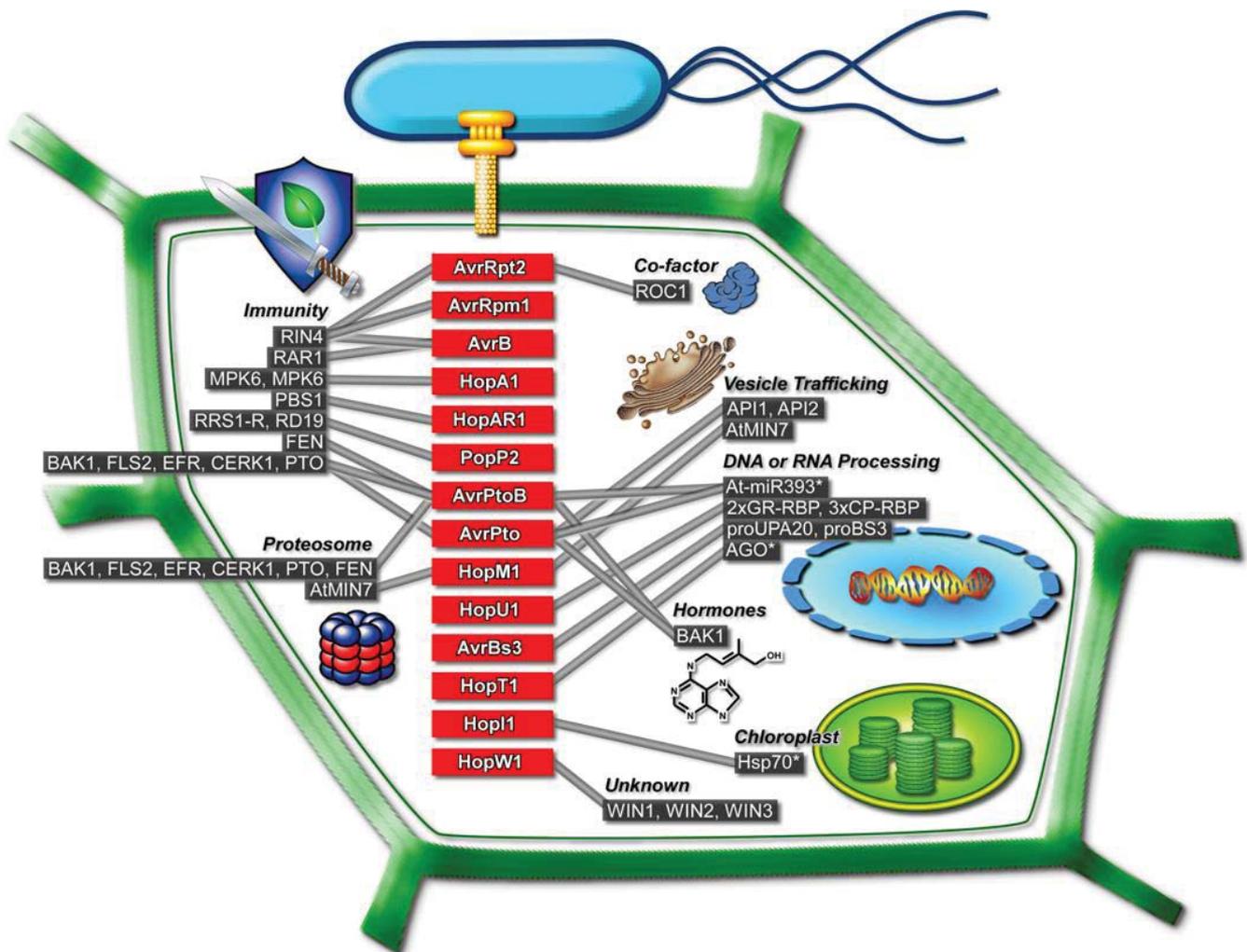
D'autres composantes de la plante hôte sont nécessaires à la croissance des agents pathogènes et de ce fait, au processus infectieux qui aboutit au développement de la maladie. Ces composantes, souvent sans lien évident avec les mécanismes de résistance classiques (SA, JA, ET), sont encore peu documentées. Leur identification constitue pourtant un enjeu majeur pour comprendre les mécanismes d'infection et pourrait permettre de découvrir de nouveaux moyens de lutte contre les agents pathogènes. En effet, leur inactivation rend souvent les plantes tolérantes voire même résistantes à un ou plusieurs agresseurs.

#### **Approches développées pour identifier les facteurs de compatibilité**

Grâce à la généralisation d'approches globales (transcriptomique, protéomique...), le nombre de gènes répertoriés dont l'expression est associée à la maladie tend à s'accroître fortement (Pandelova *et al.*, 2009 ; Hok *et al.*, 2011). Cependant, l'induction de gènes au cours de la maladie ne signifie pas forcément que ces gènes jouent un rôle essentiel dans le processus infectieux (Hu *et al.*, 2008).

Deux grands types d'approche ont été développés afin d'identifier les facteurs de sensibilité :

- Recherche de cibles végétales de facteurs de virulence par différentes méthodes (biochimiques, crible double hybride chez la levure) suivie de l'étude de leur fonction (notamment par des approches de perte et de gain de fonction).



**Figure 12. Composantes végétales ciblées par les effecteurs bactériens de type III (Lewis *et al.*, 2009)**

Les cibles directes des effecteurs sont groupées en fonction du système auquel elles appartiennent. Les lignes représentent les interactions entre les composantes végétales ciblées et les effecteurs. Les protéines WIN1-3 ne possèdent pas de fonction biologique connue chez *Arabidopsis*. La protéine ROC1 est requise pour l'activation de AvrRpt2 mais ne semble pas être une cible de cet effecteur et est désignée comme un cofacteur. Les effecteurs sont désignés sur un fond rouge et les interacteurs de l'hôte sont écrits sur un fond gris. Les astérisques indiquent les protéines ou les gènes prédits pour être la cible de l'effecteur correspondant mais pour lesquels aucune interaction n'a encore été décrite.

- Approche génétique directe par la recherche de mutants incapables de développer des symptômes de maladie en réponse à une souche virulente d'un agent pathogène donné. Des cribles de ce type ont été réalisés sur un certain nombre d'espèces cultivées, mais à l'heure actuelle seuls les mutants *mlo* de l'orge, résistants à l'oïdium, une maladie provoquée par le champignon *Erysiphe graminis*, ont été caractérisés en détail (Jorgensen, 1992). Chez *A. thaliana*, divers mutants altérés dans leur réponse à différents agents pathogènes (virus, champignons, oomycètes, bactéries, nématodes) ont été identifiés par cette approche.

## **B. Manipulation des mécanismes de défense de la plantes par les agents phytopathogènes**

Les agents phytopathogènes synthétisent et libèrent différents composés (toxines, enzymes, effecteurs) qui vont manipuler certaines composantes clés de la plante hôte.

### **1. Les effecteurs, des acteurs essentiels de virulence des agents phytopathogènes**

Les effecteurs jouent des rôles essentiels dans les différentes étapes du processus infectieux : pénétration dans les tissus de l'hôte, adaptation à l'environnement, suppression des réponses immunitaires, accès aux nutriments, prolifération et croissance. Le nombre d'effecteurs varie considérablement entre les microorganismes pathogènes, de quelques dizaines chez les bactéries à plusieurs centaines chez les champignons et les oomycètes (Schmidt & Panstruga, 2011). Au vu des études portant sur les effecteurs bactériens ces dernières années, le système immunitaire végétal constitue une cible privilégiée.

A l'heure actuelle, il semble que la grande majorité des effecteurs étudiés ne cible qu'une seule composante végétale. Toutefois, certains effecteurs sont capables de cibler plusieurs protéines de la plante hôte. C'est le cas par exemple des effecteurs AvrPtoB ou AvrRpt2 de *P. syringae* qui interfèrent avec la mise en place des défenses végétales, tant au niveau de la résistance basale que spécifique, en manipulant différentes composantes de l'hôte (Fig. 12) (Lewis *et al.*, 2009).

Par ailleurs, des effecteurs de différentes espèces d'agents pathogènes (par exemple la bactérie *P. syringae* et l'oomycète *H. arabidopsidis*) bien qu'ayant évolué de façon indépendante, convergent vers un nombre limité de nœuds, à l'intersection de différentes voies de signalisation du système immunitaire de la plante (Mukhtar *et al.*, 2011). Ces nœuds constituent les points « stratégiques » du système immunitaire des plantes et sont par

conséquent la cible d'effecteurs mais sont aussi activement protégés par les protéines de résistance (cf. partie II.B.3.3).

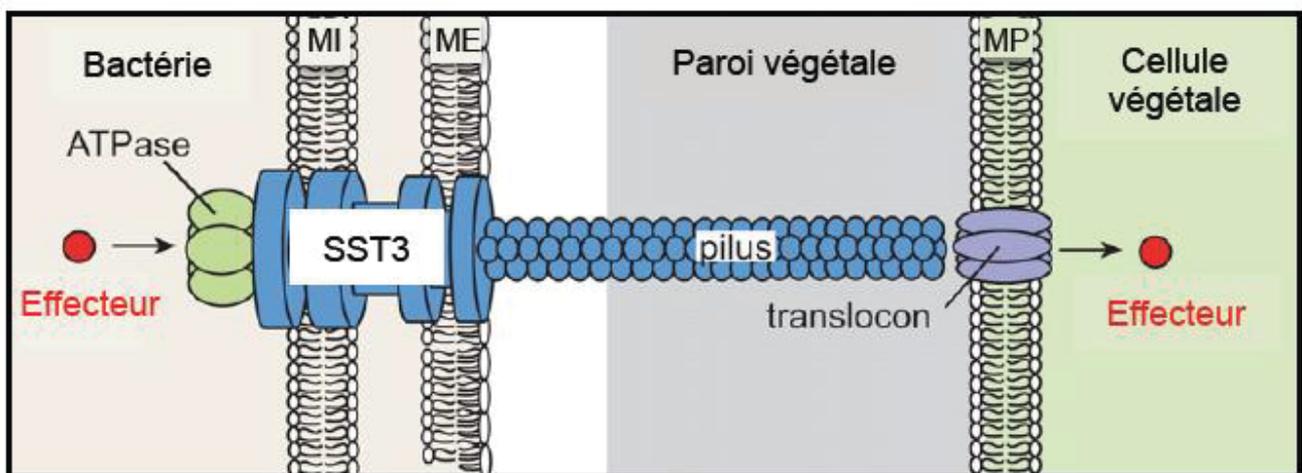
### 1.1. Méthodes d'identification des effecteurs

L'identification de nombreux effecteurs a été facilitée par l'évolution des techniques qui ont permis le séquençage de génomes et leur annotation. En effet, le criblage des séquences génomiques avec des signatures spécifiques a conduit à l'identification de nouveaux effecteurs. Les séquences utilisées correspondent par exemple aux signaux de sécrétion trouvés dans la partie N-terminale d'effecteurs bactériens, fongiques ou d'oomycètes. La recherche de la présence simultanée de ces signatures et d'autres motifs spécifiques d'effecteurs permettent d'affiner la recherche. Ainsi, les génomes d'espèces de *Phytophthora* et de *H. arabidopsidis* ont été criblés en utilisant comme critère la présence d'un signal de sécrétion en position N-terminale ainsi que celle du motif RXLR de translocation (cf. partie III.B.1.2.2) et ont permis d'identifier de nouveaux effecteurs d'oomycètes (Alfano, 2009).

De la même manière, l'identification de certains effecteurs ainsi que l'assignation d'une activité biochimique potentielle ont été facilitées sur la base de motifs ou de domaines typiquement eucaryotes. Par exemple, on retrouve des domaines LRR, « F-Box », « Zinc finger », ou encore des motifs NLS (Nuclear Localisation Signal) dans certains effecteurs (Cunnac *et al.*, 2004 ; Angot *et al.*, 2006 & 2007 ; Mueller *et al.*, 2008). Cependant, les homologies de séquences en acides aminés ne suffisent pas toujours pour prédire la fonction d'un effecteur. L'activité ubiquitine ligase de l'effecteur AvrPtoB par exemple, ne présente pas d'analogie de séquence mais plutôt une analogie de structure avec des enzymes E3 ligase végétale (Janjusevic *et al.*, 2006.) De nombreux effecteurs possèdent des activités de modifications post-traductionnelles et sont capables de modifier l'activité de protéines végétales, d'entraîner leur dégradation ou de perturber certaines interactions (Block *et al.*, 2008). Pour effectuer ces différentes modifications, les effecteurs doivent s'introduire dans la cellule végétale. La pénétration des effecteurs dans la cellule végétale est une étape cruciale pour faciliter le processus infectieux et les agents pathogènes ont développé des stratégies très sophistiquées présentées rapidement ci-dessous.

### 1.2. Système de sécrétion d'effecteurs

Les effecteurs sont délivrés dans la cellule végétale par des moyens qui diffèrent selon la nature de l'agent pathogène.



**Figure 13. Structure du système de sécrétion de type III des bactéries phytopathogènes (D'après Büttner & He, 2009).**

L'appareil de sécrétion de type III traverse les membranes bactériennes internes et externes et est associé à une ATPase cytoplasmique. La partie basale est prolongée par un pilus extracellulaire qui traverse la paroi végétale et qui est surmontée par le translocon enchâssé dans la membrane plasmique. MI, Membrane Interne ; ME, Membrane Externe ; MP, Membrane Plasmique ; SST3, Système de Sécrétion de Type 3.

### 1.2.1. Système de sécrétion de type III (SST3)

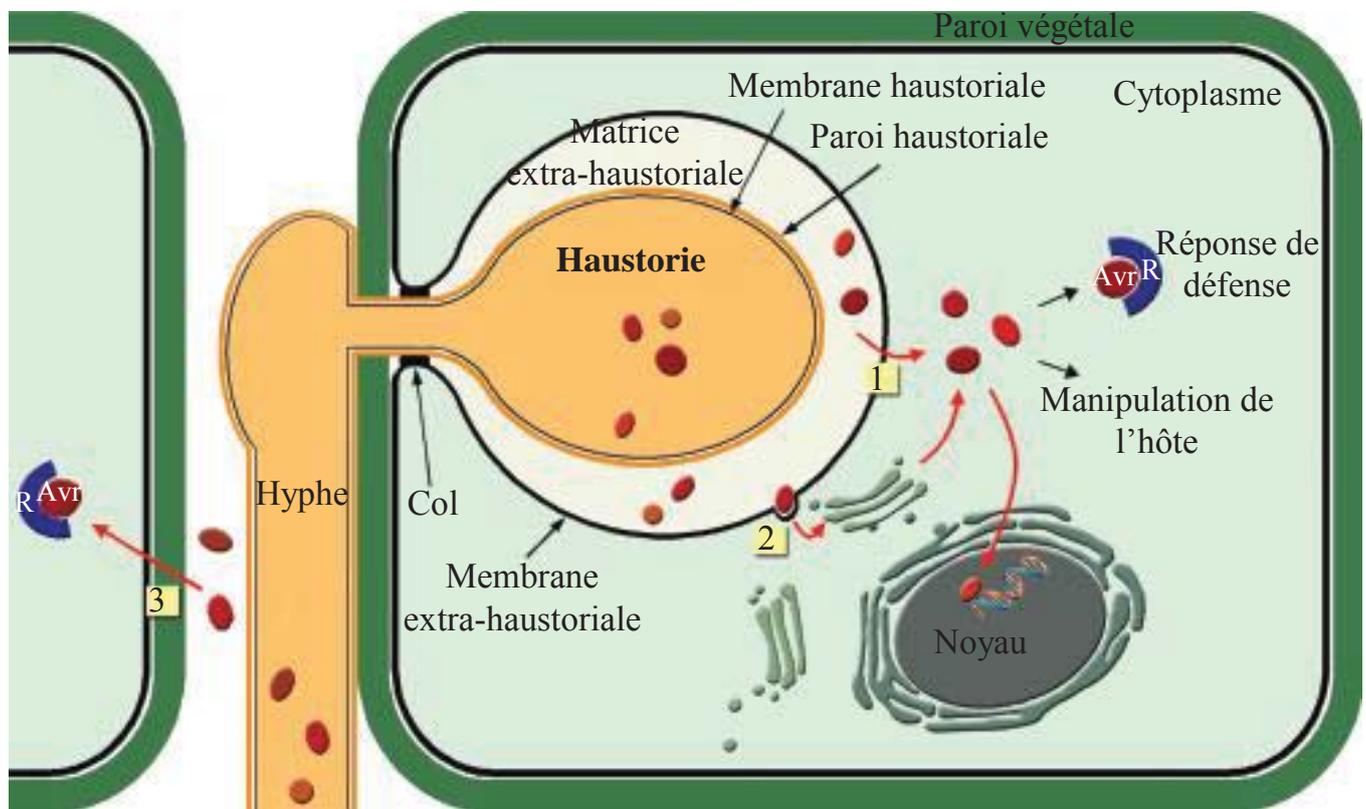
Le système d'injection d'effecteurs le mieux décrit dans le cadre des interactions plantes-microorganismes pathogènes est le SST3. Il est conservé chez de nombreuses bactéries gram-pathogènes d'animaux ou de plantes (Alfano & Collmer, 1997). Ce complexe protéique comparable à une seringue moléculaire permet d'injecter les effecteurs directement dans la cellule de l'hôte (Fig. 13). Chez la bactérie phytopathogène *P. syringae*, les gènes codant cette machinerie ont été découverts grâce à l'étude de mutants non pathogènes (Lindgren *et al.*, 1986). Ces gènes ont été appelés *hrp* pour « HR & Pathogenicity » car leur mutation entraîne la perte de symptômes de HR dans le cadre d'une relation incompatible ou une perte de virulence (ou pathogénicité) dans le cadre d'une relation compatible. Ces gènes sont groupés en cluster au sein du locus *Hrp* (Salanoubat *et al.*, 2002). Ce locus contient des gènes régulateurs ainsi que des gènes codant les protéines de structure du SST3 (Tang *et al.*, 2006). La régulation de ces gènes sera présentée ultérieurement dans la partie IV.5.4.

### 1.2.2. Système de sécrétion/translocation des effecteurs de champignons et oomycètes

Les champignons et oomycètes ont développé une structure très spécialisée, l'haustorie (Fig. 14), qui joue un rôle clé dans la translocation des effecteurs. Bien que nos connaissances sur les mécanismes de translocation d'effecteurs chez ces organismes demeurent parcellaires, des résultats récents montrent la présence de certains motifs d'acides aminés qui joueraient un rôle clé dans ce processus (Birch *et al.*, 2009 ; Catanzariti *et al.*, 2006).

Chez les oomycètes, il existe de nombreux effecteurs appelés RXLR (Stassen & Van den Ackerveken, 2011) car ils possèdent dans leur partie N-terminale ce domaine conservé permettant leur translocation dans la cellule végétale. Ce signal est similaire en séquence, position et fonction, au signal de translocation PEXEL (RxLxE/Q) de *Plasmodium falciparum*, l'agent de la malaria, qui est requis pour l'injection d'effecteurs dans les érythrocytes (Bhattacharjee *et al.*, 2006).

La fusion du domaine RXLR de l'effecteur Avr3a, un effecteur de *P. infestans*, avec une protéine fluorescente est suffisante pour effectuer la translocation de cette dernière dans les globules rouges. De la même manière, le remplacement du domaine RXLR par le domaine PEXEL de *P. falciparum* dans certains effecteurs d'oomycètes, permet leur translocation dans la cellule végétale. Ceci confirme la fonctionnalité du motif RXLR dans le processus de translocation d'effecteurs dans la cellule hôte et illustre la conservation de ces mécanismes entre agents pathogènes animaux et végétaux (Birch *et al.*, 2009).



**Figure 14. L'interface entre la cellule végétale et l'haustorie des champignons et des oomycètes** (D'après Catanzariti *et al.*, 2007).

Schéma d'une haustorie à l'intérieur d'une cellule végétale montrant la membrane extra-haustoriale et la matrice extra-haustoriale composant un compartiment supposé distinct. Le col n'est pas retrouvé chez les haustories d'oomycètes. Les effecteurs sont sécrétés de l'haustorie vers la matrice extra-haustoriale. Certains d'entre eux sont ensuite transportés dans le cytoplasme de la cellule végétale, soit directement à travers la membrane extra-haustoriale (1), soit grâce à des vésicules du système endo-membranaire de l'hôte. A l'intérieur de la cellule végétale, les effecteurs altèrent le métabolisme et les voies de défense. Les effecteurs reconnus par les produits des gènes de résistance (R) sont définis comme des facteurs d'avirulence (Avr) et déclenche les réponses de défense. D'autres effecteurs sont conduits dans des organelles de l'hôte tels que le noyau pour altérer l'activité transcriptionnelle de la cellule végétale. Certains effecteurs sont sécrétés de l'hyphe vers l'apoplaste et peuvent entrer dans d'autres cellules végétales par un mécanisme inconnu (3).

D'autres effecteurs d'oomycètes, appelés « crinklers », sont localisés au niveau du noyau des cellules végétales. Ils contiennent un motif conservé, LFLAK, moins caractérisé que RXLR, qui permettrait la translocation au sein de la cellule végétale (Schornack *et al.*, 2010).

Les mécanismes de translocation d'effecteurs fongiques sont moins connus. Ces effecteurs, peuvent se trouver dans l'apoplasme tel Avr2 de *C. fulvum*, ou à l'intérieur des cellules végétales tel AvrPita de *Magnaporthe grisea* et AvrL567 de *Melampsora lini* (Jia *et al.*, 2000 ; Dodds *et al.*, 2006). Des domaines RXLR-like sont présents dans des effecteurs de champignons et la fonctionnalité de l'un d'entre eux a pu être démontrée (Gu *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'analyse des séquences de nombreux effecteurs potentiels a mené à l'identification d'un nouveau motif (Y/F/WxC) dont la fonction reste à démontrer (Spanu *et al.*, 2010 ; Godfrey *et al.*, 2010).

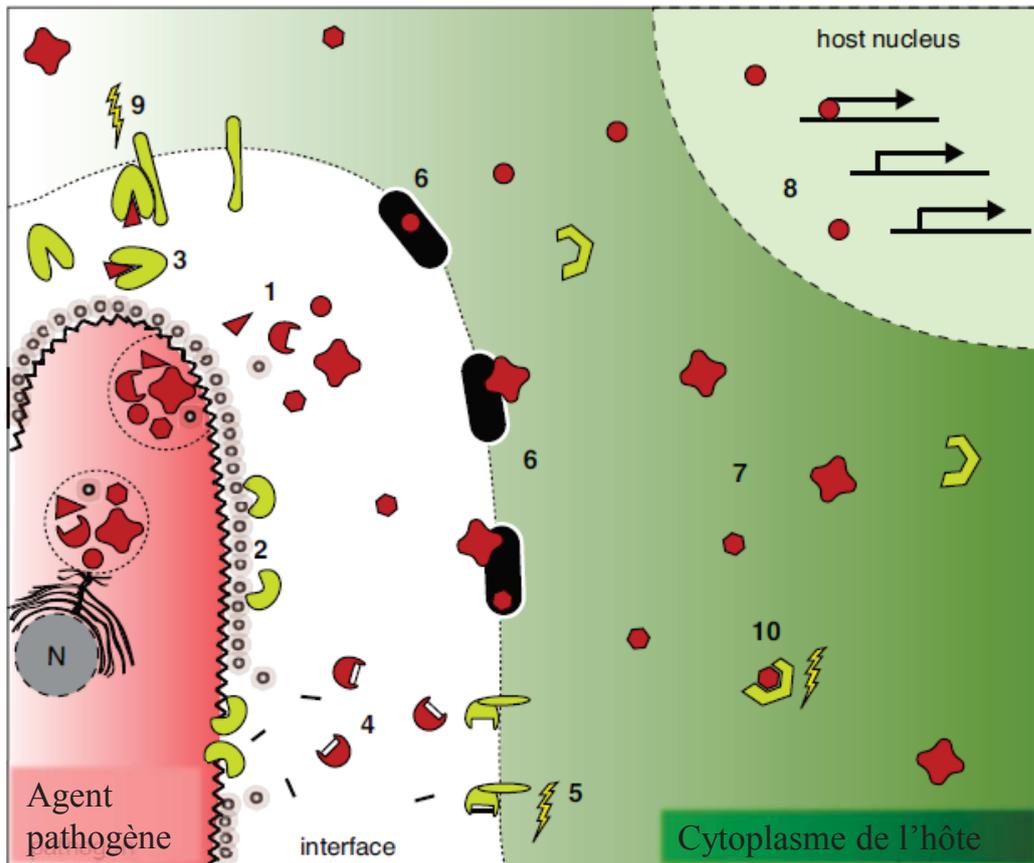
### 1.3. Inhibition de l'immunité végétale

Dans ce chapitre, j'ai choisi d'illustrer de manière non exhaustive et à l'aide de quelques exemples, certaines stratégies employées par les agents pathogènes pour manipuler l'immunité végétale.

#### 1.3.1. *Effecteur de protection (Fig. 15)*

Une des stratégies employées par les agents pathogènes consiste à inactiver certaines composantes végétales qui pourraient leur être délétères. L'apoplaste des plantes contient des enzymes telles que les protéases à cystéine et sérine, capables d'attaquer des composants structuraux des agents pathogènes. Pour se protéger, le champignon *C. fulvum* libère l'inhibiteur de protéase à cystéine Avr2 dans l'apoplaste, qui inhibe la protéase de la tomate Rcr3 en se liant directement à elle. Chez les variétés de tomate possédant la protéine R Cf-2, cette liaison déclenche la mise en place de la résistance (Rooney *et al.*, 2005). *P. infestans*, un oomycète phytopathogène sécrète aussi plusieurs inhibiteurs de protéase, EPIC1 et EPIC2B, qui ciblent aussi Rcr3. Mais contrairement à Avr2, aucune réponse de défense n'est déclenchée par ces effecteurs (Song *et al.*, 2009).

L'inhibition des défenses apoplastiques semble déterminante pour établir une interaction compatible puisque cette stratégie est mise en place par deux organismes phytopathogènes phylogénétiquement éloignés. En protégeant l'intégrité pariétale des agents pathogènes, les inhibiteurs de protéase limitent également la production d'éliciteurs.



### Molécules pathogènes

- MAMPs
- Effecteur protégeant l'hyphe
- ◐ Effecteur récupérant les MAMPs
- ▶ Inhibiteur d'enzymes hydrolytiques
- ◆ Effecteur cytoplasmique
- Effecteur cytoplasmique reconnu par un récepteur
- Effecteur localisé dans le noyau

### Molécules de l'hôte

- Machinerie de translocation d'effacteur codée par l'hôte
- Enzyme hydrolytique
- Recepteur de MAMPs
- Recepteur à la surface cellulaire
- Recepteur cytoplasmique

**Figure 15. Rôle des effecteurs lors de l'interaction des champignons pathogènes avec leur plante hôte (D'après De Jonge *et al.*, 2011).**

Suite à la pénétration, les champignons sécrètent des effecteurs à l'interface avec les cellules végétales (1). Certains d'entre eux protègent l'hyphe contre les enzymes de défense de l'hôte (2), les inactivent (3) ou séquestrent les MAMPs (4) qui pourraient activer les réponses de défense (5). De nombreux effecteurs ne restent pas dans l'interface entre le champignon et la plante mais sont transloqués dans le cytoplasme de la cellule végétale grâce à des mécanismes utilisant les composantes de l'hôte (6). Ils affectent ensuite différents processus cytoplasmiques notamment en relation avec les défenses de l'hôte (7). Cependant, la manière dont il contribue à la virulence du champignon est encore obscure. Des données récentes suggèrent que certains effecteurs agissent au niveau du noyau où ils réguleraient l'expression de gènes (8). La perception d'agents pathogènes filamenteux par la cellule végétale se produit grâce à des récepteurs membranaires au niveau de l'interface (9), ou des récepteurs de type NB-LRR dans le cytoplasme de la cellule végétale (10).

### 1.3.2. *Effecteur de camouflage (Fig. 15)*

*C. fulvum* emploie une autre stratégie consistant à empêcher la perception de MAMP par les PRR. Pour cela, ce champignon sécrète abondamment une protéine appelée Ecp6 (ExtraCellular Protein 6) qui possède des domaines LysM. Ecp6 est capable de se lier à la chitine et supprime les réponses de défense élicitées par ce MAMP en la séquestrant et en empêchant donc sa perception par un PRR à domaine LysM, CEBiP (de Jonge *et al.*, 2010 ; Bolton *et al.*, 2008). Des orthologues d'Ecp6, appelés effecteurs de type LysM, sont très largement distribués parmi les différentes espèces de champignons (de Jonge & Thomma, 2009). Cette stratégie semble donc fondamentale pour la colonisation des plantes par les agents pathogènes fongiques.

### 1.3.3. *Mécanismes d'évasion*

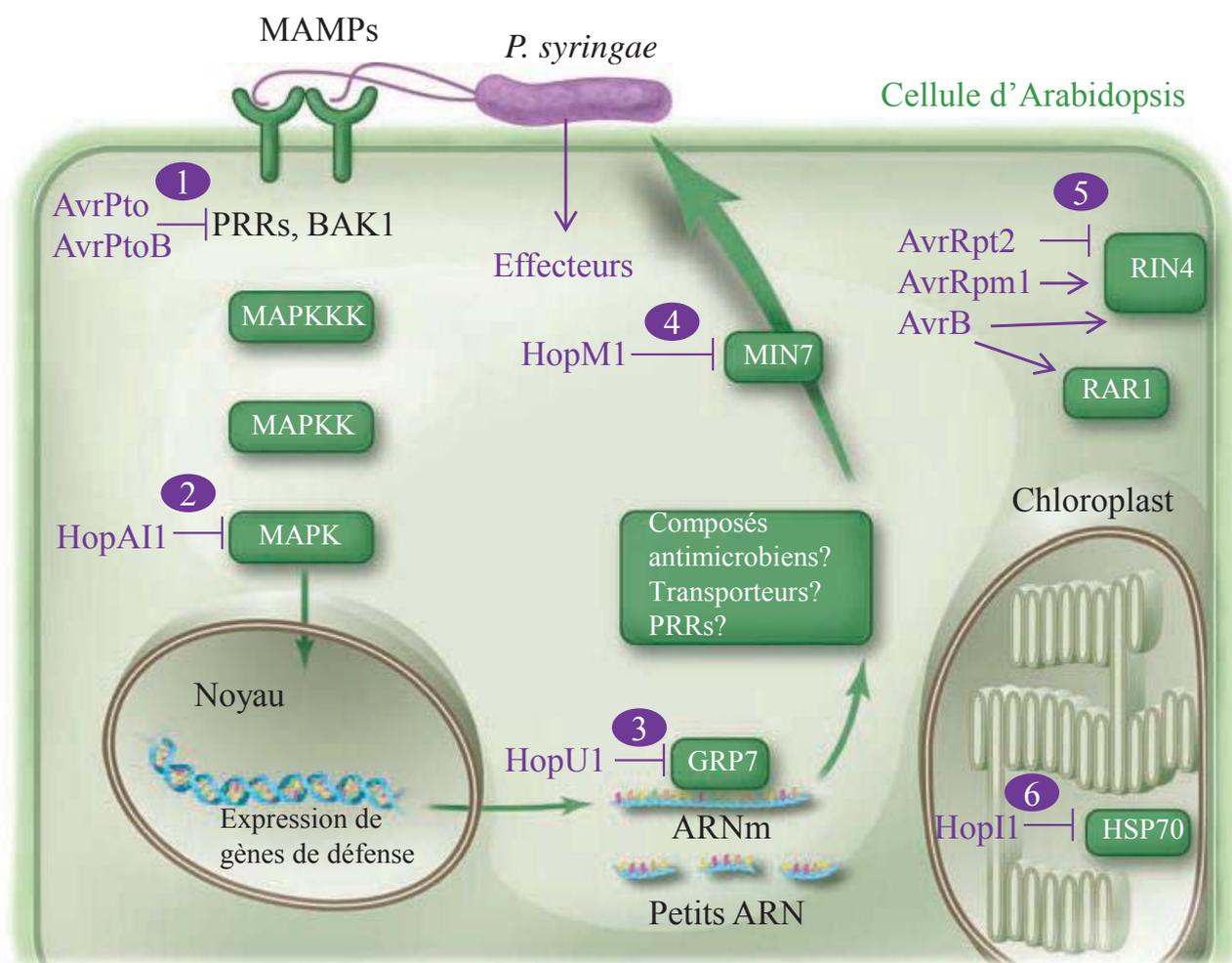
Certaines modifications de séquence de l'éliciteur peuvent entraîner la perte de sa reconnaissance par le PRR correspondant. Les réponses de défense ne sont alors pas activées. *Agrobacterium tumefaciens* et *R. solanacearum*, par exemple, possèdent une flagelline qui n'active pas la résistance basale (Felix *et al.*, 1999 ; Pfund *et al.*, 2004). D'une façon similaire, la flagelline de l'espèce bactérienne *X. campestris* pv. *campestris* fait preuve d'une extrême variabilité de séquence, lui permettant d'éviter sa reconnaissance (Sun *et al.*, 2006).

### 1.3.4. *Ciblage des étapes de perception (Fig. 16)*

AvrPtoB, est un effecteur de la bactérie *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*), une souche virulente à la fois sur la tomate et *A. thaliana* (Pedley & Martin, 2003). La région N-terminale de cet effecteur interagit avec le domaine kinase de BAK1 et FLS2, toutes deux impliquées dans la perception de la flagelline (Chinchilla *et al.*, 2007). En empêchant la formation du complexe entre ces deux récepteurs, AvrPtoB empêche l'activation des voies de signalisation élicitée par la flagelline (Shan *et al.*, 2008). La région C-terminale d'AvrPtoB possède en outre une activité E3 ligase responsable de la dégradation de FLS2 (Gohre *et al.*, 2008).

### 1.3.5. *Inhibition de la cascade des MAPKs (Fig. 15)*

HopA11, un effecteur conservé par les bactéries pathogènes d'animaux et de végétaux, inhibe la cascade des MAPKs, activée suite à la perception de MAMP. Chez *A. thaliana*, l'activité phosphothréonine lyase de cet effecteur inactive deux MAPKs, MPK3 et MPK6 par déphosphorylation (Zhang *et al.*, 2007). Cette activité est conservée chez d'autres effecteurs de la même famille, OspF et SpvC, des effecteurs de *Shigella* et de *Salmonella*



**Figure 16. Action de plusieurs effecteurs de *P. syringae* pour lesquels la cible végétale ainsi que la fonction de suppression des réponses de défense a été caractérisée (D'après Boller & He, 2009).**

Les couleurs verte et violette représentent les cibles végétales et les effecteurs, respectivement. Dans les réponses de défense, 6 étapes sont représentées : la perception de MAMPs (PRRs), la cascade des MAPK (MPK3 et MPK6), le métabolisme de l'ARN (GRP7), le trafic vésiculaire (MIN7), les régulateurs de la résistance basale (RIN4 et RAR1), et la fonction chloroplastique (Hsp70) (Block *et al.*, 2008).

respectivement, deux bactéries pathogènes d'animaux. De façon similaire, ces deux effecteurs ciblent les MAPKs ERK1, ERK2 et P38 (Arbibe *et al.*, 2007 ; Kramer *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2007).

#### 1.3.6. Inhibition du transport de composés de défense (Fig. 15)

L'établissement d'un programme de défense s'accompagne de la synthèse de nombreux composés, qui doivent transiter de leur lieu de synthèse vers le compartiment propice à leur fonction. Ainsi, pour inactiver la résistance basale, les agents pathogènes sont capables d'altérer le transport de composants de défense. HopM1, un effecteur conservé chez toutes les souches de *P. syringae* cible chez *A. thaliana* la protéine AtMin7. L'inactivation du gène codant cette protéine entraîne une sensibilité accrue à la bactérie. AtMin7 appartient à la famille ARF-GEF (ADP-Ribosylation Factor-Guanine-nucléotide Exchange Factor), essentielle au trafic vésiculaire de la plante. En présence de HopM1, AtMin7 est dégradée plus rapidement, mais le mode d'action de l'effecteur n'est pas encore connu. AvrE, un autre effecteur de *P. syringae*, fonctionne de façon redondante avec HopM1, suggérant que la manipulation du transport vésiculaire de l'hôte est importante pour la virulence bactérienne (Nomura *et al.*, 2006 ; DebRoy *et al.*, 2004).

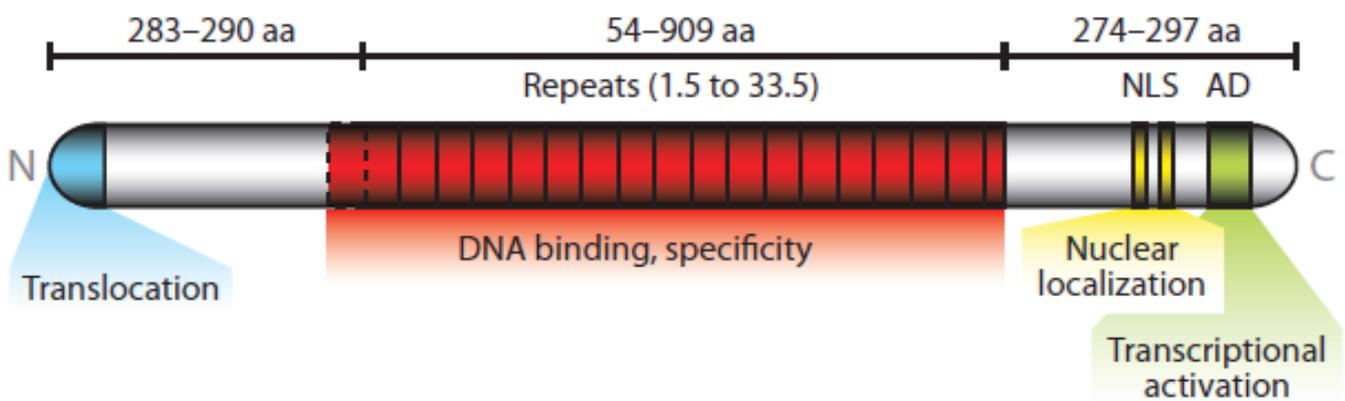
#### 1.3.7. Modulation de la régulation (post-)transcriptionnelle

La perception d'un agent pathogène aboutit à une reprogrammation du transcriptome de la plante afin de mettre en place la réponse de défense. Certains effecteurs agissent ainsi à différentes étapes du métabolisme des ARNs de la plante hôte.

##### 1.3.7.1. Activation transcriptionnelle : les effecteurs TAL

La découverte du mode de fonctionnement des TALEs (Transcription Activator-Like effectors) a mis en lumière un phénomène remarquable de manipulation de l'hôte au niveau transcriptionnel.

Les régions N- et C-terminales des TALEs sont très conservées. La région N-terminal contient les signaux de sécrétion et de translocation par le SST3. La région C-terminale contient le domaine de localisation nucléaire et celui d'activation transcriptionnelle (Fig. 17). La signature la plus frappante de ces effecteurs se situe dans la région centrale, constituée de répétitions en tandem quasi identiques. Chaque répétition compte de 30 à 42 acides aminés AA et les variations de séquence sont limitées à seulement quelques AA, particulièrement aux positions 12 et 13 de chaque répétition qui sont hypervariables (Boch & Bonas, 2010).



**Figure 17. Domaines fonctionnels des effecteurs TAL de *Xanthomonas*** (Boch & Bonas, 2010).

La région N-terminale contient le signal de translocation. Le nombre de répétitions des effecteurs TAL varie de 1,5 à 33,5. La répétition « zéro » prédite possède une séquence en acides aminés différente mais contribue à la liaison à l'ADN, elle est indiquée par des pointillés. NLS, Nuclear Localisation Signal; AD, Activation Domain.

La caractérisation de gènes induits par le TALE AvrBs3 chez le poivron a révélé la présence d'une séquence commune dans leur promoteur appelée boîte UPA (UP-regulated by AvrBs3). Des mutations dans cette boîte entraînent la perte de la reconnaissance par AvrBs3 (Marois *et al.*, 2002 ; Kay *et al.*, 2009 ; Römer *et al.*, 2009). La stricte corrélation entre la longueur de la boîte UPA et le nombre de répétition d'AvrBs3 a conduit à l'élaboration d'un modèle permettant d'expliquer sa spécificité de reconnaissance. Chaque répétition de la partie centrale d'AvrBs3 correspond à une paire de base et la spécificité de reconnaissance des répétitions sur la paire de base est déterminée par les résidus hypervariables en position 12 et 13. La constitution de ce code permet désormais de prédire sur quelle séquence se fixe un effecteur TAL donné et ouvre la voie à de nombreuses applications biotechnologiques (Boch *et al.*, 2009 ; Moscou & Bogdanove, 2009).

Des protéines TALes n'ont pu être retrouvées que chez des bactéries du genre *Xanthomonas* et chez *R. solanacearum*. Cependant, les TALes retrouvés chez *R. solanacearum* sont très différents de ceux de *Xanthomonas*. Malgré tout, l'architecture globale reste la même et la possibilité que ces TALes se fixent aussi à l'ADN ne peut être exclue (Heuer *et al.*, 2007).

Malgré l'implication des TALes dans la virulence des *Xanthomonas* sur leur hôte et la possibilité d'identifier leurs cibles grâce au code, peu de cibles ont été clairement caractérisées à ce jour (Kay *et al.*, 2007 ; Marois *et al.*, 2002).

#### - Un exemple de TALE impliqué dans la manipulation d'un transporteur de sucre

De nombreux agents pathogènes utilisent les produits du métabolisme primaire de leurs hôtes (Patrick, 1989 ; Sutton *et al.*, 1999 & 2007). Ils ont donc développé des stratégies pour détourner à leur profit le métabolisme de ces composés, et en particulier des sucres, normalement dédiés au développement de la plante hôte. Des agents pathogènes bactériens et fongiques manipulent le transport de sucre de leurs plantes hôtes en activant l'expression des transporteurs SWEET au cours de l'infection. Les SWEETs font partie d'une famille de transporteurs bidirectionnels des sucres dont l'activité dépend beaucoup du pH (Chen *et al.*, 2010). Chez le riz, le TALE pthXo1 de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*) se lie directement au promoteur du gène *OsSWEET11* et active sa transcription. Ceci entraîne probablement l'augmentation de transport de sucres vers le xylème et/ou l'apoplaste. Ce transporteur joue un rôle important dans la compatibilité puisque la mutation du gène *OsSWEET11* entraîne une résistance accrue à *Xoo* (Yang *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2010).

Malgré cet exemple, les connaissances sur les mécanismes employés par les effecteurs pour détourner les substances nutritives de leur hôte sont fragmentaires.

#### 1.3.7.2. Stabilité des ARNs (Fig. 16)

L'effecteur de *P. syringae* HopU1 agit sur le métabolisme post-transcriptionnel de la plante grâce à son activité mono-ADP-ribosyltransférase (ADP-RT) nécessaire à sa fonction de virulence. Il modifie par ribosylation de nombreuses protéines de liaison à l'ARN chez *A. thaliana*. Parmi ces protéines, GRP7 est un facteur important de la résistance basale. Les mutants *grp7* présentent une sensibilité accrue à *P. syringae*. HopU1 pourrait donc inhiber GRP7 par ribosylation, d'autant plus que cette modification réduit la capacité de liaison et de stabilisation des ARNm par GRP7 (Fu *et al.*, 2007 ; Block *et al.*, 2008).

#### 1.3.7.3. Voie des microARNs

Les microARNs sont des composants essentiels de régulation dans le développement mais aussi dans l'adaptation à divers stress notamment biotiques. L'activité antivirale du « RNA silencing » en utilisant des microARNs dérivés des virus a longtemps été considérée comme leur principale fonction dans les interactions plantes-agents pathogènes. Cependant, d'autres microARNs endogènes sont aussi nécessaires aux mécanismes de défense envers divers agents pathogènes (Navarro *et al.*, 2008).

L'inactivation post-transcriptionnelle de gènes (PTGS : Post-Transcriptional Gene Silencing) est un mécanisme de défense antiviral privilégié (Ding & Voinnet, 2007). La suppression de ce mécanisme par l'intermédiaire de protéines virales appelées VSRs (Viral Suppressors of RNA-silencing), est une stratégie largement répandue chez les virus pour lutter contre la PTGS des plantes. Les VSRs ont été décrits pour cibler la PTGS à presque tous les niveaux de la biogénèse des petits ARNs. La synthèse des ARNs double brin par exemple, étape initiale de la production des microARNs est inhibée par la protéine V2, du « tomato yellow leaf curl virus ». V2 se lie à une protéine de la plante hôte et l'empêche de former un complexe avec la polymérase responsable de la synthèse de l'ARN à double brin, compromettant ainsi sa fonction (Glick *et al.*, 2008).

Des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la synthèse de certains microARNs deviennent sensibles à des souches bactériennes non-pathogènes suggérant que les processus de « RNA silencing » sont aussi la cible d'effecteurs. AvrPtoB réprime la transcription de miR393, un microARN induit par flg22 chez *A. thaliana* qui cible des récepteurs de l'auxine (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a). AvrPto, un autre effecteur de *P. syringae*, est quant à lui capable

d'inhiber l'accumulation de la forme mature de miR393 et semble donc agir de manière post-transcriptionnelle (Navarro *et al.*, 2008). Ainsi, AvrPto et AvrPtoB favoriseraient la signalisation de l'auxine qui, dans ce contexte, joue un rôle antagoniste sur celle du SA, afin de promouvoir le processus infectieux (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a)

## **2. Manipulation de la balance hormonale**

### **2.1. Synthèse d'hormones par les agents pathogènes**

De nombreux microorganismes phytopathogènes sont capables de produire des phytohormones (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). *R. solanacearum* par exemple est capable de produire de l'ET et d'autres composés proches de l'AIA (Valls *et al.*, 2006). D'autres bactéries telles que les espèces de *Pseudomonas* ainsi que des champignons biotrophes tels que *C. fulvum*, *Ustilago maydis* sont capables de produire des CKs (Glickmann *et al.*, 1998 & Tudzynski & Sharon, 2002). Les champignons nécrotrophes tels que *Botrytis cinerea* sont aussi capables de produire des phytohormones comme l'ABA et des CKs (Marumo *et al.*, 1982 ; Tudzynski & Sharon, 2002). Malgré ces nombreux exemples, le rôle des phytohormones dans la virulence n'est pas encore bien déterminé.

Les stomates jouent un rôle important dans les défenses des plantes en limitant l'invasion bactérienne par leur fermeture suite à la perception de MAMP. La coronatine, par exemple, est une molécule produite par de nombreuses souches de *P. syringae* qui mime l'effet du JA (Fonseca *et al.*, 2009) et provoque la ré-ouverture des stomates permettant ainsi la pénétration d'autres bactéries (Melotto *et al.*, 2008).

### **2.2. Manipulation de la signalisation hormonale par les effecteurs**

Les agents pathogènes peuvent aussi induire la production de phytohormones par la plante hôte. Ainsi, certains effecteurs de *P. syringae* pv *tomato* DC3000 sont capables d'induire la production d'AIA et de CKs chez *A. thaliana* (O'Donnell *et al.*, 2003 ; Schmelz *et al.*, 2003).

Chez la tomate, les deux effecteurs, AvrPto et AvrPtoB ont la capacité d'affecter la voie de l'éthylène en induisant des ACC oxydases, des enzymes impliquées dans la synthèse de cette hormone, et de promouvoir ainsi l'infection (Cohn & Martin, 2005). Enfin, l'expression d'AvrPtoB a pour conséquence d'accroître la teneur en ABA *in planta* et de réprimer l'expression de gènes normalement induits en réponse aux MAMP (de Torres Zabala *et al.*, 2007). Une résistance accrue est observée chez certains mutants de biosynthèse de l'ABA en réponse à des agents pathogènes bactériens et fongiques (Asselbergh *et al.*, 2007 ; de Torres Zabala *et al.*, 2009 ; Ton & Mauch-Mani, 2004). A l'inverse, la surexpression d'un gène

codant une des sous-unités de l'enzyme de biosynthèse de l'ABA entraîne une sensibilité accrue chez *A. thaliana* en réponse à différentes souches de *Pseudomonas* (Fan *et al.*, 2009).

### 3. Facteurs de compatibilité végétaux

Les facteurs de sensibilité sont des composantes végétales nécessaires à la colonisation et/ou au développement de l'agent pathogène. Il peut s'agir par exemple de molécules produites par la plante et perçues par l'agent pathogène, de facteurs structuraux ou de nature trophique (accessibilité aux réserves énergétiques). Sans ces facteurs de sensibilité, l'agent pathogène n'est pas en mesure de manipuler efficacement le métabolisme de la plante, ce qui peut conduire à l'arrêt prématuré du processus infectieux.

#### 3.1. Signaux végétaux attracteurs et/ou inducteurs des mécanismes de virulence de l'agent pathogène

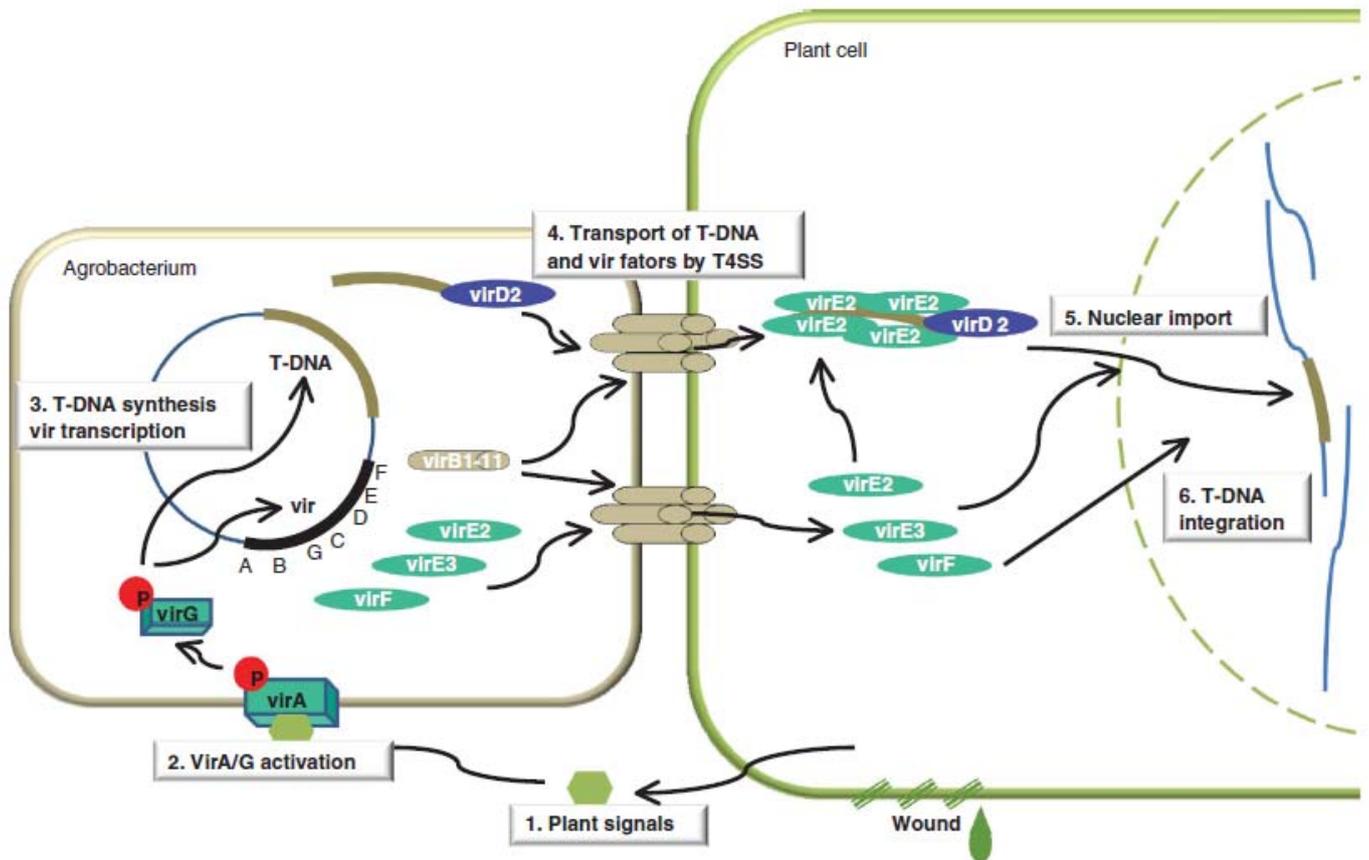
Les agents pathogènes possèdent des systèmes de perception qui reconnaissent des composés essentiellement présents à la surface des cellules ou libérés dans le milieu par les plantes comme dans les exsudats racinaires. Ces mécanismes sont particulièrement efficaces puisque les composés reconnus sont généralement essentiels à la vie de la plante et donc très conservés.

##### 3.1.1. Attraction de l'agent pathogène

Pour être capable de démarrer le processus infectieux, les agents pathogènes doivent avant tout être capables de percevoir leurs hôtes et se diriger vers eux. Le criblage de mutants de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* affectés dans la virulence a conduit à l'identification de *CheB2*, un gène impliqué dans le chimiotactisme, montrant l'importance de ce phénomène (Garvis *et al.*, 2009). Les molécules agissant comme signal peuvent différer d'une espèce végétale à l'autre et sont responsables de la spécificité d'hôte de certains agents pathogènes. La bactérie du sol *R. solanacearum*, est attirée spécifiquement par divers acides aminés et acides organiques contenus dans les exsudats racinaires de sa plante hôte, la tomate. De façon intéressante, le chimiotactisme s'exerce de manière beaucoup moins efficace avec des exsudats de racines de riz, une plante non-hôte (Yao & Allen, 2006).

##### 3.1.2. Signaux végétaux induisant les mécanismes de virulence

Certaines molécules produites par la plante sont perçues par l'agent pathogène et peuvent induire l'expression de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène (ou symbiotique) du microorganisme.



**Figure 18. Vue d'ensemble de l'interaction *Agrobacterium*-plante** (Pitzsche & Heribert, 2010).

Des signaux végétaux (1) induisent VirA/G (2) et ainsi, la synthèse du T-DNA et l'expression des gènes *vir* chez *Agrobacterium*. Le T-DNA et les protéines Vir sont transférés dans la cellule végétale à travers un système de sécrétion de type IV où ils forment un complexe protéique T-DNA/Vir (4). Ce complexe est importé ensuite dans le noyau de la plante hôte (5) où le T-DNA s'intègre dans les chromosomes par recombinaison illégitime (6).

### 3.1.2.1. Induction des gènes *Vir* chez *Agrobacterium tumefaciens*

Les composés phénoliques, certains sucres ainsi qu'un faible pH et une quantité en phosphate basse sont des signaux indiquant la proximité d'une plante pour la bactérie *A. tumefaciens* qui provoque la maladie de la galle du collet. Ces signaux induisent l'expression d'une batterie de gènes de virulence appelés *Vir*, et la formation d'un système de sécrétion. Les gènes *Vir* sont présents sur un plasmide appelé Ti (Tumor-Inducing) de la bactérie qui comporte un ensemble de gènes requis pour l'établissement de la maladie. La région *Vir* code notamment pour un système à deux composantes, le système *VirA/VirG*. Ces deux gènes sont fortement induits lors d'un contact avec la plante hôte. *VirA* est une protéine histidine kinase liée à la membrane qui joue le rôle de senseur tandis que *VirG* est le régulateur de réponse intracellulaire. Ce dernier, phosphorylé par *VirA* suite à la perception de composés phénoliques, est activé et agit ensuite comme un facteur de transcription en se fixant spécifiquement sur une séquence appelée boîte *Vir*. Cette boîte est présente dans le promoteur des gènes *Vir* impliqués dans la synthèse d'un système de sécrétion qui permet ensuite d'injecter des effecteurs et l'ADN de transfert dans la cellule végétale (Fig. 18) (Pitzschke & Hirt, 2010).

### 3.1.2.2. Induction du régulon *hrp* des bactéries Gram-

Un des premiers loci activés chez les bactéries phytopathogènes Gram- pendant la phase d'infection est le locus *Hrp*, aboutissant à l'élaboration du SST3 et à la production d'effecteurs (Alfano & Collmer, 1997)

La régulation du locus *hrp* de la classe II relativement bien décrit chez *R. solanacearum* sera présentée dans la partie IV.5.4.

### 3.1.2.3. Signaux inducteurs de la différenciation de l'appressorium des champignons pathogènes

Le contact avec une surface dure et hydrophobe joue un rôle essentiel dans l'induction de la différenciation de l'appressorium, une structure d'infection spécialisée qui permet la pénétration entre les cellules végétales puis l'invasion des tissus chez de nombreuses espèces de champignons pathogènes (Fig. 3). La différenciation des appressoria de l'agent pathogène du riz *Magnaporthe oryzae* par exemple, est induite au contact des cires épicuticulaires qui forment une surface hydrophobe. Sur une surface artificielle hydrophobe, le champignon

produit également des appressoria tandis que sur une surface hydrophile, on n'observe pas de différenciation. L'hydrophobicité de la surface n'est pas le seul signal influençant la formation des appressoria chez *M. oryzae*. En effet, la dureté de la surface, les monomères de cutines et les cires foliaires constituent autant de signaux inducteurs (Liu *et al.*, 2011).

### 3.2. Sensibilité aux toxines et sensibilité aux agents pathogènes

Les toxines produites par certaines bactéries et certains champignons pathogènes constituent des déterminants importants du pouvoir pathogène. La sensibilité de la plante est essentiellement déterminée dans certains cas par les toxines spécifiques d'hôtes (HSTs) produites par certains champignons nécrotrophes. Les HSTs seules sont souvent capables de reproduire les symptômes de la maladie causée par l'agent pathogène qui les produit (Walton, 1996). Comme suggéré par leur nom, les HSTs sont définies comme des facteurs de virulence capables de promouvoir la maladie chez des génotypes d'hôtes végétaux qui expriment un gène de « sensibilité ». Des études ont montré que, dans la majorité des cas, un locus dominant de la plante hôte est responsable de la sensibilité à la toxine. Le produit de ce gène perçoit probablement celle-ci de manière directe ou indirecte (Friesen *et al.*, 2008). Par exemple, ToxA, une HST produite par deux champignons nécrotrophes (*Stagonospora nodorum* et *Pyrenophora tritici-repentis*) entraîne la sensibilité par l'intermédiaire d'une protéine végétale, appelée Tsn1 qui présente des similarités avec les protéines R de type NB-LRR. Les auteurs avancent donc l'hypothèse que ces champignons détourneraient à leur avantage des composantes de résistance. Des voies de signalisation communes seraient associées dans un cas à la résistance face à des agents pathogènes biotrophes, et dans l'autre à la sensibilité à des agents pathogènes nécrotrophes (Lorang *et al.*, 2007 ; Hammond-Kosack & Rudd, 2008).

### 3.3. Les facteurs de compatibilité reflètent la biologie de l'organisme pathogène

Dans la mesure où la biologie des agents pathogènes viraux, bactériens, fongiques diffère très largement, la diversité de stratégies de virulence mises en œuvre est grande. Les données concernant les fonctions biologiques des plantes hôtes manipulées par les agents pathogènes sont encore peu nombreuses. C'est pourquoi j'ai choisi de présenter quelques exemples sélectionnés dans la littérature qui permettront d'illustrer la façon dont la maladie causée par différents types d'agents pathogènes se met en place dans les plantes.

### 3.3.1. Virus

Les virus sont des agents pathogènes intracellulaires fortement dépendants de la machinerie de la cellule hôte pour se multiplier. La manipulation efficace de ces composantes est indispensable pour une multiplication et une propagation efficace.

#### 3.3.1.1. Exploitation de composants structuraux

TOM1 et TOM3 (TOBamovirus Multiplication) sont deux protéines transmembranaires d'*A. thaliana*. L'extinction simultanée de leur gène inhibe complètement la multiplication des tobamovirus (Yamanaka *et al.*, 2002 ; Fujisaki *et al.*, 2006). TOM1 interagit directement avec les protéines de réplication du Tobamovirus (Nishikiori *et al.*, 2006). La réplication de tous les virus d'eucaryotes simple brin à polarité positive connus se produit au niveau des membranes de l'hôte. Il a été proposé que TOM1 est une composante de la cellule végétale utilisée par les tobamovirus pour ancrer les protéines de réplication virales à la membrane (Mackenzie, 2005 ; Dennison, 2008).

#### 3.3.1.2. Exploitation d'éléments de l'appareil de synthèse protéique

Le facteur d'élongation de traduction eucaryote, eEF1A (*Eukaryotic translation elongation factor 1A*.) se lie aux ARNs de transfert et les dirige vers les ribosomes. Il interagit aussi directement avec l'ARN et les protéines de réplication des tobamovirus (Zeenko *et al.* 2002; Yamaji *et al.*, 2006). L'extinction du gène *eEF1A* entraîne une diminution de la multiplication virale (Yamaji *et al.*, 2010), mais le rôle exact de cette protéine au cours de l'infection virale n'est pas encore bien compris.

Par ailleurs, les familles de facteur d'initiation de la traduction eIF4E/G sont aussi nécessaires aux potyvirus pour se multiplier dans leurs hôtes. En effet, de nombreuses mutations naturelles ou expérimentales dans ces gènes, confèrent aux plantes une résistance accrue. Ces mutations empêchent probablement la multiplication des potyvirus en perturbant l'initiation de la traduction et/ou de la réplication virale (Truniger & Aranda, 2010). Le mécanisme par lequel ces mutations confèrent la résistance n'est pas encore bien défini, mais diverses données indiquent qu'il serait dû à une altération de la liaison entre eIF4E et la protéine VPg des potyvirus (Yeam *et al.*, 2007). En effet, des allèles de eIF4E associés à la résistance aux potyvirus ne peuvent plus interagir avec la protéine VPg (Charron *et al.*, 2008).

### 3.3.2. Champignons et oomycètes biotrophes (hémibiotrophes)

Les agents pathogènes biotrophes établissent des relations très étroites avec leur hôte, ce qui est illustré par la grande diversité des structures d'infection telles que les appressoria ou les haustoria qui permettent un contact intime avec la cellule végétale (Fig. 14). Les agents pathogènes biotrophes filamenteux se multiplient au sein de tissus vivants et doivent maintenir une balance entre l'extraction de ressources de leur hôte pour compléter leur cycle de vie, et laisser en même temps assez de ressources à la plante pour qu'elle survive suffisamment longtemps. La manipulation de nombreuses composantes de l'hôte par l'agent pathogène est indispensable dans une interaction aussi étroite. C'est probablement le rôle des haustoria, lieu de la production des effecteurs.

En élaborant ces structures spécialisés, les agents pathogènes doivent dégrader localement une partie de la paroi de la cellule végétale tout en minimisant les dégâts puisque l'intégrité pariétale est connectée à des réseaux de signalisation activant les défenses (Hématy *et al.*, 2009). Ces agents pathogènes pourraient détourner des enzymes de leur hôte qui servent à détendre les fibres constituant la paroi afin de faciliter la pénétration des haustoria.

Les mutants d'*A. thaliana pmr1-6* (Powdery Mildew Resistant) ont été identifiés suite à un crible génétique visant à rechercher des facteurs de sensibilité en réponse au champignon *Golovinomyces cichoracearum* (Vogel & Somerville, 2000). Ce crible a notamment permis l'identification d'un gène codant une pectate lyase (*PMR6*) et d'un autre de fonction inconnue (*PMR5*). La composition en pectine de la paroi des mutants *pmr5/6* est altérée. Ces deux mutants présentent une résistance spécifique à ce champignon. Ces modifications pariétales nuiraient au développement des haustoria dans la plante et par conséquent à l'accessibilité aux nutriments de l'agent pathogène (Vogel *et al.*, 2002 & 2005).

### 3.3.3. Nématodes endoparasitaires sédentaires et différenciation des sites nourriciers

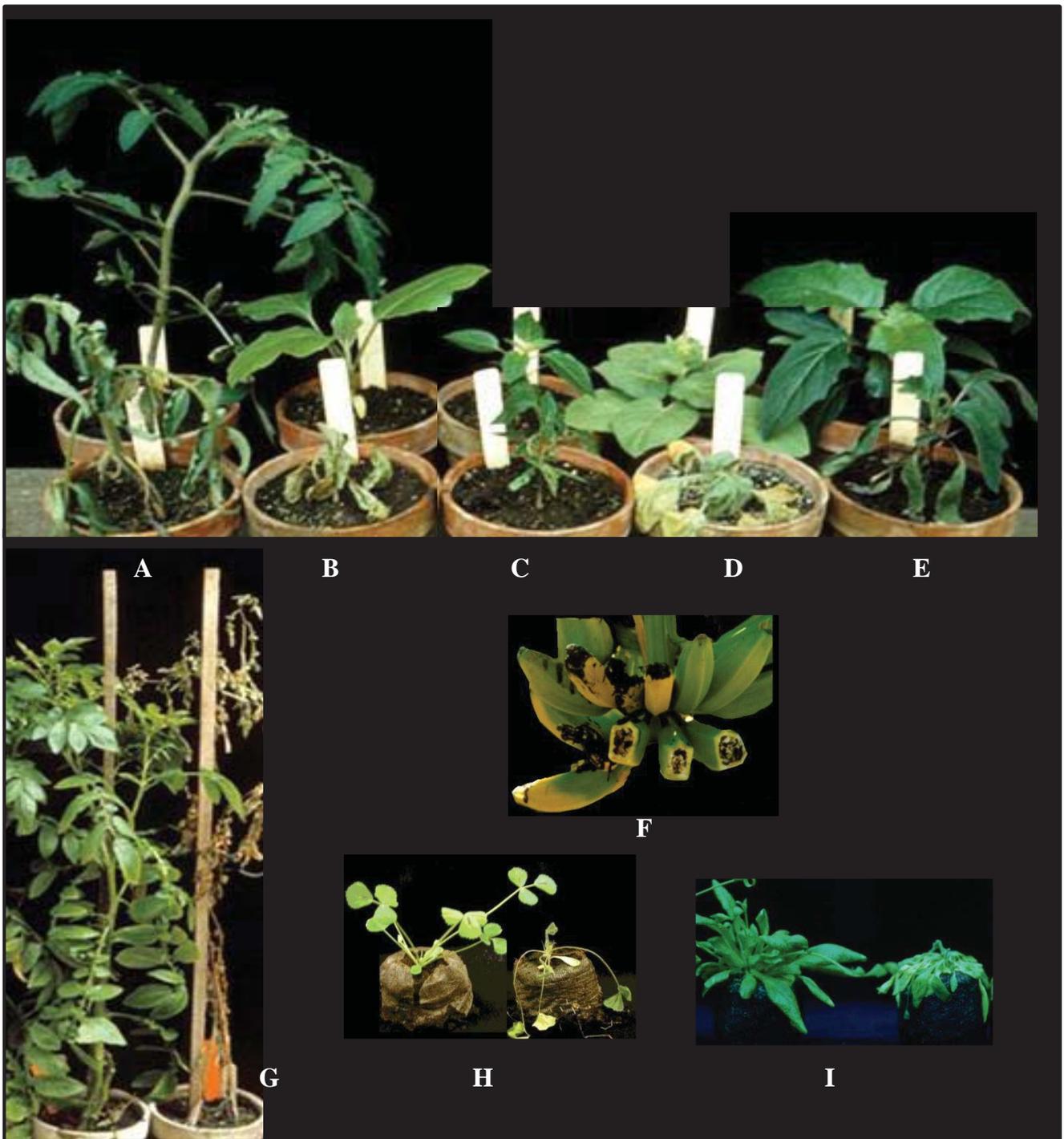
Les nématodes endoparasites sédentaires sont des parasites racinaires qui infectent leurs hôtes d'une manière tout à fait remarquable. Au cours d'une interaction compatible, ces agents pathogènes, induisent la redifférenciation de cellules racinaires en cellules nourricières spécialisées. Le site nourricier des nématodes à galles, du genre *Meloidogyne*, est composé de cellules géantes polynuclées alors que celui des nématodes à kystes, des genres *Heterodera* ou *Globodera* est constitué d'un syncytium. La mise en place de ces structures est essentielle à la croissance et la reproduction des nématodes.

Les nématodes à galles ont la capacité d'induire des sites nourriciers chez plusieurs milliers d'espèces végétales (Trudgill & Block, 2001), probablement grâce à la manipulation d'éléments essentiels chez les plantes hôtes. Ils pénètrent dans les racines par les pointes racinaires et migrent entre les cellules jusqu'à atteindre le cylindre vasculaire. Ils induisent ensuite la redifférenciation de sept cellules du parenchyme. Ces cellules s'élargissent et sont converties en cellules nourricières géantes polynucléées par des divisions nucléaires successives sans division cellulaire (Jones & Payne, 1978). Complètement différenciées, ces cellules atteignent à peu près 400 fois la taille d'une cellule vasculaire normale et elles contiennent plus de 100 noyaux polyploïdes. Les divisions et l'hypertrophie des cellules voisines du site nourricier mènent à la formation de galles.

Le cytosquelette joue un rôle central dans la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire et la morphogénèse. Au vu des modifications morphologiques remarquables que subissent certaines cellules de la plante hôte au cours de l'infection par les nématodes à galles, le cytosquelette constitue de ce fait une cible privilégiée pour cet agent pathogène.

MAP65-3 (Microtubule-Associated Protein 65-3), est une protéine qui joue un rôle majeur dans la formation des cellules géantes. En effet, les mutants *map65-3* présentent une résistance accrue à *Meloidogyne incognita*. L'analyse de la localisation cellulaire de cette protéine et l'organisation des microtubules chez *map65-3* a mis en évidence un rôle critique de MAP65-3 dans l'organisation du réseau de microtubules. Cette protéine n'est exprimée que dans les cellules en division chez *A. thaliana* où elle est localisée au niveau du réseau de microtubules notamment le fuseau mitotique et le phragmoplaste. Par ailleurs, la mutation de ce gène montre son importance dans les processus de division cellulaire tant au niveau de la cytokinèse que de la karyokinèse. Dans les cellules géantes, elle est associée au plan de division qui sépare les deux noyaux filles (Caillaud *et al.*, 2008).

D'autres acteurs du cytosquelette sont impliqués dans la formation des cellules géantes. Certaines formines, protéines régulatrices de la formation des microfilaments d'actine, sont induites au cours de la formation des cellules géantes. Elles permettraient la réorganisation du réseau de microfilaments d'actine afin de guider le trafic vésiculaire requis pour la biogenèse de membrane plasmique et de paroi (Favery *et al.*, 2004).



**Figure 19. Symptômes de flétrissement bactérien sur différentes plantes hôtes**  
**A.** Tomate; **B.** Aubergine ; **C.** Poivron ; **D.** Tabac ; **E.** Datura ; **F.** Banane ; **G.** Pomme de terre ; **H.** *Medicago truncatula* ; **I.** *Arabidopsis thaliana*.

## PARTIE IV : LE PATHOSYSTEME *R. solanacearum*/A. *thaliana*

### 1. Généralités : *R. solanacearum*, l'agent du flétrissement bactérien

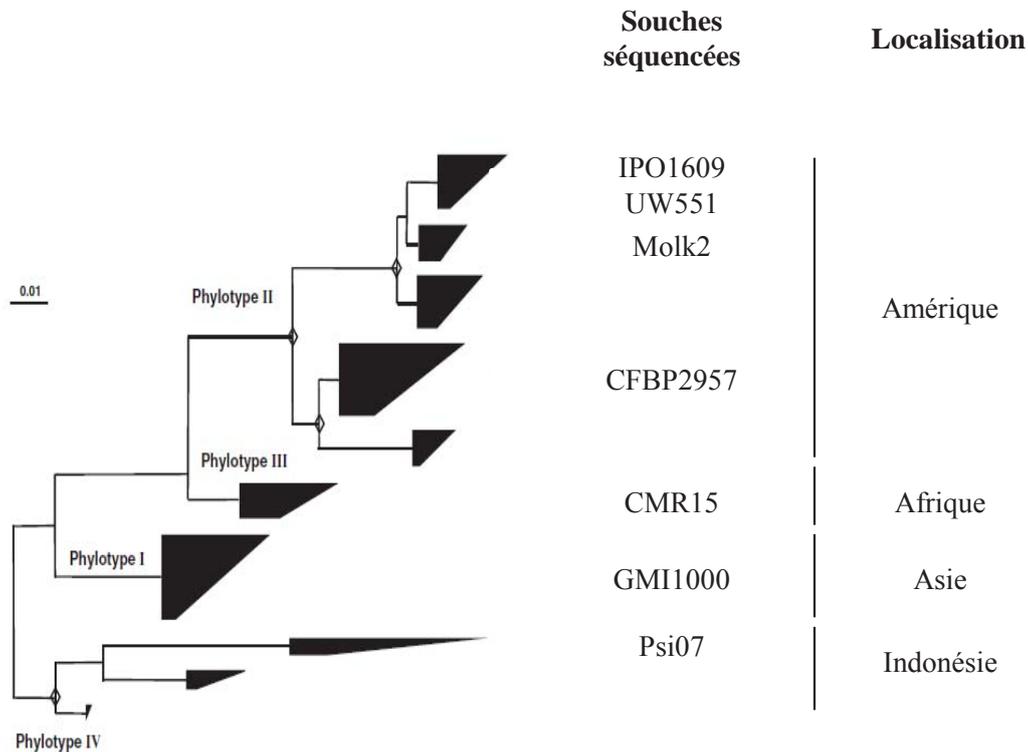
*R. solanacearum* est l'agent pathogène responsable du flétrissement bactérien. Du fait de son agressivité, de son grand spectre d'hôtes, de sa large distribution géographique et de sa survie dans les sols et les eaux, elle est considérée comme l'une des bactéries phytopathogènes les plus dévastatrices au monde. Elle est capable d'infecter plus de 200 espèces végétales réparties dans plus de 50 familles. Ce large spectre d'hôtes comprend des cultures d'intérêt agronomique chez les solanacées (tomate, pomme de terre, tabac, aubergine, poivron), les monocotylédones (bananier, gingembre), certaines légumineuses (arachides, haricot), les plantes ornementales (Pélargonium, Géranium, Pétunia) et quelques ligneux (eucalyptus, mûrier, olivier) (Fig.19) (Hayward, 2000). Les plantes modèles *A. thaliana* et *Medicago truncatula* sont également des plantes hôtes de la bactérie (Deslandes *et al.*, 1998 ; Vailleau *et al.*, 2007).

### 2. Classification

*R. solanacearum* est une  $\beta$ -protéobactérie Gram-, un groupe qui comprend aussi bien des espèces pathogènes d'animaux (*Yersinia*, *Salmonella*, *Escherichia*...) que de plantes (*Xanthomonas*, *Pseudomonas*...). Les différentes souches de *R. solanacearum* ont longtemps été classifiées en **rares** ou en **biovars** en se basant sur le spectre de plantes hôtes ou sur les caractéristiques physiologiques, respectivement. Plus récemment, une classification phylogénétique basée sur des marqueurs moléculaires a abouti à la répartition des différentes souches de *R. solanacearum* dans 4 groupes appelés **phylotypes** (Fig. 20). Ces 4 phylotypes, très hétérogènes, sont liés à l'origine géographique des souches bactériennes (Fegan & Prior, 2005 ; Poussier *et al.*, 2000). La diversité génotypique et phénotypique des différentes souches de *R. solanacearum* ainsi que les différentes gammes d'hôtes observées entre les souches ont conduit à définir *R. solanacearum* comme un « complexe d'espèces » (Fegan & Prior, 2005 ; Gillings *et al.*, 1994 ; Lebeau *et al.*, 2011).

### 3. Cycle de vie (Fig. 21)

Pour infecter ses plantes hôtes, *R. solanacearum* pénètre dans la plante par les racines, plus particulièrement au niveau de l'apex racinaire, les points d'émergence des racines secondaires ou par des blessures naturelles. Elle se développe ensuite dans les espaces intercellulaires du cortex racinaires et dégrade les parois végétales pour finalement envahir les vaisseaux du xylème où elle va proliférer et se propager jusque dans les parties aériennes (Vasse *et al.*,



**Figure 20. Classification phylogénétique du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*** (Ph. Prior, INRA, la réunion)

Arbre phylogénétique construit à partir des séquences du gène *egl* de 771 souches de *R. solanacearum*. Le complexe d'espèces de *R. solanacearum* est constitué de 4 groupes phylogénétiques majeurs appelés phylotypes. Le phylotype II est subdivisé en 2 branches, IIA et IIB, et plusieurs clades.

Les souches dont le génome a été séquencé ainsi que l'origine géographique principale des différents phylotypes sont inscrits. La barre de l'échelle représente la substitution d'un nucléotide sur 10 et l'épaisseur des « bandes » est relative au nombre de souches échantillonnées par phylotype.

1995 ; Alvarez *et al.*, 2008). La multiplication dans les vaisseaux du xylème est très importante (jusqu'à  $10^9$  CFU par gramme de matière fraîche). La sécrétion massive d'exopolysaccharides (EPS) à ce niveau bloque la circulation de sève brute et serait responsable du flétrissement des plantes.

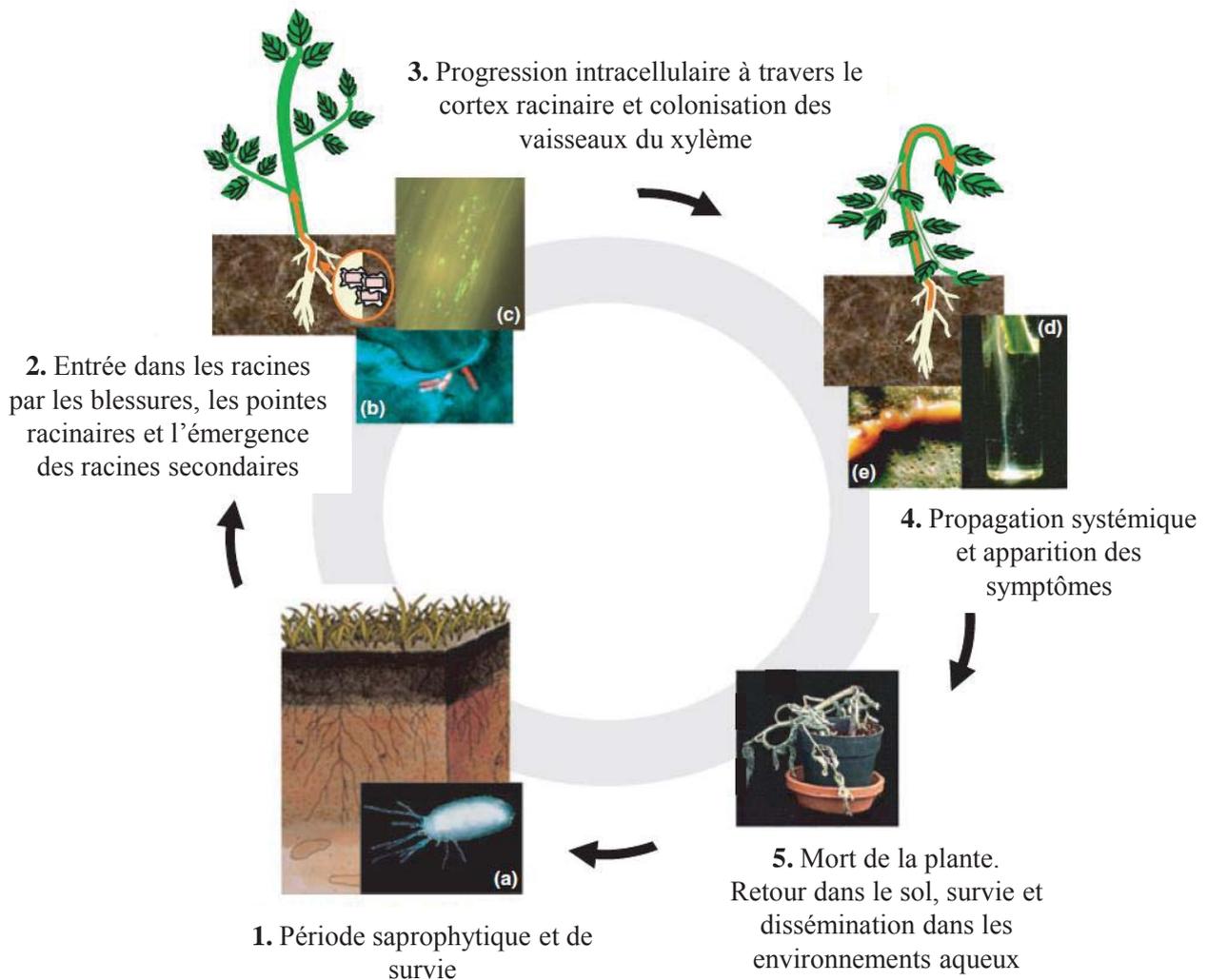
Lorsque la plante meurt, les bactéries regagnent le sol où elles pourront coloniser d'autres plantes. *R. solanacearum* commence alors une phase saprophyte peu étudiée de son cycle de vie, durant laquelle les bactéries peuvent survivre de nombreuses années (Van Elsas *et al.*, 2000). Le séquençage du génome d'une souche de *R. solanacearum*, GMI1000 a révélé qu'elle possède la machinerie nécessaire au catabolisme de divers composés organiques pouvant fournir l'énergie suffisante à sa survie (Génin & Boucher, 2004). Par ailleurs, *R. solanacearum* est capable de se disséminer et de survivre pendant de longues périodes dans les cours d'eau, tout en conservant ses capacités à reproduire son processus infectieux (Alvarez *et al.*, 2008).

#### **4. Caractéristiques génomiques du complexe d'espèces de *R. solanacearum***

A ce jour, 7 génomes de souches de *R. solanacearum*, réparties dans les différents phylotypes, ont été séquencés (Fig. 20). La comparaison de ces génomes a permis d'identifier des caractéristiques génomiques communes. La taille des génomes et le nombre de gènes sont similaires et composés de deux réplicons : un chromosome d'environ 3,6 Mb et un mégaplasmide d'environ 2,1 Mb. La diversité des souches séquencées a permis d'évaluer le « pan-génome », c'est-à-dire l'ensemble des gènes présents dans les différentes souches de *R. solanacearum*, à environ 9000 gènes (Fig. 22). Le génome de base ou « core-génome » (gènes présents dans toutes les souches) est constitué de 2543 gènes. Le « dispensable-génome » (gènes présents dans plusieurs souches mais pas toutes) comprend 3538 gènes et 391 à 640 gènes forment le génome « spécifique » (gènes présents dans une seule souche) (Remenant *et al.*, 2010). De nombreux gènes impliqués dans la virulence sont présents dans le « core génome » soulignant le caractère ancestral du pouvoir pathogène de cette bactérie (Guidot *et al.*, 2007). Parmi eux, on trouve les gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS, les gènes codant pour la synthèse du SST3 et des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des gènes impliqués dans la motilité bactérienne ainsi que dans la réponse aux défenses des plantes (Remenant *et al.*, 2010 ; Guidot *et al.*, 2007).

#### **5. Les facteurs de pathogénicité de *R. solanacearum***

Un certain nombre de facteurs contribuent au pouvoir pathogène de *R. solanacearum*.



**Figure 21. Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*** (D'après Génin, 2010).

- (a) Observation de la souche GMI1000 au microscope électronique à transmission.
- (b) Observation en microscopie confocale des bactéries attachées à la surface des cellules végétales.
- (c) Visualisation de bactéries exprimant la « Green Fluorescent Protein » à la surface des racines de tomate.
- (d) Suintement bactérien d'une tige infectée de tomate sortant dans l'eau.
- (e) Ecoulement d'exopolysaccharides à partir de la section transversales d'une tige infectée des tissus vasculaires .

### 5.1. Exopolysaccharides

Des mutants de *R. solanacearum* affectés dans la biosynthèse d'EPS ont mis en évidence l'importance de ces composés dans le pouvoir pathogène (Denny & Baek, 1991 ; Garg *et al.*, 2000 ; Boucher *et al.*, 2001). Ces mutants sont capables de se multiplier dans la tomate mais n'induisent pas le flétrissement des parties aériennes (Kao *et al.*, 1992). Les EPS semblent aussi jouer un rôle dans les premières étapes de la colonisation afin de masquer certains constituants bactériens pouvant éliciter des réponses de défense, ou pour protéger la bactérie contre des composés antimicrobiens (Schell, 2000). Toutefois, certains EPS seraient spécifiquement reconnus dans des plantes de tomates résistantes à *R. solanacearum* et induiraient les réponses de défense (Milling *et al.*, 2011).

### 5.2. Motilité

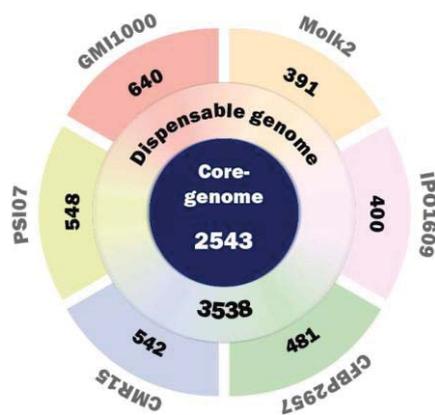
La régulation de la motilité est aussi un élément important du pouvoir pathogène de *R. solanacearum*, lors de la pénétration dans les racines. Les mutants non-motile, *fliC*, et hypermotile *motN* présentent tous deux une perte de virulence sur des plants de tomate dont les racines n'ont pas été blessées. Cet effet n'est plus observé lorsque les mutants sont introduits directement dans le système vasculaire de la plante (Trans-Kersten *et al.*, 2001 ; Meng *et al.*, 2011).

### 5.3. Production d'hormone

*R. solanacearum* est également capable de manipuler la physiologie de la plante hôte notamment en produisant des phytohormones (Valls *et al.*, 2006). La résistance accrue observée chez le mutant d'*A. thaliana ein2*, insensible à l'éthylène a mis en évidence l'importance de la manipulation de cette voie de signalisation dans le processus infectieux (Hirsch *et al.*, 2002). Par ailleurs, *R. solanacearum* possède un gène, *efe*, responsable de la synthèse d'éthylène et qui est nécessaire à la croissance optimale de la bactérie chez l'aubergine (Macho *et al.*, 2010).

### 5.4. Régulation du SST3 de *R. solanacearum*

Les gènes codant les composants du SST3 se trouvent au sein du locus *hrp* et leur expression est finement régulée. Ces gènes, réprimés lors d'une culture sur un milieu riche, sont activés sur un milieu minimum qui mime les conditions au contact de la cellule végétale et de l'apoplaste (Arlat *et al.*, 1992 ; Marena *et al.*, 1998). Le composé responsable de cette activation est présent dans des fragments de paroi végétale et semble être de nature glucidique



**Figure 22. Nombre de gènes dans le pan-génome de *Ralstonia solanacearum* (D'après Remenant *et al.*, 2010)**

Les 6 souches de *R. solanacearum* utilisées pour cette étude sont représentées en gris

car il résiste à la chaleur (Aldon *et al.*, 2000). Suite à la perception de ce composé non encore identifié par la bactérie, *hrpB*, un régulateur clé du locus *hrp* chez *R. solanacearum*, est activé et induit les gènes du SST3 en se liant à leur promoteur (Salanoubat *et al.*, 2002 ; Cunnac *et al.*, 2004a/b). La mutation de *hrpB* abolit le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* illustrant son importance dans la mise en place du SST3 (Génin *et al.*, 1992).

## 6. Quelques effecteurs de la souche GMI1000

La souche GMI1000 de *R. solanacearum*, souche modèle utilisée au laboratoire, a été isolée chez la tomate et appartient au phylotype I. L'analyse de son génome a permis d'identifier 74 gènes codant potentiellement pour des effecteurs de type III, la sécrétion ou la translocation dans la cellule végétale d'environ 30 d'entre eux ayant été démontrée (Poueymiro & Génin, 2009). Parmi eux, 45% sont conservés chez d'autres agents pathogènes d'animaux et de plantes (Poueymiro *et al.*, 2009). Certains effecteurs ont été plus particulièrement étudiés et sont décrits brièvement.

### 6.1. PopP1

Cet effecteur de la famille YopJ/AvrRxv est exprimé de façon constitutive, indépendamment des autres gènes du locus *hrp*. Elle est la première protéine de *R. solanacearum* pour laquelle une fonction d'avirulence spécifique d'un génotype a pu être attribuée lors de l'infection du cultivar St40 du Pétunia (Lavie *et al.*, 2002).

### 6.2. GALAs

Les GALAs forment une famille d'effecteurs très conservée parmi les souches de *R. solanacearum*. Ils ont été initialement identifiés grâce à leur homologie avec les protéines végétales possédant un domaine F-box, nécessaire à l'association au complexe E3 ubiquitine ligase (Angot *et al.*, 2006). Les GALAs possèdent aussi un domaine LRR qui leur permettrait de cibler spécifiquement certaines protéines végétales. GALA7 par exemple, est un facteur de virulence spécifique de *M. truncatula* et son domaine F-box est nécessaire pour cette fonction (Angot *et al.*, 2006). Chez *A. thaliana* ou la tomate cependant, la mutation de l'ensemble des GALAs est nécessaire pour affecter le pouvoir pathogène de la bactérie, ce qui suggère une certaine redondance fonctionnelle (Cunnac *et al.*, 2004 ; Angot *et al.*, 2006). Cette famille d'effecteurs a subi une diversification fonctionnelle aboutissant à une adaptation spécifique de certains de ses membres sur différentes plantes hôtes (Remigi *et al.*, 2011).



**Figure 23. Phénotype visuel de plants d'Arabidopsis infectés par *Ralstonia solanacearum***  
**(a)** Phénotype des écotypes sensible (Col-5) et résistant (Nd-1) 10 jours après inoculation par la souches GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*  
**(b)** La délétion complète ou la mutation de *popP2* dans son domaine catalytique conduit à la perte de la résistance médiée par RRS1-R  
 Phénotypes visuels de plants d'Arabidopsis de l'écotype Nd-1 (RRS1-R) 8 jours après inoculation par les souches de *R. solanacearum* indiquées (D'après Tasset *et al.*, 2010).

## 7. Le couple R/Avr RRS1-R/PopP2

L'évaluation de la sensibilité de 17 écotypes d'*A. thaliana* en réponse à la souche GMI1000 a permis d'identifier 2 écotypes au comportement diamétralement opposé: Nd-1 (Niedersenz) ne présente aucun symptôme et est complètement résistant à cette souche bactérienne, alors que l'écotype Col-5 (Columbia) développe rapidement des symptômes de flétrissement (Fig. 23a). Cette étude a permis l'identification du gène de résistance *RRS1-R* (*Resistance to R. Solanacearum*1) par clonage positionnel (Deslandes *et al.*, 1998 & 2002). Cet allèle est présent chez l'écotype résistant Nd-1, à la différence de l'allèle *RRS1-S* trouvé dans l'écotype sensible, Col-5. La protéine d'avirulence correspondante à RRS1-R a été recherchée en criblant des mutants d'effecteurs potentiels de la souche GMI1000 ayant perdu leur avirulence et donc capables de développer des symptômes de flétrissement sur Nd-1. Ce crible a mené à l'identification de PopP2, dont la reconnaissance directe par RRS1-R est nécessaire à la mise en place de la résistance dans l'écotype Nd-1 (Deslandes *et al.*, 2003).

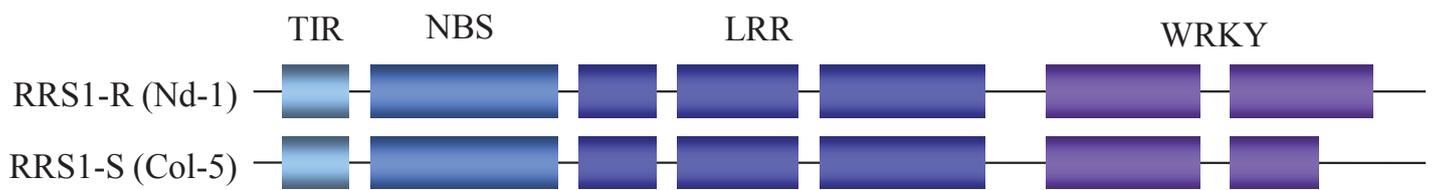
### 7.1. RRS1-R

RRS1-R est une protéine R de structure modulaire atypique TIR-NB-LRR-WRKY car elle possède en position C-terminale un domaine WRKY. Ce domaine pourrait permettre à RRS1-R d'établir un lien entre l'étape de perception de l'agent pathogène et l'activation des réponses de défenses (Deslandes *et al.*, 2003). Les deux allèles *RRS1-R* et *RRS1-S* diffèrent au niveau de la position du codon stop, ce qui, dans le gène *RRS1-S*, aboutit à la formation d'une protéine tronquée de 90 acides aminés dans le domaine WRKY (Deslandes *et al.*, 2002) (Fig. 24). Le mode d'action de ces deux protéines fait l'objet d'études dans l'équipe.

RRS1-R agit en tandem avec une protéine R, RPS4, pour mettre en place une résistance complète. *RPS4* se situe à 264 pb de *RRS1* en orientation inverse. Ces deux gènes partagent donc une partie de leur promoteur. RRS1-R et RPS4 agissent de façon concertée dans la résistance face au champignon *Colletotrichum higginsianum* et aux bactéries *R. solanacearum* et *P. syringae* (Narusaka *et al.*, 2009 ; Birker *et al.*, 2009).

### 7.2. PopP2

PopP2, de même que PopP1, est un effecteur qui appartient à la famille YopJ/AvrRxv de protéases à cystéine qui partagent une triade catalytique très conservée notamment au niveau de résidus cystéine, ainsi qu'un domaine de localisation nucléaire. Des travaux dans l'équipe ont permis de mettre en évidence que PopP2 s'auto-acétyle sur un résidu lysine très conservé au sein de cette famille. L'activité enzymatique de PopP2 est cruciale pour la fonction



**Figure 24. Représentation schématique de la structure des allèles de RRS1 des écotypes Columbia (Col-5) et Nidersenz (Nd-1)**

d'avirulence comme le démontre des mutations dans sa triade catalytique ou sur le résidu lysine (Fig. 23b) (Tasset *et al.* 2010). PopP2 interagit directement avec RRS1-R ou -S et cette interaction entraîne l'accumulation et la stabilisation de ces protéines au niveau du noyau.

La recherche de partenaire végétaux pouvant interagir avec PopP2 a permis d'identifier RD19, une protéine végétale de type protéase à cystéine (Bernoux *et al.*, 2008). Dans un fond génétique Nd-1, le mutant *rd19* est altéré dans sa résistance à *R. solanacearum*, ce qui attribue un rôle à RD19 dans la résistance conférée par RRS1-R suite à la perception de PopP2 (Bernoux *et al.*, 2008). D'autres interacteurs de PopP2 sont actuellement en cours d'étude.

## **8. Autres approches développées pour étudier la maladie**

Les mécanismes moléculaires responsables de l'établissement du processus infectieux de *R. solanacearum* sont relativement peu connus. Des travaux de l'équipe cherchent à mieux comprendre ces mécanismes par différents types d'approches.

### 8.1. Approche transcriptomique

Afin de déterminer quelles sont les différences dans l'expression globale des gènes lors des interactions compatibles et incompatibles, des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur les écotypes résistant et sensible, Nd-1 et Col-5 respectivement (Hu *et al.*, 2008). Au cours de la maladie, l'expression de gènes liés à l'ABA est modifiée. Cette hormone joue un rôle déterminant dans les réponses d'adaptation à différents stress abiotiques notamment à la sécheresse qui s'apparente avec les symptômes de flétrissement. Il semble donc logique que certains gènes régulés lors de l'infection par *R. solanacearum* soient liés à l'ABA. Par ailleurs, d'autres gènes, régulés suite à un traitement par flg22 ou pendant les processus de sénescence, présentent également un profil d'expression altéré dès l'apparition des symptômes. Ceci reflète probablement l'état de stress dans lequel se trouvent les plantes à ce stade de l'infection (Hu *et al.*, 2008).

### 8.2. Approches génétiques

#### 8.2.1. Ciblée

Les mutants d'*A. thaliana* affectés dans des voies de signalisation liées aux réponses de défense contre les agents pathogènes constituent des outils pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la résistance ou de la sensibilité à *R. solanacearum*. Les voies de signalisation empruntant le SA et le JA ne semblent pas jouer de rôle au cours de l'interaction avec *R. solanacearum* (Hirsch *et al.*, 2002). Alors que la plupart

des mutants, affectés dans les voies de l'éthylène, testés ne sont pas affectés dans le développement des symptômes, *ein2*, un mutant insensible à l'éthylène, présente une résistance accrue (Hirsch *et al.*, 2002). L'implication d'EIN2 dans d'autres voies de signalisation notamment celle de l'ABA (Wang *et al.*, 2007) pourrait expliquer cette différence.

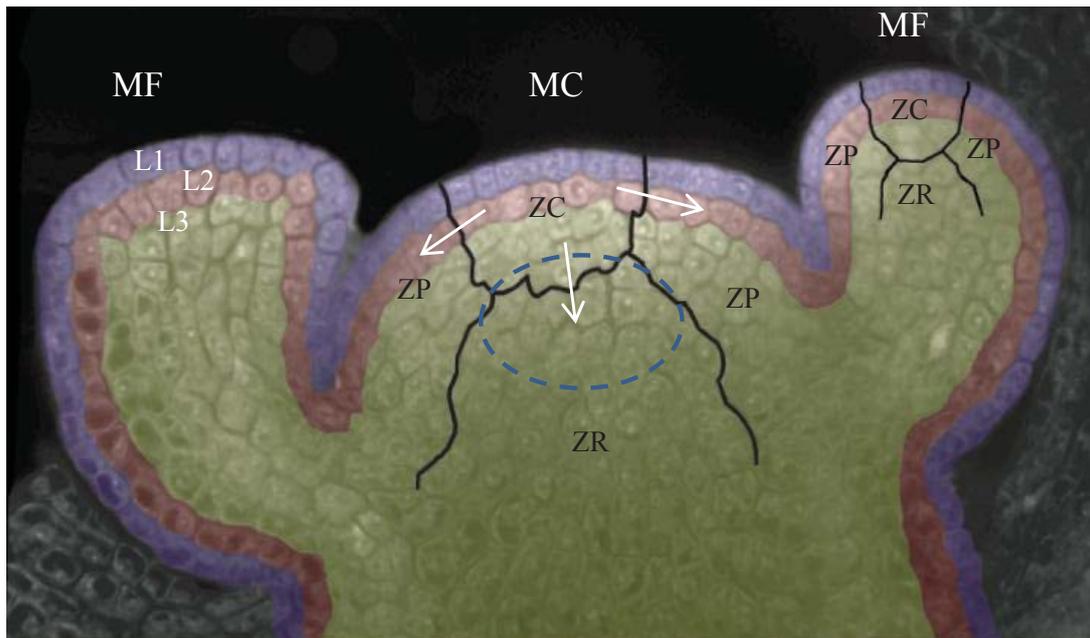
### 8.2.2. Globale ou sans à priori

Le crible de mutants d'*A. thaliana* incapables de développer des symptômes de maladie en réponse à une souche virulente de *R. solanacearum* a permis d'identifier et de caractériser de nouvelles composantes nécessaires au développement de la maladie.

La mutation *nws1* (No Wilt Symptom 1) présente une perte de sensibilité ou résistance accrue face à de nombreuses souches de *R. solanacearum*. Cette résistance semble spécifique à *R. solanacearum* puisque les réponses de *nws1* à d'autres agents phytopathogènes (champignon, oomycète, nématode et virus) ne sont pas affectées (Feng *et al.*, 2004). De plus, le niveau d'expression de gènes associés aux défenses n'est pas modifié au cours de l'interaction. Ces caractéristiques indiquent que NWS1 est une composante déterminante dans l'établissement du processus infectieux de *R. solanacearum* (Feng *et al.*, 2004).

La mutation *nws2* confère une résistance importante en réponse à *R. solanacearum* et à *Plectosphaerella cucumerina*, un champignon nécrotrophe. NWS2, renommé IRX5 (IRregular Xylem 5) code en effet pour une cellulose synthase impliquée dans la formation de la paroi secondaire qui semble être un élément important dans la mise en place du processus infectieux de ces deux agents pathogènes. En effet, la mutation de deux autres gènes codant des celluloses synthase impliquées dans la formation de paroi secondaire, *IRX1* et *IRX3*, provoque aussi une résistance accrue en réponse à *R. solanacearum* et *P. cucumerina*. Par contre, des mutations dans les gènes codant des celluloses synthase impliquées dans la formation de la paroi primaire n'entraînent pas de modification dans la résistance. La résistance des mutants *irx1/3/5* n'est pas associée aux voies de signalisation hormonales classiquement liées aux défenses, qui sont particulièrement importantes dans la résistance contre *P. cucumerina*. Des analyses transcriptomiques ont révélé que la perte de fonction des protéines IRX active de nouvelles voies de défense par l'intermédiaire de l'ABA, qui contribue à la formation d'un environnement enrichi en composés antimicrobiens (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007).

En collaboration avec Bart Thomma (Université de Wageningen, Hollande), un crible d'une banque de 80 mutants d'*A. thaliana* affectés dans des gènes de RLP a été entrepris. L'identification de *clavata2*, l'unique mutant de cette banque présentant une perte de sensibilité en réponse à *R. solanacearum* a conduit l'équipe à s'intéresser aux gènes *CLAVATA1* et *CLAVATA3*, d'autres gènes appartenant à la même voie de signalisation qui régule la taille du méristème caulinaire. Alors que les mutants *clavata1* présentent aussi une perte de sensibilité, les mutants *clavata3* ne semblent pas affectés en réponse à *R. solanacearum*. L'élucidation des mécanismes sous-tendant la résistance accrue des mutants *clv1* en réponse à *R. solanacearum* a fait l'objet de ma thèse.



**Figure 25. Organisation du méristème caulinaire (MC) d'Arabidopsis (D'après Carles & Fletcher, 2003)**

Coupe à travers le MC d'une inflorescence et de ses deux méristèmes floraux (MF) adjacents réalisés en microscopie confocale à balayage laser.

Les couleurs permettent de distinguer les 3 différentes couches cellulaires: les couches épidermiques (L1) et sous-épidermiques (L2), respectivement en violet et en rouge composant la « tunica », et les couches internes formant le « corpus » (L3) en vert. Les flèches indiquent l'orientation des divisions.

Les contours noirs représentent les frontières approximatives entre les différentes zones méristématiques: la zones périphériques (ZP), la zone « rib » (ZR) et la zone centrale (ZC).

La zone délimitée par les pointillés bleus correspond approximativement au centre organisateur.

## PARTIE V : VOIE DE SIGNALISATION *CLAVATA*

### Le méristème caulinaire

#### 1. Généralités

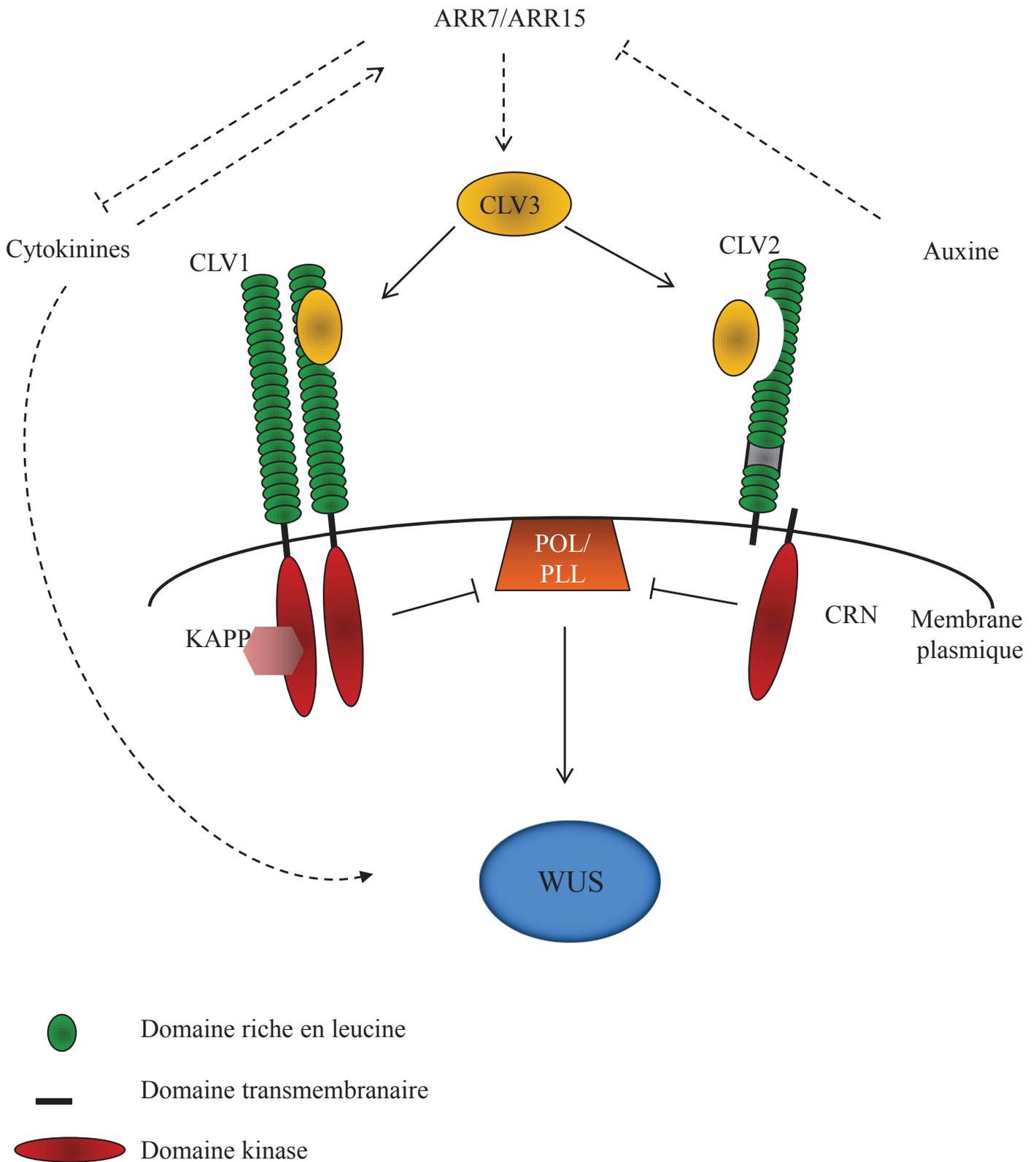
Au cours de leur croissance, les plantes produisent continuellement de nouveaux organes à partir de cellules souches localisées au niveau des méristèmes. Ce réservoir de cellules indifférenciées, ou cellules souches, est maintenu grâce à des divisions cellulaires permanentes. Au niveau de la partie aérienne, les cellules souches sont localisées dans une structure spécialisée appelée méristème caulinaire, et restent pluripotentes grâce à des signaux issus des cellules voisines. Le méristème caulinaire génère toutes les parties aériennes des plantes supérieures au cours de leur vie. Une partie des cellules en division se déplace vers la périphérie du méristème caulinaire où elles se différencieront et donneront naissance à des nouveaux organes tandis que d'autres restent au centre du méristème caulinaire pour maintenir un réservoir de cellules souches (Fig. 25). L'équilibre entre ces deux destins cellulaires est indispensable pour un développement normal.

#### 2. Structure

Chez les angiospermes, le méristème caulinaire est organisé en couches cellulaires et en domaines distincts (Fig. 25).

Le méristème caulinaire d'*A. thaliana* est composé de 3 couches cellulaires qui diffèrent principalement par la façon dont les cellules se divisent (Irish & Sussex, 1992 ; Steeves & Sussex, 1989). Dans les couches L1 et L2, formant ce qu'on appelle « tunica », les cellules se divisent de manière anticline, parallèlement à la surface du méristème caulinaire et forment ainsi des couches unicellulaires. Elles donneront respectivement naissance aux couches épidermiques et sous-épidermiques des tiges, des feuilles et des fleurs. Les plans de division des cellules de la couche L3 sont quant à eux aléatoires, formant ainsi une couche multicellulaire appelée « corpus ».

Le méristème caulinaire peut aussi être divisé en domaines fonctionnels distincts. Les zones périphériques contribuent à la formation des organes latéraux. La zone « rib » fournit les cellules pour la croissance de la tige. Enfin, la zone centrale est la zone où les divisions cellulaires permettent d'une part le déplacement progressif des cellules filles vers les zones périphériques (couches L1 et L2) et d'autre part, le renouvellement continu des cellules indifférenciées (couche L3 aussi appelée centre organisateur).



**Figure 26. Représentation schématique de la boucle de régulation CLV3-WUS**

CLV3 est sécrétée par les cellules de la zone centrale et initie une communication intercellulaire visant à restreindre l'expression de WUS au niveau du centre organisateur (bleu). La perception de CLV3 se produit à travers différents complexes de récepteurs membranaires. Ce réseau est connectée aux voies de signalisation des cytokines et de l'auxine par l'intermédiaire des ARR7et ARR15

### 3. Régulation de la maintenance du méristème caulinaire

Le méristème caulinaire, structure dynamique, est régulé par des voies de signalisation complexes dans lesquelles l'activité de certains gènes est cruciale.

#### 3.1. Voie CLAVATA3-WUS (Fig. 26)

Chez *A. thaliana*, la voie de signalisation la mieux décrite dans la mise en place et la régulation du méristème caulinaire fait intervenir des protéines appelées CLAVATA (CLV), dont la fonction est de limiter l'accumulation de cellules souches au sein du méristème caulinaire. Parmi elles, CLV3, un polypeptide, est le ligand de différents complexes de récepteurs (CLV1, CLV2,...). La perception de CLV3 déclenche une voie de signalisation qui réprime *WUS*, codant pour un facteur de transcription dont le domaine d'expression définit un espace dans lequel les cellules restent à l'état indifférencié. *WUS* active l'expression de *CLV3*, formant ainsi une boucle de régulation négative qui permet de constituer un équilibre entre l'accumulation de cellules souches et l'organogenèse (Fig. 27a) (Brand *et al.*, 2000 ; Schoof *et al.*, 2000). La mutation de *CLV3* ou de l'un de ses récepteurs entraîne l'accumulation incontrôlée de cellules souches au sein du méristème caulinaire, conséquence de la surexpression de *WUS* qui n'est alors plus réprimé (Fig. 27b). A l'inverse, la surexpression de *CLV3* supprime l'expression de *WUS* (Fig. 27c), le réservoir de cellules souches n'est alors pas maintenu et l'activité du méristème caulinaire ainsi que la croissance de la partie aérienne de la plante s'arrête prématurément (Brand *et al.*, 2000).

##### 3.1.1. Les composants de la voie de signalisation

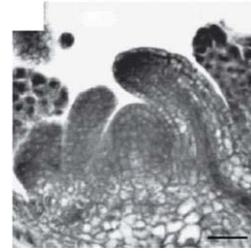
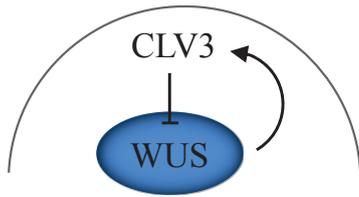
###### 3.1.1.1. *CLV3*

*CLV3* fait partie de la famille *CLV3/ESR (CLE)*, constituée de 25 membres chez *A. thaliana*, au sein de laquelle, un court domaine *CLE* est très conservé dans la partie C-terminale (Cock & McCormick, 2001). La sécrétion de *CLV3* dans l'espace extracellulaire, ainsi que les glycosylations qu'il subit, sont déterminantes pour sa fonction biologique (Rojo *et al.*, 2002 ; Ohya *et al.*, 2009). La forme active de *CLV3* est un glycopeptide de 13 acides aminés qui agit en tant que signal intercellulaire dans le méristème caulinaire et qui est perçu par différents complexes de récepteurs.

###### 3.1.1.2. *CLV1 (et ses homologues)*

L'un des complexes protéiques percevant *CLV3* est un homodimère de la protéine *CLV1*, un récepteur de type *LRR-RLK* (Fig. 26). *CLV1* est aussi capable de former des complexes avec

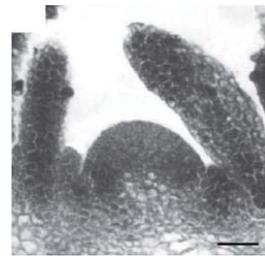
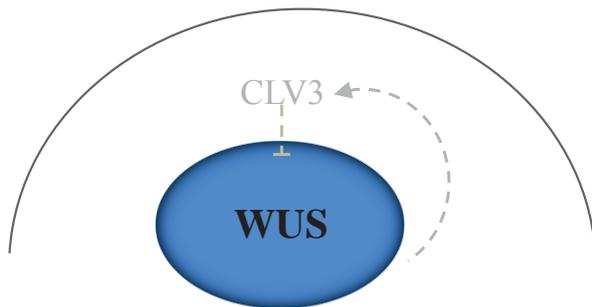
(a)



Prolifération des cellules souches normale

---

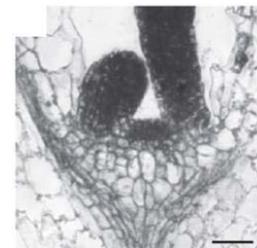
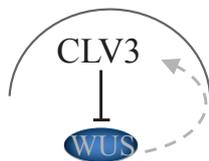
(b)



Prolifération des cellules souches intense

---

(c)



Prolifération des cellules souches réduite

**Figure 27. La boucle de régulation CLAVATA3-WUS régule la taille du méristème caulinaire**

A gauche, la représentation schématisée de l'interaction entre CLAVATA3 et WUS dans différents fond génétique. La zone bleue représente le domaine d'expression de WUS au niveau du centre organisateur et les protéines non fonctionnelles sont notées en gris. A droite, les coupes longitudinales du méristème caulinaire de plantules d'Arabidopsis de 7 jours correspondant à chaque situation schématisée sans la partie gauche (D'après Carles & Fletcher, 2003).

(a) Wild Type

(b) *clv3* mutant

(c) *wus* mutant

ses deux plus proches homologues, BAM1 et BAM2. Tout comme CLV1, ces deux protéines sont aussi capables de se lier à CLV3 (Ogawa *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2010). Elles présentent une redondance fonctionnelle avec CLV1 dans la zone centrale du méristème caulinaire mais semblent posséder d'autres rôles dans la périphérie du méristème caulinaire, notamment dans la formation d'organes (De Young *et al.*, 2006 ; De Young & Clark, 2008). La perception de CLV3 entraîne l'endocytose puis la dégradation de CLV1 dans des vacuoles lytiques, probablement pour réguler son activité (Nimchuk *et al.*, 2011).

#### 3.1.1.3. CLV2 et CRN

Un autre complexe protéique capable de percevoir CLV3 est composé de CLV2, un LRR-RLP (Fig. 26) (Jeong *et al.*, 1999) et de CORYNE (CRN), une pseudokinase membranaire (Muller *et al.*, 2008 ; Miwa *et al.*, 2008). CLV2 possède la capacité de se lier à CLV3 et la transduction du signal s'effectuerait *via* CRN par un mécanisme non identifié (Bleckmann *et al.*, 2010 ; Zhu *et al.*, 2010 ; Guo *et al.*, 2010).

Les phénotypes développementaux provoqués par des mutations dans les gènes codant ces différents récepteurs indiquent que ces deux types de complexes protéiques agissent en parallèle pour restreindre le domaine d'expression de WUS au sein du centre organisateur (Fig.26) (Brand *et al.*, 2000 ; Schoof *et al.*, 2000).

#### 3.1.1.4. WUS

WUSCHEL (WUS), un facteur de transcription à homéodomaine, est exprimé spécifiquement au niveau du centre organisateur où il maintient les cellules dans un état indifférencié (Van der Graaff *et al.*, 2009). WUS est un des premiers gènes exprimés au sein du méristème (Mayer *et al.*, 1998) et sa mutation entraîne des défauts de spécification des cellules et conduit à une terminaison prématurée de l'activité du méristème caulinaire (Fig. 27c) (Laux *et al.*, 1996). Sa régulation fine est déterminante pour maintenir la quantité de cellules souches constante dans le méristème caulinaire.

#### 3.1.1.5. Les protéines phosphatase

Les composants intracellulaires de la voie de signalisation CLV identifiés sont peu nombreux. Parmi eux, POLTERGEIST (POL) et PLL1, sont deux protéines phosphatases localisées au niveau de la membrane plasmique (Gagne & Clark, 2010). Elles régulent positivement l'activité transcriptionnelle de WUS et leur activité est réprimée par les différents complexes de récepteurs percevant CLV3.

Une autre phosphatase appelée KAPP, régule négativement la transduction du signal de CLV1 en déphosphorylant son domaine kinase (Stone *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 1997 ; Trotochaud *et al.*, 1999).

### 3.2. Voie ShootMeristemLess (STM)

Des cribles de mutants à la recherche de phénotypes développementaux au niveau du méristème caulinaire ont permis d'identifier une voie parallèle à la voie CLV, nécessaire à la mise en place et à la maintenance du méristème caulinaire. Cette voie passe principalement par *STM*, un facteur de transcription de la famille KNOX1 (KNOtted-like homeoboX class1). Sa fonction est de réprimer la différenciation dans le méristème caulinaire afin de permettre la prolifération cellulaire (Long *et al.*, 1996). Les mutants *stm* sont affectés dans la mise en place du méristème caulinaire et la croissance de leur partie aérienne s'arrête à deux cotylédons fusionnés. *STM* et *WUS* agissent principalement de manière indépendante même si la surexpression de *WUS* est capable de compléter partiellement le mutant *stm* (Lenhard *et al.*, 2002).

### 3.3. Voies hormonales

Bien que les informations sur les mécanismes cellulaires contrôlés par les phytohormones dans le méristème caulinaire soient limitées, un certain nombre d'études leur attribue un rôle dans la maintenance du méristème caulinaire ainsi que dans la différenciation des organes.

#### 3.3.1. Les cytokinines (CKs)

Dans une culture de tissus végétaux, les CKs stimulent la formation de méristèmes caulinaires (Skoog & Miller, 1957). Par ailleurs, l'inactivation simultanée de gènes codant les récepteurs de CKs se caractérise par un méristème caulinaire de taille réduite (Higuchi *et al.*, 2004 ; Nishimura *et al.*, 2004) et la perte totale de la capacité à percevoir les CKs empêche la mise en place du méristème caulinaire accompagnée d'un arrêt prématuré de la croissance de la partie aérienne (Skylar *et al.*, 2010). Ces données indiquent que les CKs sont essentielles pour l'activité du méristème caulinaire.

Chez *A. thaliana*, l'expression de 4 ARR, connus pour leur effet inhibiteur sur la voie de signalisation des CKs, est réprimée directement par *WUS* (Leibfried *et al.*, 2005). La surexpression de l'un de ces ARRs, *ARR7*, induit l'arrêt prématuré de l'activité du méristème (Leibfried *et al.*, 2005), alors que la mutation de son orthologue chez le maïs provoque un

élargissement du méristème caulinaire (Giulini *et al.*, 2004). Ces *ARRs* semblent donc réguler négativement la taille du méristème.

Les cytokinines répriment l'expression de *CLV1* et par ce biais, activent indirectement l'expression de *WUS* (Buechel *et al.*, 2010 ; Lindsay *et al.*, 2006). Cependant, l'activation de l'expression de *WUS* par les cytokinines passe aussi par des voies de signalisation indépendante de la voie *CLV* (Gordon *et al.*, 2009). L'expression de *WUS* et la voie de signalisation des cytokinines formeraient une boucle de régulation positive afin de maintenir le réservoir de cellules souches.

### 3.3.2. L'auxine (*AIA*)

L'*AIA* quant à elle, est impliquée dans l'initiation de la formation des organes latéraux. Les concentrations maximales d'*AIA* sont d'ailleurs détectées à la périphérie du méristème caulinaire (Benkova *et al.*, 2003 ; Reinhardt *et al.*, 2000 & 2003). L'*AIA* est aussi un signal très important dans la régulation de la phyllotaxie (Kuhlemeier, 2007) notamment en réprimant 2 *ARRs* de type A, *ARR7* et *ARR15*, également réprimés par *WUS* (Zhao *et al.*, 2010). Les voies de l'auxine et des cytokinines convergent donc au niveau de ces deux *ARRs* pour réguler le fonctionnement du méristème caulinaire (Zhao *et al.*, 2010) (Fig. 26).

Comme nous le verrons ultérieurement, certaines composantes de la perception de *CLV3* possèdent d'autres fonctions, en particulier dans différents types d'interactions avec des microorganismes symbiotiques ou pathogènes.

# Résultats

---

---

## **RESULTATS**

### **PARTIE I : ROLE DE LA PROTEINE CLV1 DANS LA SENSIBILITE d'*Arabidopsis thaliana* A LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE *Ralstonia solanacearum***

Mathieu Hanemian<sup>1,2</sup>, Xavier Barlet<sup>1,2</sup>, Céline Sorin<sup>3</sup>, Koste A. Yadeta<sup>4</sup>, Ton Timmers<sup>1,2</sup>, Dominique Tremousaygue<sup>1,2</sup>, Harald Keller<sup>5</sup>, Rüdiger Simon<sup>6</sup>, Bart P. Thomma<sup>4</sup>, Caroline Hartmann<sup>7</sup>, Martin Crespi<sup>3</sup>, Laurent Deslandes<sup>1,2</sup> and Yves Marco<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>2</sup>CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>3</sup>CNRS, Institut des Sciences du Végétal, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

<sup>4</sup>Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

<sup>5</sup>UMR-Interactions Biotiques et Santé Végétale, INRA1301-CNRS6243-Université Nice-Sophia Antipolis, 06903, Sophia Antipolis, France.

<sup>6</sup>Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität, Universitätstr. 1, 40225, Düsseldorf, Germany.

<sup>7</sup> Université Paris Diderot, 5 rue Thomas Mann 75205 Paris Cedex 13, France

## Résumé

Les connaissances actuelles reliant le développement et les maladies des plantes sont peu nombreuses. Dans cette étude, nous montrons que l'inactivation du gène *CLAVATA1*, codant pour un "receptor-like kinase" qui joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches au niveau du méristème caulinaire, accroît la résistance à la bactérie *Ralstonia solanacearum*. L'inactivation des gènes *CLAVATA2* et *CORYNE*, codant respectivement pour un "receptor-like protein" et une pseudokinase, conduit également à une baisse de la sensibilité à la bactérie. Tous les composants testés appartenant à la voie de signalisation CLAVATA ne sont pas impliqués dans la réponse de la plante à la bactérie. La résistance accrue des mutants *clv1* est aussi indépendante des voies de signalisation du SA, JA et ET. Plusieurs gènes *NF-YA*, appartenant à la famille de facteurs de transcription se liant aux boîtes CCAAT, et connus pour être la cible de la famille de microARNs miR169, ont été identifiés par une analyse transcriptomique comparative dans les feuilles et les racines de plantes *clv1* infectées et non-infectées. Une corrélation entre la surexpression de certains gènes *NF-YA* et la réduction de l'accumulation des miR169 a été observée dans les plantes *clv1*. De plus, la surexpression de certains membres de la famille *MIR169* supprime la résistance accrue des plantes *clv1*. Nos résultats soutiennent le rôle direct de ces microARNs dans la résistance à la bactérie.

**Disruption of the receptor-like kinase *CLAVATA1* gene leads to decreased miR169 accumulation and enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* (in preparation)**

Mathieu Hanemian<sup>1,2</sup>, Xavier Barlet<sup>1,2</sup>, Céline Sorin<sup>3</sup>, Koste A. Yadeta<sup>4</sup>, Ton Timmers<sup>1,2</sup>, Dominique Tremousaygue<sup>1,2</sup>, Harald Keller<sup>5</sup>, Rüdiger Simon<sup>6</sup>, Bart P. Thomma<sup>4</sup>, Caroline Hartmann<sup>7</sup>, Martin Crespi<sup>3</sup>, Laurent Deslandes<sup>1,2</sup> and Yves Marco<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>2</sup>CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France.

<sup>3</sup>CNRS, Institut des Sciences du Végétal, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

<sup>4</sup>Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, The Netherlands.

<sup>5</sup>UMR-Interactions Biotiques et Santé Végétale, INRA1301-CNRS6243-Université Nice-Sophia Antipolis, 06903, Sophia Antipolis, France.

<sup>6</sup>Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität, Universitätstr. 1, 40225, Düsseldorf, Germany.

<sup>7</sup> Université Paris Diderot, 5 rue Thomas Mann 75205 Paris Cedex 13, France

\* To whom correspondence should be addressed:

Yves Marco

Email : yves.marco@toulouse.inra.fr

Tel: 33-(0)5-61-28-55-09; Fax : 33-(0)5-61-28-50-6

## Abstract

Limited knowledge currently exists regarding links between development and plant disease. Here, we show that disruption of the receptor-like kinase (RLK) *CLAVATA1* (*CLV1*), a crucial component in the regulation of stem cell homeostasis at the shoot apical meristem (SAM), enhanced resistance to the soil-borne bacterium *Ralstonia solanacearum*. Inactivation of the receptor-like protein *CLAVATA 2* (*CLV2*) as well as the pseudokinase *CORYNE* (*CRN*) genes also led to a decreased susceptibility to the pathogen. All tested downstream components of the *CLV* signalling did not however affect the plant response to the bacteria, which was also independent of salicylic acid, jasmonate and ethylene signalling. Several *NF-YA* genes which encode CCAAT-box binding transcription factors and are known targets of the miR169 family, were identified by comparative transcriptomic analyses in roots and leaves of non-inoculated and infected *clv1* plants. A correlation between the up-regulation of several of these genes and a decrease of miR169 concentration was observed in *clv1* plants. In addition, overexpression of some members of the mir169 family suppresses the enhanced resistance of *clv1* plants. Our data support a direct role of these microRNAs in resistance to the bacteria.

## Introduction

Many aspects of plant growth and development as well as responses to biotic and abiotic stresses are controlled by a large family of receptor-like kinases (Gish and Clark, 2011). Among those, leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs) belong to the largest RLK subfamily and consist of extracellular repeats linked by a transmembrane domain to a kinase domain. These receptors located at the plasma membrane play crucial roles in the perception of various extracellular signals but despite their importance, the functions of most LRR-RLKs are yet to be elucidated. However, from some well studied examples including Brassinosteroid Insensitive 1 (BRI1) and Flagellin Insensitive 2 (FLS2), it appears that LRR-RLKs can regulate distinct signalling pathways involved in plant immunity and development. BRI1, the receptor for the brassinosteroid growth hormones (Wang et al., 2001) interacts with a second LRR-RLK named BAK1 upon ligand binding (Li et al., 2002; Nam et al., 2002). FLS2, another LRR-RLK involved in plant immunity, senses flg22, a conserved 22 amino acid epitope of bacterial flagellin (Chinchilla et al., 2006). Upon stimulation by flg22, FLS2 heteromerizes with BAK1, which initiates a signalling cascade. Similarly, other somatic embryogenesis RLKs (SERKs), such as BAK1, intervene as co-receptors in different defense-related and developmental signalling pathways *via* their interactions with distinct ligand-binding LRR-RLKs (Roux et al., 2011).

CLV1, another well studied member of this family, is crucial for the regulation of stem cell specification at shoot and flower meristems in *Arabidopsis*. *CLV1* is expressed at the centre of the SAM and the extracellular domain of the protein possesses the ability to bind CLV3 peptides (Clark, 1997; Ogawa et al., 2008; Ohyama et al., 2009). These peptides are members of the CLAVATA3 (CLV3)/ESR-related (CLE) family of small polypeptides that mediate intercellular signaling events in plants. In the SAM, another receptor complex recognizing CLV3 involves CLV2, an LRR receptor-like protein lacking a cytoplasmic domain. CLV2 acts in concert with CORYNE (CRN)/SUPPRESSOR OF *LLP1* 2 (SOL2), a membrane associated pseudokinase, to perceive CLV3 (Casamitjana- Martínez et al., 2003; Kayes and Clark, 1998; Miwa et al., 2008; Miwa et al., 2009; Müller et al., 2008; Nimchuk et al., 2011). A crosstalk may exist between the 2 pathways since a weak interaction was detected between the CRN/SOL2-CLV2 complex and homo-oligomers of CLV1 (Bleckmann et al., 2010; Zhu et al., 2010).

Components of the CLAVATA pathway are also involved in plants microbe-interactions. *CLE-like* genes are indeed present in various cyst nematodes and are required for successful

infection (Wang et al., 2005; Wang et al., 2010; Lu et al., 2009). This CLE signalling is dependent upon CLV2 and CRN but additional receptors might include CLV1 and/or BAM1 and BAM2, 2 closely CLV1-related receptors (DeYoung et al., 2006; Replogle et al., 2011). Additionally, loss-of-function mutations in *CLV1* orthologues in various legumes lead to increased nodulation (Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005).

*Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt, is a soil bacterium which can naturally infect a wide range of host plants through the root system. Mechanisms controlling infections caused by this pathogen remain poorly understood (Hayward, 1991). In *Arabidopsis thaliana*, ethylene and ABA signalling play important functions in wilt symptom development induced by *R. solanacearum* (Hirsch et al., 2002; Hu et al., 2008). Several *Arabidopsis* mutants altered in disease development have been characterized. For example, mutations in any of the three *Arabidopsis* cellulose synthases (CESAs) required for secondary cell wall formation (IRX1/CESA8, IRX3/CESA7, and IRX5/CESA4) conferred decreased susceptibility to this bacterium (Hernandez-Blanco et al., 2007). Constitutive up-regulation of ABA-regulated genes encoding antimicrobial peptides and regulators of secondary metabolites biosynthesis in these mutants may explain this increased resistance.

In this study, we report that CLV1 as well as CLV2 and CRN are required for full susceptibility in response to virulent strains of *R. solanacearum*. The increased resistance to the bacteria of plants mutated in any one of these genes was independent of classical defense pathways but results from the decreased accumulation of miR169, a microRNA family targeting the CCAAT box-binding transcription factors NF-YA.

## Results

### ***clv1* mutants are highly resistant to the soil borne pathogen *R. solanacearum***

To identify Arabidopsis developmental genes affecting disease development caused by the soil borne pathogen *R. solanacearum* Rd15, two alleles of *clv1*, *clv1-12* and *clv1-13* were inoculated with bacteria. Both mutants showed a significant delay in the appearance of wilt symptoms (Fig.1a). At 6 days, wild type plants were indeed almost completely wilted while slight symptoms started to appear in *clv1* mutants. Some light disease symptom were generally observed in mutant plants 7 to 10 days after inoculation but remained limited (Fig.1b). Bacterial multiplications were estimated in *clv1* and *wt* plants. Whereas *R. solanacearum* multiplied extensively in control plants, its proliferation was severely affected in *clv1* plants (Fig.1c).

*clv1* alleles present a great diversity of phenotypes ranging from weak alleles such as *clv1-12* and *clv1-13* whose phenotypes are similar to *wt* plants, to alleles exhibiting high increase in stem cell number (Clark et al., 1993; Diévarit et al., 2003). To check whether there might be a correlation between the severity of the *clv1* phenotypes and the resistance to *R. solanacearum*, responses of an intermediate and a strong allele, *clv1-1* and *clv1-4*, respectively, were tested. Both mutants were more resistant to the pathogen although to a lower extent than the weak alleles (Fig. 1Sa). However, weak alleles and strong alleles were in a Ws-2 and Ler-0 genetic backgrounds, respectively, the latter one being more susceptible to strain GMI1000 of *R. solanacearum*. Measures of bacterial internal growth also indicated a correlation between delayed symptom development and lower bacterial concentrations in *clv1* plants compared to their *wt* counterparts (Fig. 1Sb).

The resistance phenotype to *R. solanacearum* was clearly caused by loss of *CLV1* function, since complementation of *clv1-12* and *clv1-13* plants with a *ProCLV1::CLV1* construct led to a fully restored susceptibility to *R. solanacearum* (Fig.1a and 1b). A concomitant increase in bacterial multiplication correlated with stronger wilt disease symptoms in the complemented *clv1* lines (Fig.1c).

To test whether the increased resistance was specific of the Rd15 strain, we inoculated the *clv1* mutants with other strains belonging to the different phylotypes of *R. solanacearum* (Prior et al., 2005; Guidot et al., 2007). Symptom development was also strongly delayed indicating that *CLV1* is required for disease development caused by different bacterial strains (Table S1). Similarly, responses to other pathogens including bacteria and fungi, were also

tested. *Clv1* mutants were as susceptible as *wt* plants to most pathogens (Table S2). Disease development was however stronger in response to 2 necrotrophic pathogens, *Botrytis cinerea* and *Plectosphaerella cucumerina*.

### **Phloem-specific expression of *CLVI* is sufficient to restore *clv1* susceptibility to *R. solanacearum***

Little is known of *CLVI* expression despite numerous studies dedicated to its function in meristematic tissues. Cambial and secondary phloem expression of this gene was however reported (An et al., 2004; Zhao et al., 2005). GUS activity driven by the *CLVI* promoter was indeed found to be mainly restricted to vascular tissues in leaves and in the phloem and the pericycle of roots (Fig.2). Since *R. solanacearum* propagates *via* vascular tissues to colonize host plants (Hayward 1991), it was of interest to determine the importance of *CLVI* vascular expression in the resistance to the bacteria.

*Clv1-12* plants expressing the *CLVI* gene under the control of the phloem-specific *SUC2* promoter (*Sucrose Transporter 2*) were generated and challenged with strain Rd15 (Truernit and Sauer, 1995; Mukhtar et al., 2008). Transformed *clv1* lines were fully susceptible to the pathogen and rapid wilt symptom development in these plants was associated to a bacterial multiplication comparable to that of *wt* plants (Fig.3). Since the *AtSUC2* promoter is expressed specifically in the companion cells of the phloem and not in the meristem (An et al., 2004), these data suggest that *CLVI* requirement for wilt disease development is not related to its function in meristem development.

We then checked whether bacterial inoculation affected *CLVI* expression but no alteration was detected in plants expressing the *proCLVI::GUS* construct after inoculation by *R. solanacearum* (data not shown). Transcript accumulation was evaluated by qRT-PCR and confirmed this observation (Fig S2).

### ***Clv1*-mediated resistance to *R. solanacearum* is SA-, ET-, and JA-independent**

An intricate signalling network involving salicylic acid (SA), ethylene (ET), and jasmonic acid (JA) fine tunes plant responses to biotic stress. In *A. thaliana*, symptom production in response to virulent strain of *R. solanacearum* is ET- and JA-dependent but does not require SA (Hirsch et al., 2002; Hernandez-Blanco et al., 2007). To determine whether *clv1*-mediated resistance to the bacteria relied on these defense pathways, *clv1-12 sid2-1* (SA), *clv1-12 jar1-1* (JA), *clv1-12 ein2-1* (ET) double mutants were generated and challenged by the pathogen. Neither SA nor JA contributed to the reduced susceptibility of *clv1-12* plants (Fig.4).

Responses to the bacteria of *clv1-12 sid2-1* and *clv1-12 jar1-1* plants were indeed similar to those of their *wt* counterparts. The inactivation of the ET pathways rendered *clv1-12 ein2-1* plants more resistant to the pathogen, demonstrating an additive effect of both mutations (Fig. 4). These data indicated that none of the signalling pathways did affect *clv1*-mediated resistance.

### **Components of the CLV perception contribute to the reduced susceptibility to *R. solanacearum***

The CLAVATA signalling pathway include the small secreted CLV3 peptide, the RLKs CLV1, BAM1 and BAM2, and CORYNE (CRN), and the receptor-like protein CLV2 (Clark et al., 1993; Clark et al., 1997; Kayes and Clark, 1998; Jeong et al., 1999; Müller et al., 2008). Recent data suggest that CLV3 perception is achieved *via* the formation of at least two complexes, CLV1/BAM1 and CLV2/CRN, acting in parallel pathways (Guo et al., 2010; Durbak and Tax, 2011). These perception events ultimately lead to the restriction of the stem cell-promoting transcription factor *WUSCHEL* (*WUS*) to a subset of SAM cells (Schoof et al., 2000; Brand et al., 2000). Arabidopsis mutants inactivated in genes encoding these components were challenged by *R. solanacearum* in order to test their potential implication in the *clv1*-mediated resistance. The inactivation of both *CLV2* and *CRN* led to a drastic reduction of symptom development after bacterial challenge associated to an *in planta* decreased bacterial multiplication (Fig. S3). In contrast, responses similar to those of wild-type susceptible plants were observed in *clv3*, *bam1-1*, *bam2-1* and *wus-1* plants (Table 1). Arabidopsis mutants in the *KAPP*, *PLL*, *POL* genes also developed comparable disease symptoms as those of *wt* plants after challenge by *R. solanacearum* (Stone et al., 1998; Yu et al., 2000). These results suggest that some CLV3 perception components are required for full susceptibility to the pathogen whereas downstream signalling factors are dispensable.

### **Global gene expression analysis of the *clv1* plants**

To unravel the transcriptional networks of *CLV1* in response to *R. solanacearum*, the expression profiles of *clv1-12* leaves and roots were compared with those of *wt* plants, before inoculation and at the appearance of the first wilting symptoms, three days after inoculation with strain Rd15, using Affymetrix ATH1 GeneChips. In uninfected *clv1-12* plants, 108 genes and 331 were constitutively up-regulated in roots and in leaves, respectively, compared to *wt* plants (Fig. S4). A significant proportion of the up-regulated genes in *clv1-12* leaves were responsive to biotic and abiotic stress (Fig. S5). Only 5 genes were up-regulated both in uninfected root and leaf tissues, among which three *NF-YA* genes, *NF-YA2*, *NF-YA3* and *NF-*

*YA10* (Fig. S4). NF-Y is a ubiquitous CCAAT-binding transcription factors family composed of NF-YA (also known as HAP2 or CBFp), NF-YB and NF-YC (McNabb et al., 1995; Mantovani, 1999; Maity and de Crombrughe 1998; Siefers et al., 2009). In Arabidopsis, ten genes encode the NF-YA subunits.

In inoculated *clv1-12* leaves, 2740 genes were found to be up-regulated compared to wild-type plants and 494 genes in roots, (Fig. S4a). The important differences in gene reprogramming in *clv1* roots and leaves constituted one of the most striking features of this analysis. Indeed, only 18% of genes detected in infected *clv1-12* roots were also up-regulated in leaves (Fig. S4b), including four *NF-YA* genes (*NF-YA2*, *NF-YA3*, *NF-YA6*, *NF-YA8* and *NF-YA10*) that were up-regulated in both tissues. In contrast some other genes such as *NF-YA5*, a drought responsive gene, were down-regulated in infected leaves and up-regulated in infected roots (Table 2).

Inoculation with *R. solanacearum* affected drastically *clv1* global gene expression and led also to noticeable changes in some cytokinin- and auxin-related genes (Table 2), two phytohormones playing important roles for meristem regulation (Zhang et al., 2011) and in plant defense (Navarro et al., 2006 & 2008; Truman et al., 2010; Argueso et al., 2012). The expression of several important components in cytokinin signalling such as eight type-A *ARR* (two-component response regulator) as well as *AHP4* (Histidine-containing PhosphoTransfer protein 4) was indeed up-regulated in infected *clv1* leaves (Brandstatter and Kieber 1998; D'Agostino and Kieber 1999; Hutchison et al., 2006). In both infected *clv1* roots and leaves, *ARF* genes (auxin-response factor) were also activated.

Interestingly, up-regulated genes in *clv1* inoculated leaves comprised a high proportion of genes involved in the translation and transcription machinery and to a lower extent, in defense such as several *WRKY* genes, *FLS2* and various abiotic stress-responsive genes (Table S3-S10). 2320 genes were down-regulated genes in *clv1*-infected leaves compared to *wt* plants (Fig. S4) and corresponded to a similar set of genes than those activated during wilt disease development, including as reported previously a high proportion of ABA-related genes (Hu et al., 2008). As observed for the up-regulated genes, only 13.8% of the genes were repressed both in diseased leaves and roots.

qRT-PCR experiments were performed on a selected set of 18 genes including some *NF-YA* genes of interest (Fig. 5 and Fig. S6) and validated the microarray data.

## **miR169 plays a major role in disease development to *R. solanacearum***

To check the involvement of *NF-YA* genes in the *clv1*-induced resistance, responses to the pathogen of several *Arabidopsis* mutants affected in *NF-YA3*, *NF-YA5* or *NF-YA8* as well plants overexpressing *NF-YA2* were tested. Their responses to *R. solanacearum* were similar to those of *wt* plants (data not shown), suggesting that the concerted action of several *NF-YA* genes was probably required to enhance resistance of plants to the bacteria.

In *Arabidopsis*, the expression of most *NF-YA* genes is repressed by a microRNA family, miR169 (Li et al., 2008; Zhao et al., 2009; Crespi, unpublished data). Responses of *Arabidopsis* plants altered in the expression of some members of the miR169 family to the bacteria were therefore tested. Plants overexpressing *MIR169a* or *MIR169d* shown to target several *NF-YA* genes (*NF-YA1*, *NF-YA3*, *NF-YA5*, *NF-YA6*, *NF-YA8*, *NF-YA9* and *NF-YA1*, *NF-YA2*, *NF-YA9*, *NF-YA10* respectively) displayed a higher susceptibility to *R. solanacearum* (Martin Crespi unpublished data). Plants overexpressing *MIR169a* exhibiting a higher susceptibility than the ones expressing *MIR169d* (Fig. 6a). This increased susceptibility correlated with a slight increase in bacterial multiplication (Fig. 6b). Conversely, resistance to the pathogen of plants expressing a construct that mimics a modified target of miR169, leading to its sequestration and to the subsequent activation of *NF-YA* genes, was enhanced (Franco-Zorilla et al., 2007). These plants exhibited as expected a lower bacterial multiplication (Fig. 6c and d).

*Clv1* plants expressing *MIR169a* or *MIR169d* under the control of a 35S constitutive promoter were generated and shown to develop more pronounced disease symptoms than *clv1* plants upon inoculation by the pathogen, associated to a concomitant increase in bacterial multiplication (Fig. 6e and f). These data illustrate the importance of both miR169a and miR169d and most probably of *NF-YA* genes, these being so far the only well established targets of these miR, in the *clv1*-increased resistance to *R. solanacearum*.

The higher expression of *NF-YA* genes in *clv1* plants prompted us to check whether miR169 levels were lower in the mutants. qRT-PCR experiments showed indeed that miR169 levels in *clv1* plants were approximately 5% and 20% of that of control plants in roots and in leaves, respectively (Fig. 6g). A slight decrease in miR169 accumulation was detected in *clv1* leaves upon inoculation by *R. solanacearum* but could be not measured in roots due the presence of soil contaminants in the RNA preparation.

## Discussion

Several members of the LRR-RLK family are used by plants to control both developmental processes as well as responses to various environmental stimuli. Among those, BAK1, originally identified as a key actor of brassinosteroid perception, is also a master regulator of plant innate immunity involving several pattern recognition receptors (PRR) such as FLS2 (Flagellin sensing 2) or EF-Tu that perceives bacterial elongation factor Tu (Chinchilla et al., 2009; Li 2010). These two receptors form a ligand-induced complex with BAK1 and other proteins, the SERK proteins, a subclass of plant RLKs (Schulze et al; 2010; Roux et al., 2011, Schwessinger et al., 2011).

Similarly, ERECTA, an LRR-RLK originally characterized for its role in plant organ development (Torii et al., 1996; van Zanten et al., 2010) but more recently shown to be involved in resistance to bacterial wilt (Godiard et al., 2003) and to the necrotrophic fungal pathogen *Plectosphaerella cucumerina* (Llorente et al., 2005; Sanchez-Rodriguez et al., 2009) provides another example of cross-talk between plant defense and developmental pathways mediated by RLKs.

In the present study, we provide the first evidence that CLV1, a LRR-RLK whose function in meristem differentiation is well documented, plays a major role in the Arabidopsis responses to the bacterial wilt causing agent, *R. solanacearum*. The *CLV1* gene is indeed required for full susceptibility to a broad range of *R. solanacearum* strains belonging to several phylotypes.

### ***clv1*-mediated resistance is uncoupled from CLV1 function in the apical meristem**

The receptor proteins CLV1, CLV2, CRN/SOL2 act in concert and in parallel to transmit the CLV3 signal (Schoof et al., 2000; Clark 2001; Müller et al., 2008; Kinoshita et al., 2010). In addition to *clv1* plants, *clv2* and *crn* mutants were also affected in their ability to develop wilt disease symptoms. No difference was observed in the responses to the pathogen of several RLK mutants including *fls2*, *tdr*, *bam1* and *bam2* (Hirakawa et al., 2008; Gómez-Gómez et al., 2000; De Young et al., 2006), illustrating also the high degree of specificity of *clv1* mutants towards *R. solanacearum*. The response of *clv2* was highly specific since this mutant was the only one exhibiting a decreased susceptibility among a collection of RLP mutants challenged with the bacteria (data not shown). In contrast, responses to the bacterial pathogen of plant mutants altered in different components of the CLAVATA downstream signalling

such as *wus*, *pol*, *plll* were similar to those of *wt* plants (Song et al., 2006). This result indicates that several components of the CLV3 perception are important for full susceptibility to the pathogen whereas downstream signalling actors are probably not involved in this process.

*Clv1* mutants exhibit phenotypes ranging from weak, intermediate and strong (Clark et al., 1993, 1997). *Clv1-12* and *clv1-13* mutants used in this study are null alleles and display a weak developmental phenotype whereas *clv1-1* and *clv1-4* exhibit an intermediate and strong phenotype, respectively (Dievart et al., 2003). All the alleles tested in this study were more resistant to the pathogen indicating that there was no correlation between the phenotypic severity of *clv1* alleles and the decreased susceptibility to *R. solanacearum*. This observation suggests that *clv1* and *clv2* responses to the pathogen may be uncoupled from its meristematic functions.

The observation that *clv1* mutants complemented with a *CLV1* gene whose expression is driven by the phloem-specific *SUC2* promoter, regained their full susceptibility to *R. solanacearum*, strengthened this hypothesis. Under the control of the *SUC* promoter, no *CLV1* expression is detectable in the SAM (An et al., 2004), which suggests that CLV1 function in wilt disease development is exerted in phloem companion cells. *WRKY27*, a gene whose inactivation led to delayed disease development to *R. solanacearum* was also active within the same cell type (Mukhtar et al., 2008). In contrast, *WRKY27* expression driven by the xylem-specific *4CL2* promoter did not restore full susceptibility to the pathogen (Mukhtar et al., 2008). Since *R. solanacearum* generally invades its hosts and multiplies within xylem vessels, communication between phloem and xylem *via* a mobile, small unidentified molecule may be required for *WRKY27* and *CLV1* proper function.

### ***Clv1-mediated* resistance is independent of SA-, ET-, and JA-Independent**

Classical defense hormone i.e. salicylic acid, ethylene and jasmonic acid were not involved in the decreased susceptibility of the *clv1* mutants towards *R. solanacearum*, as demonstrated by double mutant analysis. Our microarray data also showed that the expression of genes such as *PDF1.2* (JA/ET), or *PR1* (SA) were not deregulated in healthy or infected *clv1* plants, confirming that these pathways did not contribute significantly to the increased resistance of these mutants (Table S3 to S10). Similarly, the enhanced resistance of the *irx* mutants to the bacterial pathogen was also independent of these defense hormones and it was proposed that the *IRX* mutation generates a hostile environment enriched in antimicrobial compounds limiting pathogen colonization (Hernandez-Blanco et al., 2007). Other mutants such as *pmr5*

and *pmr6*, present an increased resistance to the powdery mildew species *Erysiphe cichoracearum* and *Erysiphe orontii*, also independent of these pathways (Vogel et al., 2002 and 2004)

### **Mir169 plays a major role in susceptibility to *R. solanacearum***

Small RNAs participate in plant disease resistance to various pathogens (Navarro et al., 2006; Li et al., 2010). This study highlights the critical role of miRNA169 in wilt disease development. This microRNA is involved in different stress responses such as drought, salinity, phosphate or nitrate starvations (Sunkar 2010; Zhao et al., 2011). Interestingly, miR169 accumulates to higher levels in phloem as compared to roots and shoots, which led to the hypothesis that miRNAs accumulating in this tissue might be candidates for information-transmitting molecules (Buhtz et al., 2010; Pant et al., 2009).

The importance of miR169 in wilt disease development was demonstrated by a) the increased susceptibility of *wt* plants overexpressing *MIR169a* or *MIR169d*, b) the increased resistance of *wt* plants expressing a *MIM169* construct leading to the sequestration of miR169 and the subsequent overexpression of several *NF-YA* genes, and c) the loss of resistance of *clv1* plants overexpressing *MIR169a* or *MIR169d*.

miR169 levels both in *clv1* roots and leaves were severely affected. The accumulation of other miRNAs, miR160 and miR167 controlling *ARF* gene expression, was also evaluated but no significant change was detected between healthy or infected *clv1* and *wt* plants (data not shown). The mechanisms underlying miR169 deregulation in *clv1* plants remain unexplained but might be caused by defects in genes associated with its biogenesis, processing and loading. Experiments are in progress to check which steps in these processes might be affected. Concerning miR169 targets, *NF-YA* genes constitute the obvious ones but other potential targets have been predicted but not validated so far (Pant et al., 2009).

### **Constitutive expression of several *NF-YA* genes in *clv1* plants is associated to *clv1*-mediated resistance**

The overexpression of several *NF-YA* genes in *clv1* mutants constitutes the most striking feature of the microarray analysis. The NF-Y complex is composed of three unique subunits, NF-YA, NF-YB and NF-YC in mammals and recognizes the CCAAT pentanucleotide and specific surrounding sequences with a high specificity (Hooft van Huijsduijnen et al, 1987 ; Dolfini et al., 2012). In contrast, many *NF-Y* subunit genes are present in the genome of

Arabidopsis (Gusmaroli et al., 2001; Siefers et al., 2009). Despite the recognized importance of NF-Y individual subunits in abiotic stress tolerance (Nelson et al., 2007; Li et al., 2008), regulation of flowering time (Ben-Naim et al., 2006; Cai et al., 2007), embryo and root development (Lee et al., 2003; Ballif et al. 2011), plastid biogenesis (Miyoshi et al., 2003), ABA signalling (Warpeha et al., 2007), and endoplasmic reticulum stress (Liu and Howell, 2010), the function of these genes remain poorly elucidated and so far, no single complete NF-Y complex has ever been reported in plants. Interestingly, most *NF-YA* genes present some level of vasculature expression, consistent with a potential role in the response to *R. solanacearum* (Siefers et al., 2009).

Several genes encoding NF-YA subfamily are affected in *clv1* plants. In comparison, only *NF-YB2*, *NF-YC2* and *NF-YC3* expressions are down-regulated in the mutant after pathogen challenge. This suggests that the activity of the NF-Y complex is mainly controlled by regulation of *NF-YA* gene expression, while *NF-YB* and *NF-YC* are ubiquitously expressed to levels relatively constant, which was already observed in other processes such as senescence (Breeze et al., 2011).

*NF-YA* genes exhibit a wide diversity of expression both in *clv1* plants and during infection: whereas *NF-YA2*, 3 and 8 genes are expressed at high levels both in healthy roots and leaves, the expression of *NF-YA 6*, 9 and 10 seems to be restricted to roots. Infection with *R. solanacearum* led to an alteration of the expression of most of these genes, some of them such as *NF-YA1*, 4, 5, 7 and 9, being down-regulated in this context. The inactivation and/or overexpression of some *NF-YA* genes did not affect the plant response to *R. solanacearum*, which may be explained by the redundancy between genes of this subfamily.

Little is known about the targets of the *NF-YA* genes in plants except for *NF-YA5*, a gene that controls the expression of a number of drought stress-responsive genes (Li et al., 2008).

### **Function of CLV1 in plant-microbe interactions**

The observation that *clv1*, *clv2* and *crn* plants displayed a decreased susceptibility towards the pathogen is intriguing and raises the question of their role and of a potential functional redundancy in this process. Testing the plant response of double mutants may provide some clues. However, as in *clv1* plants, decreased levels of miR169 were also detected in *clv2* plants, as well as the concomitant up-regulation of several *NF-YA* genes (data not shown). This suggests that similar mechanisms underlie the altered response to *R. solanacearum* of both mutants. One hypothesis would be that these receptors are part of (a) complex(es)

required for disease development. The modification or the absence of one of its components may lead to the sequestration/alteration of a plant factor required for disease development. Alternatively, this(ese) complex(es) may perceive bacterial components required for growth /colonization of the pathogen within the plant. In this context, CLV2 and CRN were recently shown to be required for perception of cyst nematode effector proteins that act as ligand mimics of plant CLE (CLV3/ESR) peptides (Wang et al., 2005; Lu et al., 2009; Wang et al., 2010 and 2011; Replogle et al., 2011). It was tempting to speculate that some *R. solanacearum* effector(s) may fulfil similar functions and be perceived by CLV3 receptors. Search for such components in the sequenced genomes of several strains of the bacteria was however unsuccessful. We cannot however exclude the possibility that the CLV3 receptors perceive some other unidentified bacterial components.

Beyond its role in SAM, CLV1 is also required for disease development caused by *R. solanacearum*, but affects also plant responses to two necrotrophic fungi, *P. cucumerina* and *B. cinerea*. Additionally, CLV1 plays also a central role in symbiotic interactions: mutations in several of its orthologs, such as *HARI* in *Lotus japonicus*, *NARK* in soybean, *SUNN* in *Medicago truncatula* (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002 ; Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005) lead to an increased number of nodules, often accompanied by an inability to regulate nodule number based on nitrogen status (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002 ; Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005). Whether miR169 is involved in these responses remain an open question which we would like to address in future studies.

The exact function of CLV3 receptors in wilt disease development and more generally during various plant-microbe interactions remain unresolved. However, our results show that miR169 and probably *NF-YA* genes play a crucial role in this process. Further investigation of the mechanisms underlying the decreased expression of this microRNA in *clv1* and *clv2* plants as well as the identification of miR169 and/or *NF-YA* target genes responsible for decreased susceptibility of the mutants will contribute greatly to our understanding of plant diseases.

## Materials and Methods

### Plant lines and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* accessions used in this study were Col-0 (Nottingham Arabidopsis Stock Centre [NASC] (accession number N1093), Ws-2 [N2360] and Ler-0 [N1686]. The *clv1* mutants *clv1-12*, *clv1-13* (Ws-2 background), *clv1-4* (Ler-0 background) studied here have been described previously (Dievart et al., 2003; Clark et al., 1993). The *clv2* mutants *clv2-3* (Ler-0 background) and *AtRLP10*, *bam1-1*, *bam2-1*, *pol-1*, *pll1-1*, (Col-0 background), *crn-1* [N9853], *wus-1* [N15], *clv3-2* (Ler-0 background), used in this study have been characterized previously (Jeong et al., 1999; Müller et al., 2008; Laux et al., 1996; Yu et al., 2000; Song and Clark, 2005; Clark et al., 1993; DeYoung et al., 2006).

Seeds were germinated on Murashige and Skoog medium, and plants were grown in Jiffy pots in a growth chamber at 22°C, with a 9-h light period and a light intensity of 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Experiments were performed on 4-week-old plants (Deslandes et al., 2003).

### Pathogenicity Assays

*Ralstonia solanacearum* GMI1000 and Rd15 are wild-type strains isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and radish (*Raphanus sativus*), respectively. *R. solanacearum* was grown at 28°C in B broth medium (Boucher et al., 1985). Plant infection with *R. solanacearum* was done by inoculating roots as described previously in Deslandes et al., 2003. Bacterial *in planta* growth curves were measured as described (Deslandes et al., 1998).

*Xanthomonas campestris* pv *campestris* 8004  $\Delta XopAC$  strain was grown at 30°C on Moka medium (Blanvillain et al., 2007). Infections were performed as described previously (Meyer et al., 2005). *Verticillium dahliae* and *Alternaria brassicicola* were cultivated on potato dextrose agar, *Botrytis cinerea* and *Plectosphaerella cucumerina* on malt extract agar, all at room temperature (van Esse et al., 2008). *Verticillium* inoculations were performed as previously described (Ellendorff et al., 2009; van Esse et al., 2008; Yadeta et al., 2011). Inoculations with *B. cinerea*, *P. cucumerina* (both at  $10^6$  conidia/ ml), were performed as previously described (van Esse et al., 2008). *Alternaria brassicicola* was inoculated as with *P. cucumerina*. At 3 and 5 dpi, pictures were taken of all inoculated plants and lesion diameters were measured using ImageJ software.

At least 10 plants per genotype were inoculated in each of two to three experiments, and the disease rating means and standard deviation to the mean were calculated at different times.

### Plasmid Constructions

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

Col-0 genomic DNA was used as a template for the amplification of the different PCR gateway-compatible fragments with the PrimeStar HS DNA polymerase (Takara Bio Inc.; Otsu, Japan). The genomic *CLVI* gene *pCLVI:CLVI*, a 6075-bp fragment (including 3056 bp of the promoter and ending before the stop codon) was amplified with the sense primer (AttB1\_pClv1) 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGACACAAGTTTGTCTTCACTATCA-3' and the antisense primer (AttB2\_ΔStop\_clv1) 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGAACGCGATCAAGTTCGC-3'.

The *CLVI* promoter (*CLVI*, a 3059-bp DNA fragment including the start codon) was amplified with the sense primer AttB1\_pClv1 and the antisense primer (AttB2\_pClv1) 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAGAAGATGAGTCTTCAAAGTCTCATC-3'.

The promoter of *SUC2* (*Arabidopsis Sucrose Transporter 2*) (At1g22710) used for phloem specific complementation was fused to the *CLVI* genomic coding sequence. The *pSUC2:CLVI* fusion gene was generated by a first amplification of two independent PCR products both containing a “matching tail”. The *SUC2* promoter (2075-bp fragment from the start codon) was amplified using the sense primer (pSUC2\_Fw) 5'-GACCATGAAATCATTTCATAT-3' and the antisense primer (HybSUC2/CLV1) 5'-TCTCATCGCCATATTTGACAAACCAAGAAAGTA-3'. The *CLVI* genomic coding sequence (3741-bp fragment from the start codon) was amplified with the sense primer HybCLV1/SUC2 and the antisense primer (TermCLV1\_Rev) 5'-GCTTCACAGCATCATCCT-3'. Then, 1μL of each PCR reaction was used as a template to generate the *SUC2:CLVI* gateway compatible construct with the sense primer (AttB1-

prom*SUC2*)

5'-

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGACCATGAAATCATTTCATAT-3' and the antisense primer AttB1\_pClv1. PCR conditions were as follows: 98°C for 2 min, followed by 10 cycles of 98°C for 15 s, 62°C for 20 s and 72°C for 6 min, followed by 20 cycles of 98°C for 15 s, 55°C for 20 s and 72°C for 6 min.

*pCLVI:CLVI-3HA*, *pSUC2:CLVI-3HA* and *pCLVI:GUS-GFP* were derived from the recombination of the corresponding pENTR constructs with the pAM-PAT-GW-3HA and the pKGWFS7 (Karimi et al., 2002) destination vectors, respectively.

### Microscopic Analysis

Plants were vacuum-infiltrated for 15 min in the GUS staining buffer (0.1 M KPO<sub>4</sub> pH 7.4, 0.01% Triton X-100, 0.5 mM K<sub>3</sub> Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub> Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM EDTA, 1 mM X-Gluc) and incubated 4 h at 37°C. Plant tissues were then dehydrated by sequential treatments of 1 h in 70, 90 and 100% ethanol and were embedded in glycolmethacrylate (Technovit 7100; Haereus-Kulzer, <http://www.heraeus-kulzer.com/hkg/web/de/laenderauswahl.html>) according to the manufacturer's instructions, and 7 µm sections were analyzed. Images were acquired using an AxiocamMRc camera (Zeiss, <http://www.zeiss.com/>) mounted on an Axioplan2 imaging microscope (Zeiss).

### Generation of Transgenic Plants

All generated binary vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3103. Arabidopsis transformation was performed by the floral dip procedure (Clough and Bent, 1998). Primary transformants of *pCLVI:CLVI-3HA* and *pSUC2:CLVI:3HA*, *pCLVI:GUS:GFP*, and *p35S::mir169a*, *p35S:: mir169d* were selected on Murashige and Skoog medium supplemented with 5 µg/mL of DL-phosphinothricin (Duchefa), 50µg/mL of kanamycin and 30µg/mL of hygromycin, respectively.

### Generation and Selection of Double Mutants

*clv1-12* plants were crossed with the following mutant alleles : *jar1-1* (Staswick et al., 1992), *sid2-1* (Wildermuth et al., 2001) and *ein2-1* (Roman et al., 1995). All the mutant lines were in Col-0 genetic background. We generated double mutants by standard crossing procedures. Genotyping of the *clv1-12* mutation in double mutants was performed by PCR amplification using *CLVI* specific (5'- GTTTCCGATTCCGGTAGGGATTGAACCGGT-3') and JL-202 (5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3'; left border specific)

primers. Genotyping of the *jar1-1* (Laurie-Berry et al., 2006), *ein2-1* (Nandi et al., 2003) and *sid2-1* (Heck et al., 2003) were performed as described.

### **Microarray Experiments and Analysis**

Microarray analysis was performed both on rosette leaves and roots of 5 wild type (Ws-2) or *clv1-12* plants harvested either at the time of inoculation (T0) and 5 days post inoculation (25% of wilted leaves) with the Rd15 virulent *R. solanacearum* strain. Two biological replicates corresponding to RNA extracted from 5 different plants in 2 independent experiments were conducted. Total RNA was isolated from frozen tissues using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, GmbH&Co.KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentrations were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, <http://www.nanodrop.com>) and RNA integrity was confirmed by Bioanalyzer 2100 electrophoresis (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com>). Probes were synthesized from RNA samples and hybridized to the Affymetrix Arabidopsis ATH1 GeneChip arrays (Affymetrix, <http://www.affymetrix.com>) according to the procedures provided by the manufacturer. Probes and hybridizations were performed by the NASC's International Affymetrix Service (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>).

Expression measures were normalized by the Robust Multi-array Average (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003) implemented in Bioconductor packages. The pairwise comparison between the two wild type and *clv1-12* biological replicates was performed to identify differentially expressed genes both in leaves and roots at T0 and 5 dpi.

A statistical analysis was performed with the LIMMA package using an empirical Bayes linear modelling approach (Smyth, 2004, 2005) and *p-values* were adjusted by the Benjamini and Hochberg method which controls the False Discovery Rate (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995). Significant up-regulated and down-regulated genes were selected using an adjusted FDR value of 0.03 relative to wild type samples.

### **Quantitative RT-PCR Analysis**

Total RNA was isolated as described above. For quantitative RT-PCR analysis, leaves and roots of 4 week-old plants were collected, RNA purified, quantified and qualified as described above for the transcriptional analysis. Quantitative RT-PCR reactions were performed in 384-well plates with a Lightcycler LC480 (Roche, <http://www.roche-applied-science.com>) using the LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I kit on 1µg of

total RNA (Roche applied Science, <http://www.roche-applied-science.com>) and cDNAs 10-fold diluted before use. The following conditions were used: 1 cycle of 9 min at 98°C followed by 45 cycles of 5 s at 95°C, 10 s at 65°C, and 20 s at 72°C. The primer sets used in the experiments are listed in Table S11. The specificity of the amplification was systematically checked by melting curve analysis at the end of each run of real time RT-PCR. The relative expression of each gene of interest was calculated using At1g13320 as a reference gene for each sample.

### **MIR expression analysis**

The expression profiles of small RNAs (miRNAs and siRNAs) were assayed by stem-loop reverse transcription-PCR (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Total RNA were extracted from the respective tissues and genotypes with the *mirVana* miRNA isolation kit (Ambion). Total RNAs (2-3µg) were then subjected to Dnase I treatment (Fermentas). cDNA was then synthesized from 500-600ng of this RNA using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) with a mixture of stem-loop RT primers for miR160, miR167 and miR169 (see supplemental table) and oligodT according to the manufacturer instructions. Stem-loop RT primers were designed according to Chen et al 2005. miRNA transcripts were assessed in three independent biological replicates and two technical replicates (based on two independent cDNA syntheses derived from the same RNA sample) were performed in all cases. Primer combinations were designed according to Varkonyi-Gasic et al., (2007) (see Supplemental Table) and specificity was checked using a dissociation curve. Real time RT-PCR were performed on a Roche LightCycler480 using Roche reagents (<http://www.roche.com>). Three genes (At1g13320; At4g26410; At1g62930) were the most stably expressed genes and were used as reference genes (Czechowski et al., 2005). geNorm software was used to determine a normalization factor to calculate relative expression levels (Vandesompele et al., 2002).

### **Acknowledgements**

Quantitative RT-PCR experiments were carried out at the Toulouse Genopole 'PLAGE' platform. The authors thank Pariente J-L., Icher C. and Bosc S. for plant production and Pata M. for technical advice. This work was supported by a PhD fellowship from the Agence Nationale de la Recherche, Grant PCS-08-GENO-SCRIPS (MH). This work is part of the "Laboratoire d'Excellence (LABEX) entitled TULIP (ANR -10-LABX-41).

## References

- An H.L., Roussot C., Suarez-Lopez P., Corbesler L., Vincent C., Pineiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S, Turnbull C, and Coupland G.** (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* **131**: 3615–3626.
- Argueso C.T., Ferreira F.J., Epple P., To J.P., Hutchison C.E., Schaller G.E., Dangl J.L., and Kieber J.J.** (2012). Two-component elements Mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genet.* **8** :e1002448.
- Ballif J., Endo S., Kotani M., MacAdam J., and Wu Y.** (2011). Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem.* **49**: 579-83.
- Benjamini Y., Hochberg Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A* **57**: 289–300.
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A., and Lifschitz, E.** (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* **46**: 462–476.
- Blanvillain S., Meyer D., Boulanger A., Lautier M., Guynet C., Denancé N., Vasse J., Lauber E., and Arlat M.** (2007). Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One.* **2(2)**:e224.
- Bleckmann A., Weidtkamp-Peters S., Seidel C.A., and Simon R.** (2010). Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol.* **152**: 166-76.
- Boucher, C.A., Barberis, P.A., Trigalet, A.P., and Demery, D.A.J.** (1985). Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn5-induced virulent mutants. *J. Gen.Microbiol.* **131**: 2449–2457.
- Brand U., Fletcher J.C., Hobe M., Meyerowitz E.M., and Simon R.** (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617-619.
- Brandstatter I., and Kieber J.J.** (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in ARABIDOPSIS. *Plant Cell* **10**:1009–1020.
- Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C, Kiddle S., Kim Y.S., Penfold C.A., Jenkins D., Zhang C., Morris K., Jenner C., Jackson S., Thomas B., Tabrett A., Legaie R., Moore J.D., Wild D.L., Ott S., Rand D., Beynon J., Denby K., Mead A., and Buchanan-Wollaston V.** (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**: 873-894.
- Buhtz A., Pieritz J., Springer F., and Kehr J.** (2010). Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol.* **10**: 64-74.
- Cai, X., Ballif, J., Endo, S., Davis, E., Liang, M., Chen, D., DeWald, D., Kreps, J., Zhu, T., and Wu, Y.** (2007). A putative CCAAT-binding transcription factor is a regulator of flowering timing in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**: 98–105.
- Casamitjana-Martínez E., Hofhuis H.F., Xu J., Liu C.M., Heidstra R., and Scheres B.** (2003). Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. *Curr Biol.* **13**: 1435-41.

- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., and Guegler K.J.** (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33(20):e179.
- 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: 465-76.
- Chinchilla D., Shan L., He P., de Vries S., and Kemmerling B.** (2009). One for all: The receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci.* 14: 535–541.
- Clark S.E., Running M.P., and Meyerowitz E.M. (1993). **CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis.** *Development* 119: 397-418.
- Clark, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121, 2057–2067.
- Clark S.E., Williams R.W., Meyerowitz E.M.** 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell.* 89: 575-585.
- Clark S.E.** (2001). Cell signalling at the shoot meristem. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:276-84.
- Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., and Scheible W.R.** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5-17.
- D'Agostino IB, and Kieber JJ.** (1999). The emerging family of plant response regulators. *Trends Biochem.* 24:452–456.
- Deslandes L., Pileur F., Liaubet L., Camut S., Can C., Williams K., Holub E., Beynon J., Arlat M., and Marco Y.** (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 659-667.
- 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.
- De Young B.J., Bickle K.L., Schrage K.J., Muskett P., Patel K., and Clark S.E.** (2006). The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. *Plant J.* 45: 1-16.
- Diévert A., Dalal M., Tax F.E., Lacey A.D., Huttly A., Li J., and Clark S.E.** (2003). CLAVATA1 dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell.* 15: 1198-211.
- Dolfini D., Gatta R., Mantovani R.** (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47: 29-49.
- Durbak A.R., and Tax F.E.** (2011). CLAVATA signaling pathway receptors of Arabidopsis regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. *Genetics.* 189: 177-94.
- Ellendorff U., Fradin E.F., de Jonge R., Thomma B.P.** (2009). RNA silencing is required for Arabidopsis defence against Verticillium wilt disease. *J. Exp. Bot.* 60: 591-602.
- Franco-Zorrilla J.M., Valli A., Todesco M., Mateos I., Puga1 M.I., Rubio-Somoza I., Leyva A., Weigel D., Garcia J.A., and Paz-Ares J.** (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* 39: 1033-7.

- Gish L.A. and Clark S.E.** (2011). The RLK/Pelle family of kinases. *Plant J.* **66**:117-27.
- Godiard L., Sauviac L., Torii K.U., Grenon O., Mangin B., Grimsley N.H., and Marco Y.** (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J.* **36**: 353-65.
- 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**: 1003-11.
- Guidot A., Prior P., Schoenfeld J., Carrère S., Genin S., and Boucher C.** (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bact.* **189**: 377-387.
- Guo Y., Han L., Hymes M., Denver R., and Clark S.E.** (2010). CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating Arabidopsis stem cell specification. *Plant J.* **63**: 889-900.
- Guo Y., Ni J., Denver R., Wang X., and Clark S.E.** (2011). Mechanisms of molecular mimicry of plant CLE peptide ligands by the parasitic nematode *Globodera rostochiensis*. *Plant Physiol.* **157**: 476-484.
- Gusmaroli G., Tonelli C., Mantovani R.** (2001). Regulation of the CCAAT-Binding NF-Y subunits in *Arabidopsis thaliana*. *Gene.* **264**: 173-185.
- Hayward A.C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 65-87.
- Heck S., Grau T., Buchala A., Métraux J.P., and Nawrath C.** (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J.* **36**:342-52.
- Hernández-Blanco C., Feng D.X., Hu J., Sánchez-Vallet A., Deslandes L., Llorente F., Berrocal-Lobo M., Keller H., Barlet X., Sánchez-Rodríguez C., Anderson L.K., Somerville S., Marco Y., and Molina A.** (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell.* **19**: 890-903.
- Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y., Inoue A., Nakanomyo I., Ogawa M., Sawa S., Ohashi-Ito K., Matsubayashi Y., and Fukuda H.** (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**: 15208-13.
- Hooft van Huijsduijnen R.A., Bollekens J., Dorn A., Benoist C., Mathis D.** (1987). Properties of a CCAAT box-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7265-7282.
- Hirsch J., Deslandes L., Feng D.X., Balagué C., and Marco Y.** (2002). Delayed Symptom Development in *ein2-1*, an Arabidopsis Ethylene-Insensitive Mutant, in Response to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol.* **92**: 1142-8.
- Hu J., Barlet X., Deslandes L., Hirsch J., Feng D.X., Somssich I., and Marco Y.** (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One.* **3**(7):e2589.
- Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M.W., Maxwell B.B., Perdue T.D., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R., and Kieber J.J.** (2006). The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell.* **18**: 3073-87.
- Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Scherf U., Speed T.P.** 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-264.

- Jeong S., Trotochaud, A.E., and Clark S.E.** (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**: 1925-1934.
- Karimi M., Inzé Dand Depicker A.** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193-195.
- Kayes J.M., and Clark S.E.** (1998). *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis. *Development* **125**: 3843-51.
- Kinoshita A., Betsuyaku S., Osakabe Y., Mizuno S., Nagawa S., Stahl Y., Simon R., Yamaguchi-Shinozaki K., Fukuda H., and Sawa S.** (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development* **137**: 3911-3920.
- Krusell L., Madsen L.H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Kaneko T., Tabata S., de Bruijn F., et al.,** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**: 422–426.
- Laurie-Berry N., Joardar V., Street I.H., and Kunkel B.N.** (2006). The Arabidopsis thaliana *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**: 789-800.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development.* **1996** Jan;122(1):87-96
- Lebeau A., Daunay M.C., Frary A., Palloix A., Wang J.F., Dintinger J., Chiroleu F., Wicker E., and Prior P.** (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathol.* **101**: 154-65.
- Lee, H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (2003). Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2152–2156.
- Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., and Walker J.C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell.* **110**: 213-22.
- Li W.X., Oono Y., Zhu J., He X.J., Wu J.M., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., and Zhu J.K.** (2008). The Arabidopsis *NFYA5* transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* **20**: 2238-51.
- Li J.** (2010). Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 509–514.
- Li Y., Zhang Q., Zhang J., Wu L., Qi Y., and Zhou J.M.** (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiol.* **152**: 2222-2231.
- Liu J.X., and Howell S.H.** (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 782–796.
- Llorente F., Alonso-Blanco C., Sánchez-Rodríguez C., Jorda L., and Molina A.** (2005). *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J.* **43**: 165-180.
- Lu S.W., Chen S., Wang J., Yu H., Chronis D., Mitchum M.G., and Wang X.** (2009). Structural and functional diversity of *CLAVATA3/ESR* (CLE)-like genes from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**: 1128-42.

- McNabb D.S., Xing Y., and Guarente L.** (1995). Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**: 47–58.
- Maity S.N., and de Crombrughe B.** (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 174–178.
- Mantovani R.** (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**: 15–27.
- 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**:327-33.
- Miwa H., Betsuyaku S., Iwamoto K., Kinoshita A., Fukuda H., and Sawa S.** (2008). The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1752-1757.
- Miwa H., Tamaki T., Fukuda H., and Sawa S.** (2009). Evolution of CLE signaling: origins of the CLV1 and SOL2/CRN receptor diversity. *Plant Signal Behav.* **4**: 477-481.
- Miyoshi K., Ito Y, Serizawa A., and Kurata N.** (2003). OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J.* **36**: 532–540.
- Mukhtar M.S., Deslandes L., Auriac M.C., Marco Y., and Somssich I.E.** (2008). The *Arabidopsis* transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J.* **56**: 935-47.
- Müller R., Bleckmann A., and Simon R.** (2008). The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**: 934-946.
- Nam K.H., and Li J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell.* **110**: 203-212.
- Nandi A., Kachroo P., Fukushige H., Hildebrand D.F., Klessig D.F., and Shah J.** (2003). Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis* *ssi1* mutant. *Mol Plant Microbe Interact.* **16**: 588-99.
- Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O., and Jones J.D.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439.
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Harberd N.P., and Jones J.D.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* **18**: 650–655.
- Nelson D.E., Repetti P.P., Adams T.R., Creelman R.A., Wu J, Warner D.C., Anstrom D.C., Bensen R.J., Castiglioni P.P., Donnarummo M.G., Hinchey B.S., Kumimoto R.W., Maszle D.R., Canales R.D., Krolkowski K.A., Dotson S.B., Gutterson N., Ratcliffe O.J., Heard J.E.** ( 2007). Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**: 16450-16455.
- Nimchuk Z.L., Tarr P.T., and Meyerowitz E.M.** (2011). An evolutionarily conserved pseudokinase mediates stem cell production in plants. *Plant Cell* **23**: 851-4.
- Nishimura R., Hayashi M., Wu G.J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M., et al.,** (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**: 426–429.
- Ogawa M., Shinohara H., Sakagami Y., and Matsubayashi Y.** (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science.* **319**: 294.

- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M., and Matsubayashi Y.** (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. 2009. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 578-580.
- Pant B.D., Musialak-Lange M., Nuc P., May P., Buhtz A., Kehr J., Walther D., and Scheible W.R.** (2009). Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* **150**: 1541-1555.
- Prior P., and Fegan M.** (2005). Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort.* **695**: 127-136.
- Replogle A., Wang J., Bleckmann A., Hussey R.S., Baum T.J., Sawa S., Davis E.L., Wang X., Simon R., and Mitchum M.G.** (2011). Nematode CLE signaling in Arabidopsis requires CLAVATA2 and CORYNE. *Plant J.* **65**: 430-440.
- Wang G., Long Y., Thomma B.P., de Wit P.J., Angenent G.C., and Fiers M.** (2010). Functional analyses of the CLAVATA2-like proteins and their domains that contribute to CLAVATA2 specificity. *Plant Physiol.* **152**: 320-331.
- Roux M., Schwessinger B., Albrecht C., Chinchilla D., Jones A., Holton N., Malinovsky F.G., Tör M., de Vries S., and Zipfel C.** (2011). The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell* **23**: 2440-2455.
- Sánchez-Rodríguez C., Estévez J.M., Llorente F., Hernández-Blanco C., Jordá L., Pagán I., Berrocal M., Marco Y., Somerville S., and Molina A.** (2009). The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**: 953-963.
- Schnabel E., Journet E.P., de Carvalho-Niebel F., Duc G., and Frugoli J.** (2005). The *Medicago truncatula* *SUNN* gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* **58**: 809-822.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Klaus F., Mayer K.F., Jürgen G., and Laux T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems are maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**: 635-644.
- 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.
- Schwessinger B., Roux M., Kadota Y., Ntoukakis V., Sklenar J., Jones A., and Zipfel C.** (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet.* **7**: e1002046.
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S., Buzas D.M., Iturbe-Ormaetxe I., Carroll B.J., and Gresshoff P.M.** (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science.* **299**: 109-112.
- Siefers N., Dang K.K., Kumimoto R.W., Bynum W.E. 4th, Tayrose G., and Holt B.F. 3rd.** (2009). Tissue-specific expression patterns of Arabidopsis NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity. *Plant Physiol.* **149**: 625-641.
- Smyth G.K.** (2004). Linear models and empirical Bayes for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**: 1-26.
- Song S.K. and Clark S.E.** (2005). POL and related phosphatases are dosage sensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis. *Dev. Biol.* **285**: 272-284.

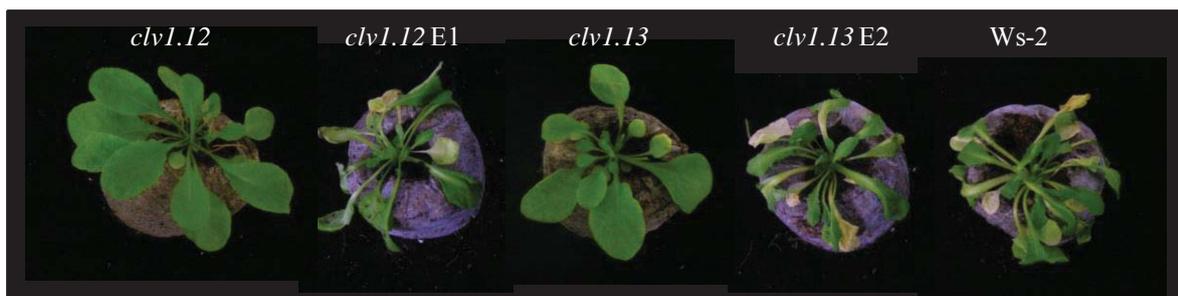
- Song S.-K., Lee M.M. and Clark S.E.** (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development*. **133**: 4691-4698.
- Stone J.M., Trotochaud A.E., Walker J.C. and Clark S.E.** (1998). Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated- protein phosphatase interactions. *Plant Physiol.* **117**: 1217-1225.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 6837-6840.
- Sunkar. R.** 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **21**: 805-811.
- Torii K.U., Mitsukawa N., Oosumi T., Matsuura Y., Yokoyama R., Whittier R.F., and Komeda Y.** (1996). The *Arabidopsis* *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**: 735-746.
- Truernit E., and Sauer N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *SUC2* sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. *Planta* **196**: 564-570.
- Truman W.M., Bennett M.H., Turnbull C.G.N., and Grant M.R.** (2010). *Arabidopsis* Auxin Mutants Are Compromised in Systemic Acquired Resistance and Exhibit Aberrant Accumulation of Various Indolic Compounds. *Plant Physiol.* **152**: 1562–1573.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: research0034. 1-0034.11.
- van Esse, H. P., van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P. J. G. M., and Thomma, B. P. H. J.** (2008). The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* **20**:1948-1963.
- van Zanten M., Snoek L.B., van Eck-Stouten E., Proveniers M.C., Torii K.U., Voeselek L.A., Millenaar F.F., and Peeters A.J.** (2010). *ERECTA* controls low light intensity-induced differential petiole growth independent of phytochrome B and cryptochrome 2 action in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* **5**: 284-6.
- Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E.F., Hellens R.P.** (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. **12**; 3-12.
- Vogel J.P., Raab T.K., Schiff C., Somerville S.C.** (2002). *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **14**: 2095-2106.
- Vogel J.P., Raab T.K., Somerville C.R., Somerville S.C.** (2004). Mutations in *PMR5* result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant J.* **40**: 968-978.
- Wang Z.Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., and Chory J.** (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**: 380-383.
- Wang, X., Mitchum, M.G., Gao, B., Li, C., Diab, H., Baum, T.J., Hussey, R.S. and Davis, E.L.** (2005). A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Plant Pathol.* **6**: 187–191.
- Wang G., Long Y., Thomma B.P., de Wit P.J., Angenent G.C., and Fiers M.** (2010). Functional analyses of the CLAVATA2-like proteins and their domains that contribute to CLAVATA2 specificity. *Plant Physiol.* **152**: 320-331.

- Wang J., Lee C., Replogle A., Joshi S., Korkin D., Hussey R., Baum T.J., Davis E.L., Wang X., and Mitchum M.G.** (2010). Dual roles for the variable domain in protein trafficking and host-specific recognition of *Heterodera glycines* CLE effector proteins. *New Phytol.* **187**: 1003-1017.
- Wang J., Replogle A., Hussey R., Baum T., Wang X., Davis E.L., and Mitchum M.G.** (2011). Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 177-186.
- Warpeha K.M., Upadhyay S., Yeh J., Adamiak J., Hawkins S.I., Lapik Y.R., Anderson M.B., and Kaufman L.S.** (2007). The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**: 1590-1600.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., and Ausubel F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* **414**: 562-565.
- Yadeta K.A., Hanemian M., Smit P., Hiemstra J.A., Pereira A., Marco Y., and Thomma B.P.** (2011). The *Arabidopsis thaliana* DNA-binding protein AHL19 mediates Verticillium wilt resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**: 1582-1591.
- Yu L.P., Simon E.J., Trotochaud A.E. and Clark S.E.** (2000). *POLTERGEIST* functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development* **127**: 1661-1670.
- Yu L.P., Miller A.K. and Clark S.E.** (2003). *POLTERGEIST* encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at *Arabidopsis* shoot and flower meristems. *Curr. Biol.* **13**: 179-188.
- Zhao C., Craig J.C., Petzold H.E., Dickerman A.W., and Beers E.P.** (2005). The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the arabidopsis root-hypocotyl. *Plant Physiol.* **138**: 803-818.
- Zhao B., Ge L., Liang R., Li W., Ruan K., Lin H., and Jin Y.** (2009). Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor, *BMC Mol. Biol.* **8**: 10:29.
- Zhao M., Ding H., Zhu J.K., Zhang F., Li W.X.** (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytol.* **190**: 906-915.
- Zhang W., To J.P., Cheng C.Y., Eric Schaller G., and Kieber J.J.** (2011). Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant J.* **68**: 1-10.
- Zhu Y., Wang Y., Li R., Song X., Wang Q., Huang S., Jin J.B., Liu C.M., and Lin J.** (2010). Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis. *Plant J.* **61**: 223-33.

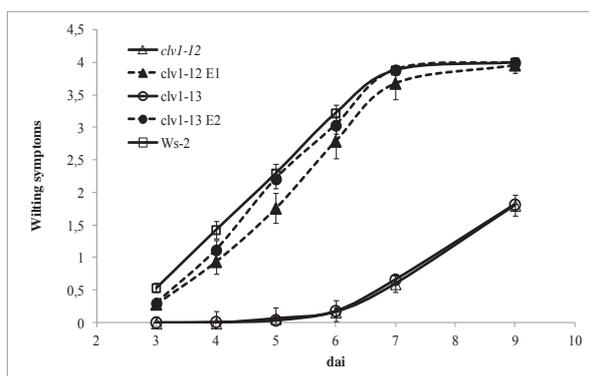
**Fig 1.** Symptom development and *in planta* bacterial growth in *clv1-12* and *clv1-13* plants, inoculated with strain Rd15.

**a.** Wilt disease symptoms development after inoculation with strain Rd15 of *R. solanacearum*. Responses of two allelic mutants of *clv1* and of two complemented lines, *clv1-12* E1 and *clv1-13* E2 compared to their wild type counterpart, Ws-2. Pictures were taken 7 dai **b.** Wilt symptoms were recorded from 3 dai (first sign of disease appearance on Ws-2 leaves) to 9 dai (complete wilting stage on Ws-2 plants). The wilt symptoms score was determined according to the percentage of wilted leaves with values define as: 0 (no symptom), 1 (25% of wilted leaves), 2 (50%), 3 (75%), 4 (100%). The experiment was repeated twice on at least 28 plants for each line. **c.** *In planta* bacterial growth 4 dai (25% of wilting symptoms or DI = 1). The experiment was repeated twice as described in Material and Methods. Error bars represent standard error to the mean.

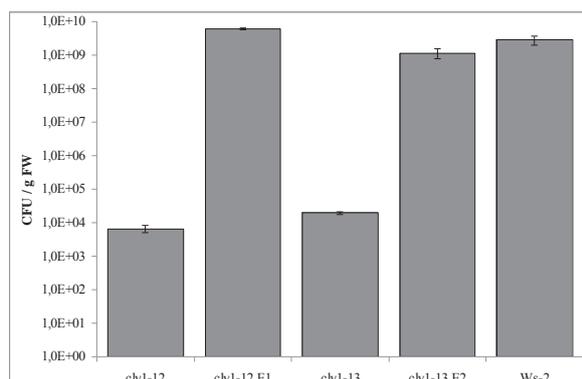
**a.**



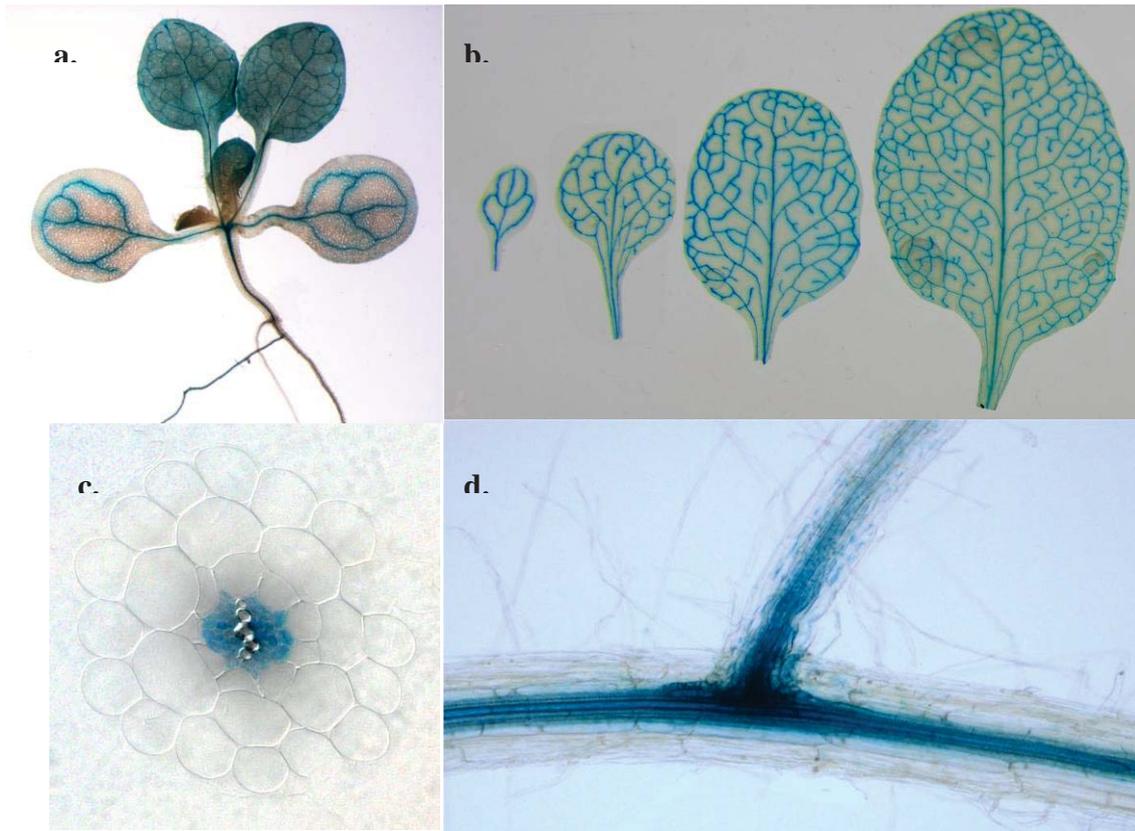
**b.**



**c.**



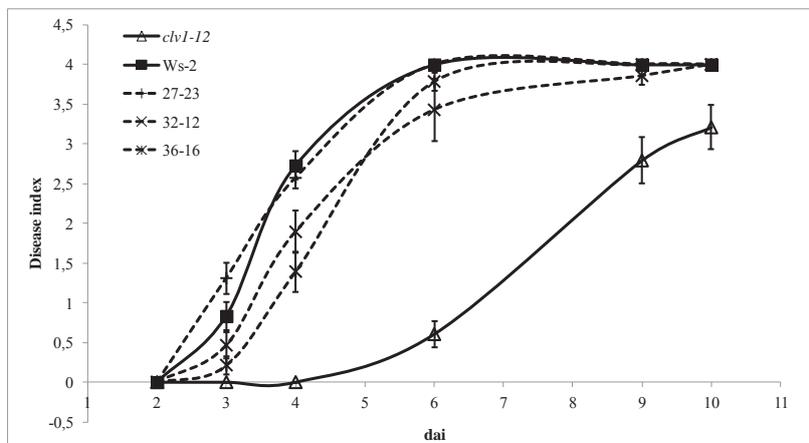
**Fig2.** *CLV1* gene expression patterns in Arabidopsis. Plants expressing the *ProCLV::GUS-GFP* construct were stained at different stages of development : **a.** 12 day old plantlet. **b.** From left to right: one week old cotyledon, 2 week old leaf, 3 week old leaf and 4 week old leaf. **c.** Transversal section of a the main root of a 12 day old plantlet. **d.** Lateral observation of a main root of a 4 week old plant.



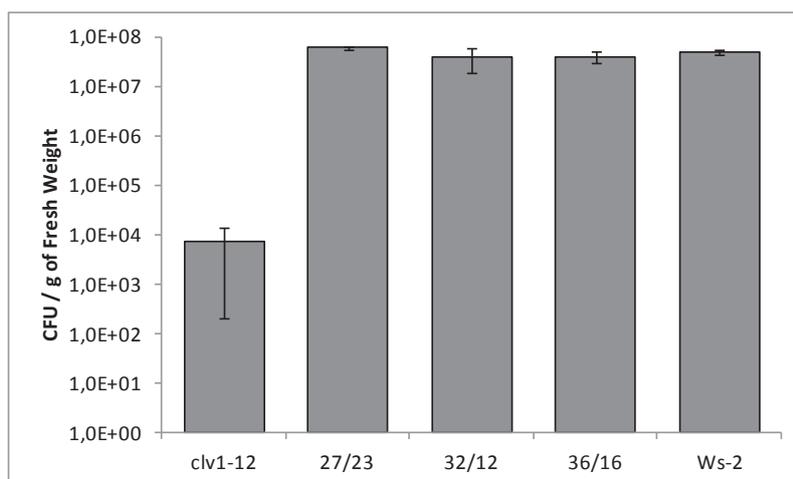
**Fig 3.** Symptom development and *in planta* bacterial growth in *clv1* plants complemented with the *ProSUC2:clv1:3HA* construct. Three independent lines (27-23, 32-12 and 36-16) were tested.

**a.** Symptom development after inoculation with strain Rd15 of *R. solanacearum*. The experiment was repeated twice on at least 14 plants per assay. **b.** *In planta* bacterial growth 4 days after inoculation (25% of wilting leaves corresponding to a DI of 1). The experiment was repeated twice as described in Material and Methods. Error bars represent standard errors to the mean.

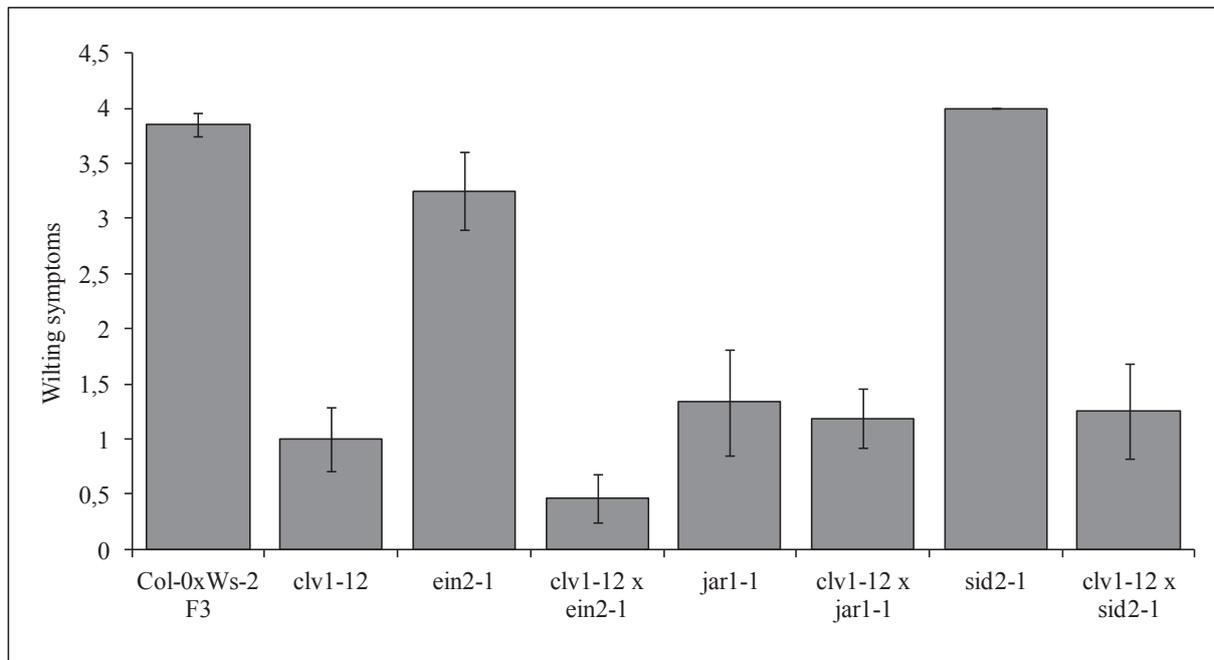
a.



b.

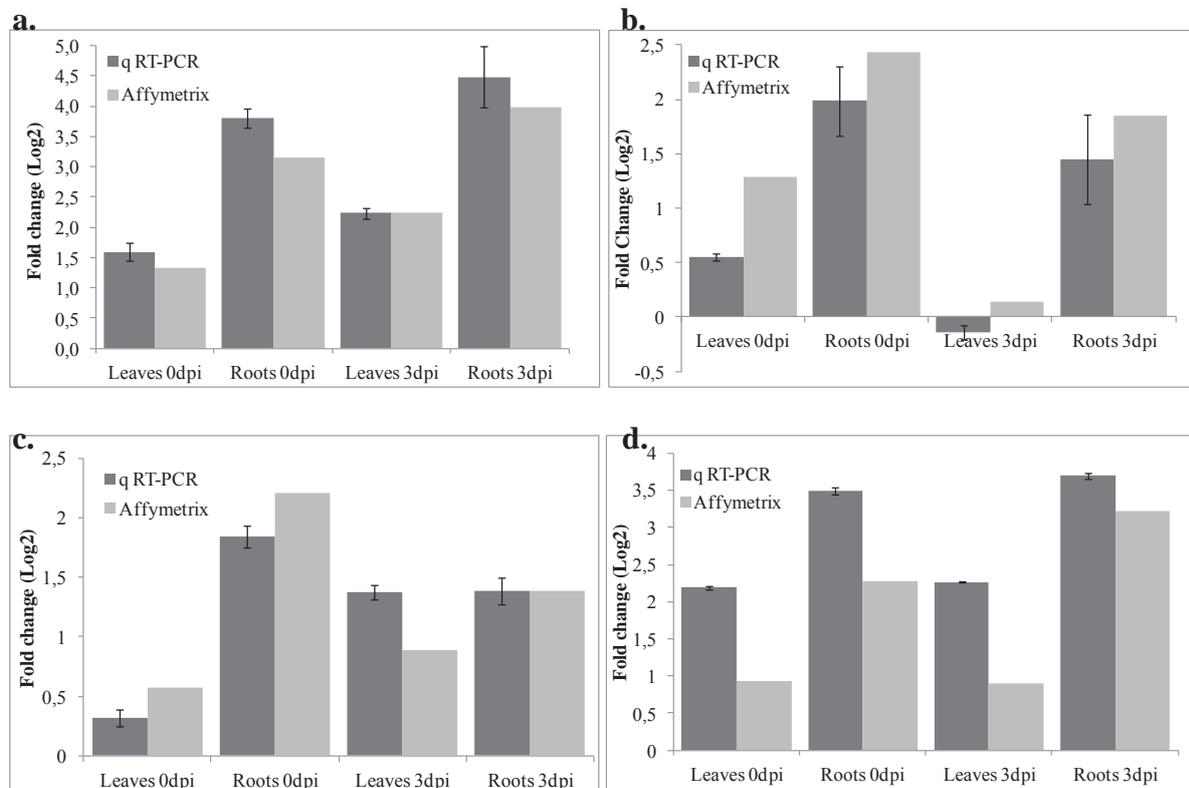


**Fig 4.** Symptom development in *clv1-12* plants and in different double mutants (*clv1-12 jar1-1*, *clv1-12 ein2-1* and *clv1-12 sid2-1*). Each bar represents the average wilting symptoms at 6 days post inoculation with the GMI1000 strain of 21 plants per line. The experiment was repeated twice. Error bars represent standard errors to the mean.



**Fig 5.** Validation by qRT-PCR of Affymetrix data on some NF-YA genes : **a.** NF-YA2. **b.** NF-YA3. **c.** NF-YA6. **d.** NF-YA10.

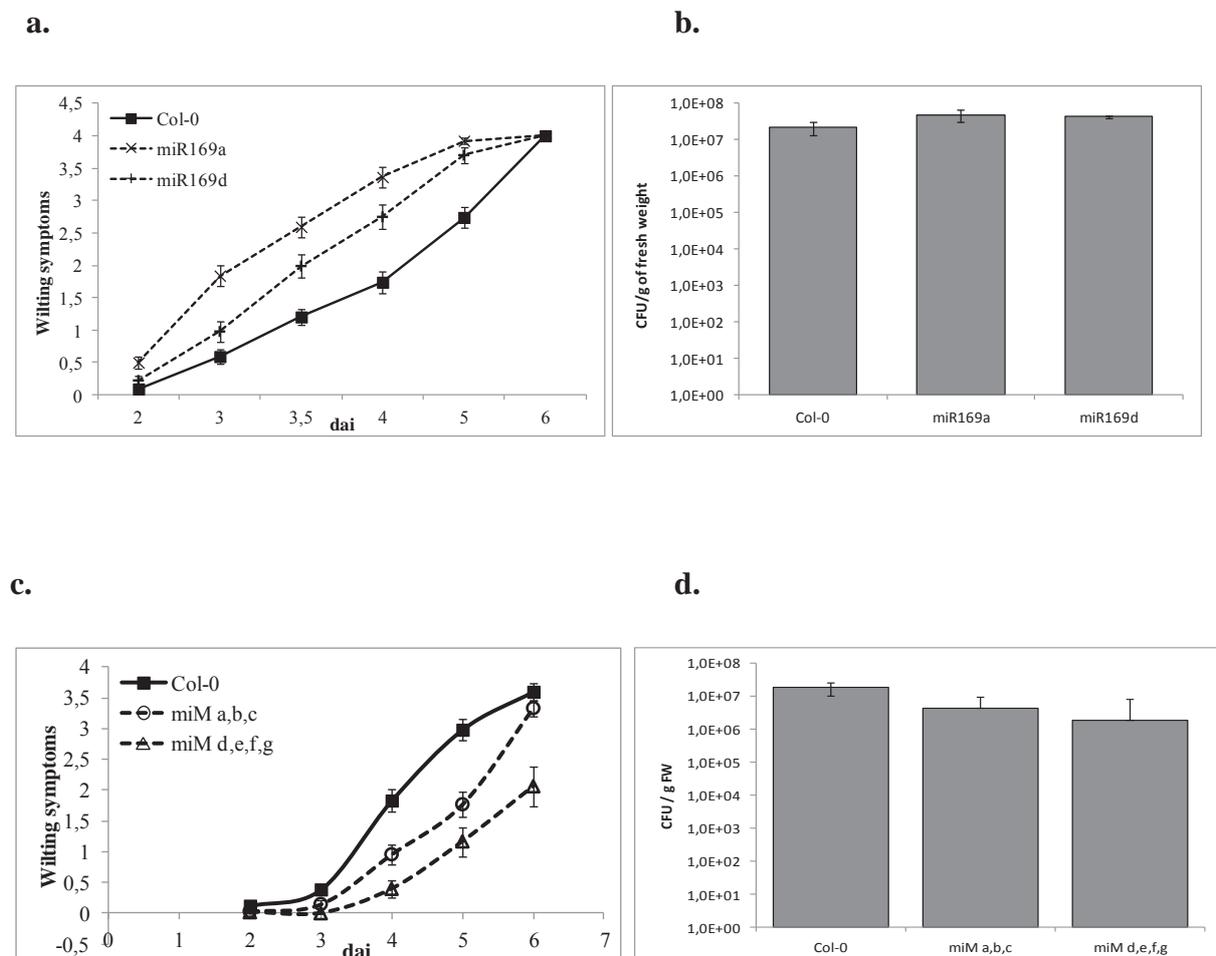
Error bars represent standard errors to the mean.



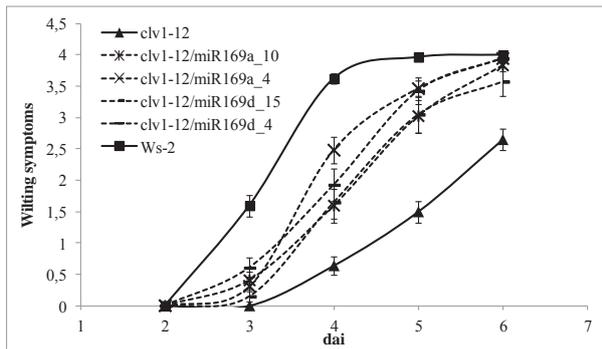
**Fig 6.** Symptom development and *in planta* bacterial growth in Arabidopsis plants expressing various constructs altering *MIR169* expression.

Wilting symptoms after inoculation with *R. solanacearum* of : **a.** Col-0 plants overexpressing *MIR169a* and *MIR169d*, **c.** Col-0 plants overexpressing Mimicry target of miR169abc and miR169defg plants, **e.** *clv1* (in a Ws-2 background) plants overexpressing *MIR169a* and *MIR169d*. Experiments were repeated twice on at least 14 plants per assay as described in Material and Methods. Infections were done either with *R. solanacearum* strains GMI1000 for Col-0 plants or strain Rd15 for Ws-2 plants. **b.d.f.** *In planta* bacterial growth in plants expressing the same constructs as in **a.c.e.**, respectively, 4 dai (25% of wilting symptoms corresponding to a DI of 1). **g.** Dosage of mir169 accumulation in roots and leaves of uninfected and RD15-infected *clv1* plants. Experiments were repeated twice.

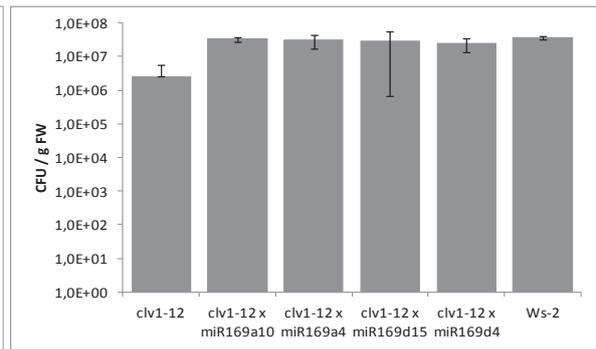
Error bars represent standard errors to the mean.



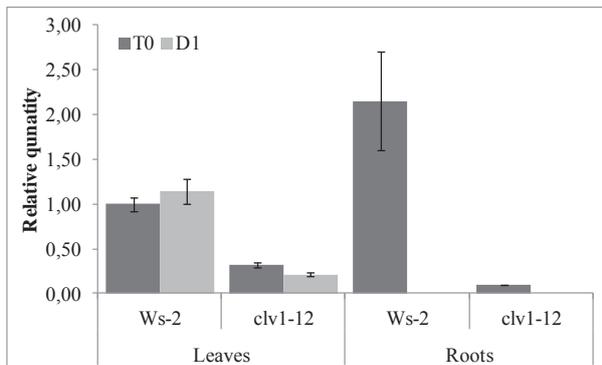
e.



f.



g.



Arabidopsis mutant lines	SALK accession number	Background	Susceptibility	References
<i>clv2-7</i>	/	Col-0	+	Wang et al., 2010
<i>clv3-2</i>		Ler-0	=	Clark et al., 1995.
<i>crn-1</i>		Ler-0	+	Müller et al., 2008
<i>kapp-1</i>	N16247	Ws-2	=	
<i>pol-1</i>		Col-0/Ler-0	=	Yu et al., 2003
<i>pll1-1</i>	N872472	Col-0	=	Yu et al., 2000
<i>wus-1</i>	N15	Ler-0	=	Laux et al., 1996
<i>bam1-1</i>		Col-0	=	DeYoung et al., 2006
<i>bam2-1</i>	N16305	Ler-0	=	DeYoung et al., 2006

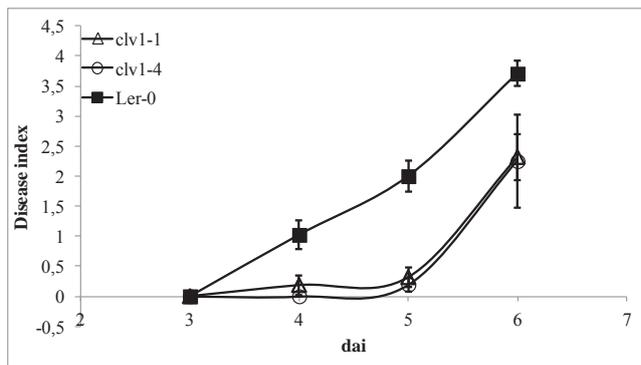
**Table 1.** Phenotype of different Arabidopsis mutants, implicated in the *clv1* signaling pathway, after inoculation with *R. solanacearum*. The susceptibility of each line was evaluated in comparison with their corresponding wild type; +, means more tolerant; = means as susceptible as their wild type counterpart. The experiments were performed at least twice, as described in material and methods on at least 28 plants per line.

**Table2.** List of genes up- and down-regulated for NF-YA, ARF, ARR family genes and genes selected for qRT-PCR validation. The genes up-regulated (FDR < 0.03 and SLR > 0) are boxed in red and the genes down-regulated (FDR < 0.03 and SLR < 0) in green.

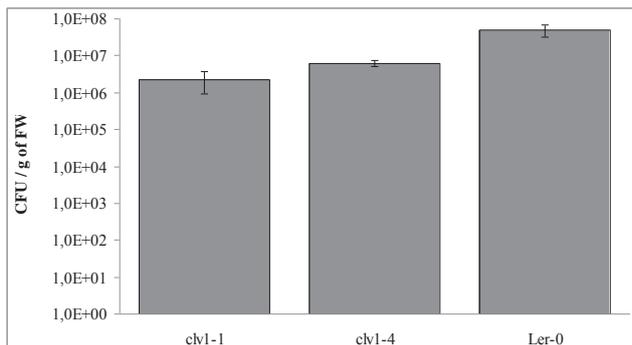
Transcript ID	Gene Symbol	Signal Log Ratio (Log Fold Change)			
		L_0	R_0	L_D1	R_D1
<b>NF-YA</b>					
At5g12840	NF-YA1	0,41	0,09	-1,35	-0,32
At3g05690	NF-YA2	1,32	3,15	2,24	3,99
At1g72830	NF-YA3	1,29	2,43	0,15	1,85
At2g34720	NF-YA4	-0,06	0,27	-1,06	-0,03
At1g54160	NF-YA5	0,70	0,53	-1,26	1,20
At3g14020	NF-YA6	0,57	2,21	0,89	1,39
At1g30500	NF-YA7	-0,03	-0,13	-1,35	0,43
At1g17590	NF-YA8	0,18	1,14	0,56	0,98
At3g20910	NF-YA9	0,22	1,04	-0,47	0,48
At5g06510	NF-YA10	0,93	2,28	0,90	3,22
At5g47640	NF-YB2	0,51	-0,63	-3,09	-0,39
At1g56170	NF-YC2	0,33	-0,02	-1,31	-0,51
At1g54830	NF-YC3	0,42	-0,02	-0,82	-0,13
<b>ARF</b>					
At1g59750	ARF1	-0,43	-0,10	-0,08	0,75
At5g62010	ARF2	-0,27	0,17	-0,51	0,85
At5g60450	ARF4	0,07	0,15	0,81	-0,19
At4g23980	ARF9	-0,04	0,33	-0,14	1,68
At2g28350	ARF10	-0,21	0,62	-0,15	1,15
At2g46530	ARF11	-0,67	0,41	-0,19	1,66
At1g34310	ARF12	-0,06	0,39	0,85	0,40
At4g30080	ARF16	0,01	0,36	0,00	0,68
At3g61830	ARF18	-0,27	-0,09	-0,33	0,91
At1g19220	ARF19	0,29	-0,22	0,00	0,68
<b>ARR</b>					
At1g10470	ARR4	0,63	-0,22	1,89	-0,64
At3g48100	ARR5	1,52	0,14	2,67	-0,39
At5g62920	ARR6	1,02	-0,12	2,74	-0,66
At1g19050	ARR7	0,68	0,21	2,89	-1,22
At1g74890	ARR15	0,56	-0,36	3,13	0,34
At2g40670	ARR16	0,44	0,23	1,58	-0,61
<b>Genes selected for q RT-PCR</b>					
AT3G16360	AHP4	1,53	0,75	1,34	0,58
AT5G57220	CYP81F2	-0,57	-0,83	3,05	-1,04
AT1G01380	ETC1	-0,22	2,19	-0,26	3,07
AT5G46330	FLS2	-0,43	-0,11	0,68	0,27
AT1G48500	JAZ4	-0,44	1,78	-0,35	1,80
AT5G59320	LTP3	1,99	0,25	-3,48	-0,41
AT5G59310	LTP4	3,89	-0,71	-2,70	-0,17
AT4G33950	OST1	0,05	0,73	-0,96	0,72
AT4G24040	TRE1	-0,32	3,63	-0,21	0,87

**Fig S1.** Wilting symptoms and *in planta* bacterial growth curves for two allelic mutants of *clv1*, *clv1-1* and *clv1-4* (both in a Ler genetic background) **a.** Symptom development after inoculation with *R. solanacearum* GMI1000 strain. The experiment was repeated three times using at least 21 plants per assay. **b.** *In planta* bacterial growth 4 dai (25% of wilting symptoms or DI = 1). Error bars represent standard errors to the mean.

**a.**

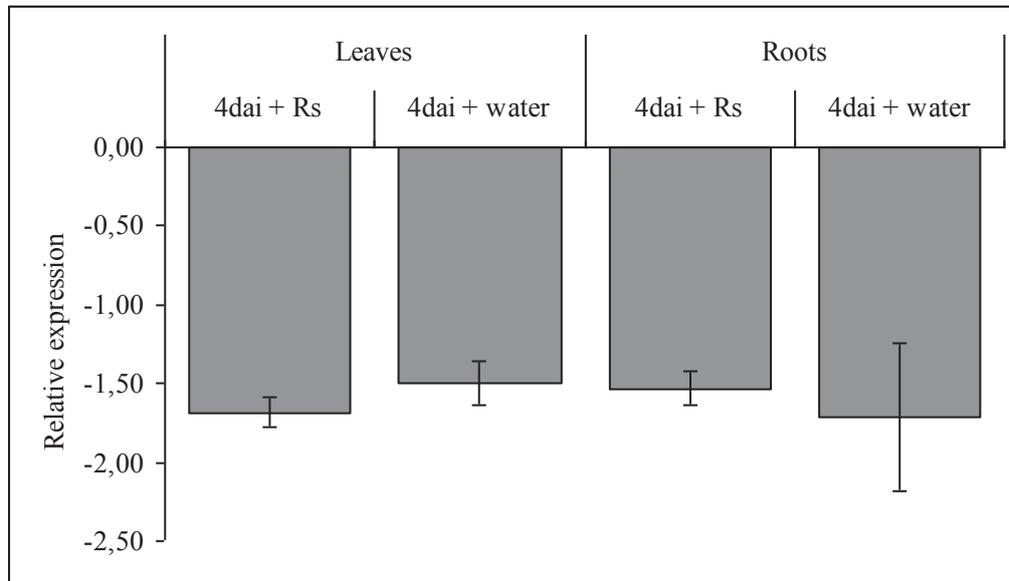


**b.**



**Fig S2.** Relative expression levels of *CLVI* in Ws-2 roots and leaves after Rd15 infection.

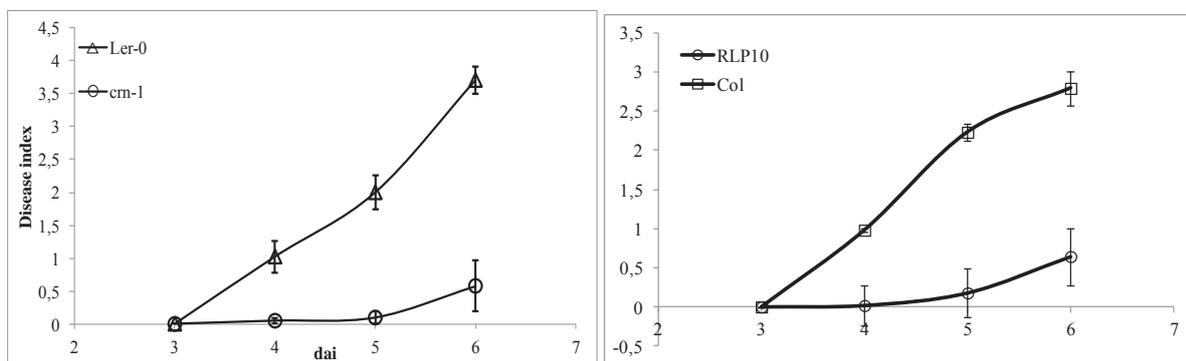
qRT-PCR experiments were performed on 4 week old plants before infection and 4 days either after inoculation with Rd15 strain of *R. solanacearum* (25% wilting symptoms; 4 dai + Rs) or mock- water treatment (no symptoms; 4 dai + water). The values correspond to a ratio of expression levels reported to that of the 4 week old untreated control plants. Each bar represents the mean of three technical replicates of at least two biological replicates. Errors bars represent standard error to the mean.



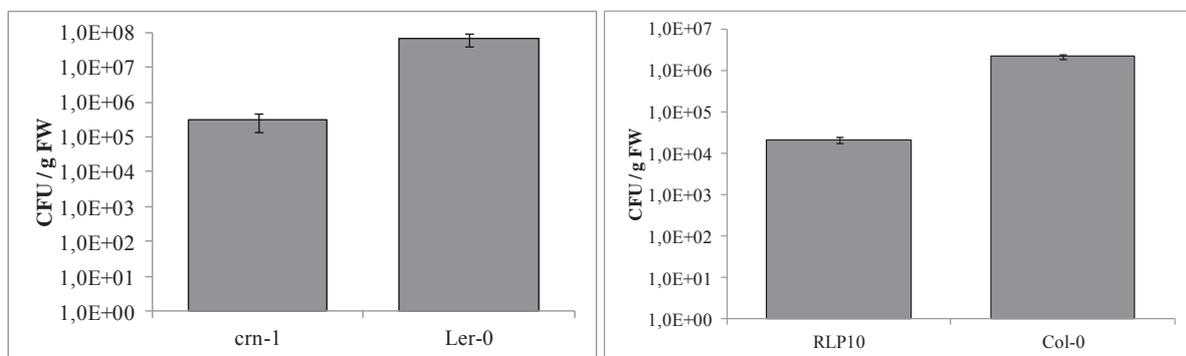
**Fig S3.** Disease symptoms and *in planta* bacterial growth of strain GMI1000 in *crn-1* and *RLP10* plants.

**a.** Symptom development after inoculation with GMI1000 strain of *R. solanacearum*. Experiments were repeated twice using at least 21 plants **b.** *In planta* bacterial growth 4 dai (25% of wilting symptoms or DI = 1). The experiment was done twice as described in material and methods. Error bars represent standard errors to the mean.

**a.**



**b.**



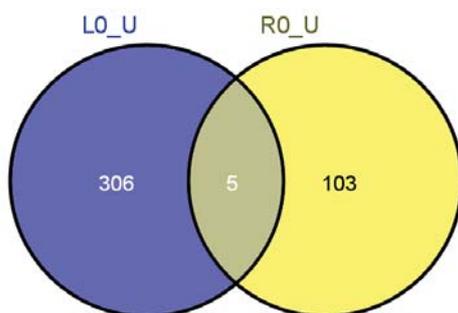
**Fig S4.** Up- and down-regulated genes during infection in *clv1-12* leaves and roots compared to wild type Ws-2 plants.

**a.** Number of genes up- and down-regulated in 4 week old plants before infection (T0) and 4 days after RD15 inoculation corresponding to 25% of wilted leaves (D1). **b.** Venn diagram of Up-regulated genes in both roots (R0\_U) and leaves (R0\_U) before infection. **c.** Up-regulated genes in both roots (RD1\_U) and leaves (LD1\_U) at D1.

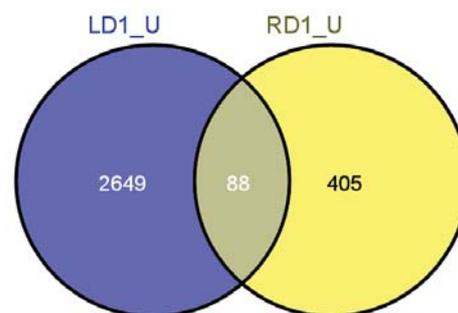
**a.**

		Up-regulated	Down-regulated
<b>T0</b>	<b>Leaves</b>	<b>331</b>	<b>180</b>
	<b>Roots</b>	<b>108</b>	<b>117</b>
<b>D1</b>	<b>Leaves</b>	<b>2740</b>	<b>2320</b>
	<b>Roots</b>	<b>494</b>	<b>979</b>

**b.**

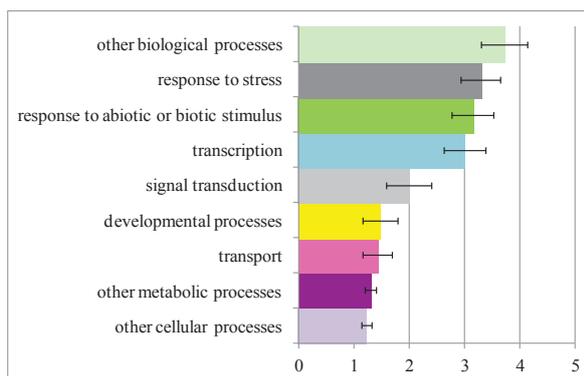


**c.**

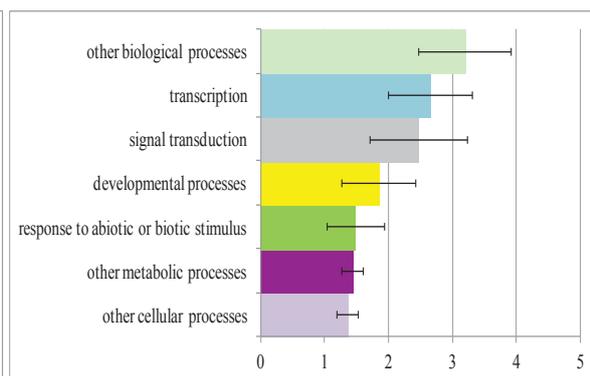


**Fig S5.** Biological process classification using Bar SuperViewer from the list of up-regulated genes in, **a.** leaves at T0 (331 genes entered – 305 classified), **b.** roots at T0 (108 genes entered – 106 classified) , **c.** leaves at D1 (2740 genes entered – 2696 classified) and **d.** roots at D1 (494 genes entered – 484 classified). Data shown were normalized according to the frequency of a given class versus all ID numbers.

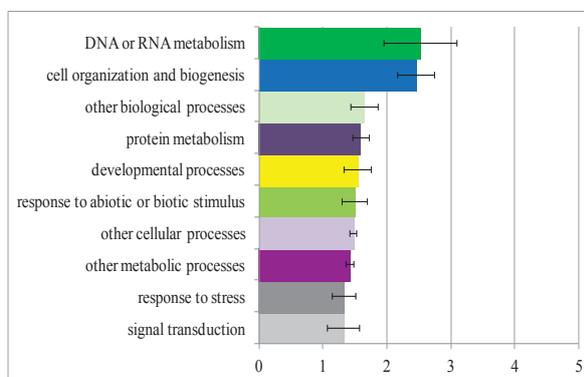
**a.**



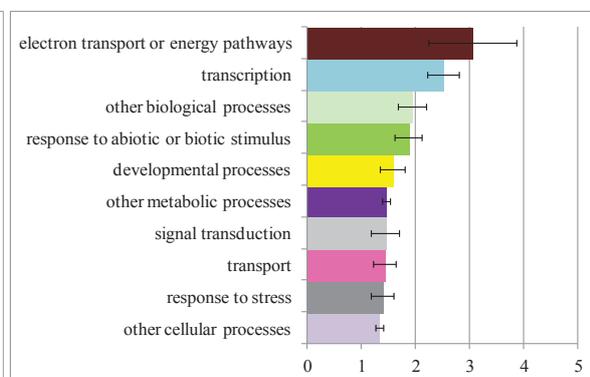
**b.**



**c.**

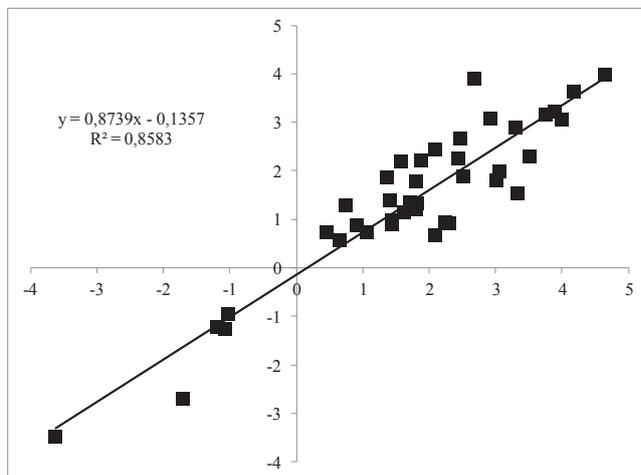


**d.**



**Fig S6.** Validation by qRT-PCR of Affymetrix data on some genes.

Scatter diagram of gene expression ratios (Log2) of At1g01380, At1g10470, At1g17590, At1g19050, At1g48500, At1g54160, At1g72830, At3g05690, At3g14020, At3g16360, At3g20910, At3g48100, At4g24040, At4g33950, At5g06510, At5g46330, At5g57220, At5g59310 and At5g59320 for conditions in which the genes significantly are up- or down-regulated (Table 2 – FRD < 0.03). X-axis is for Affymetrix expression ratio data (log2) and Y-axis is for the qRT-PCR expression ratio data (Log2). The line represents the linear regression defined by the equation:  $y = 0.8739x - 0.1357$  with a  $R^2 = 0.8583$ .



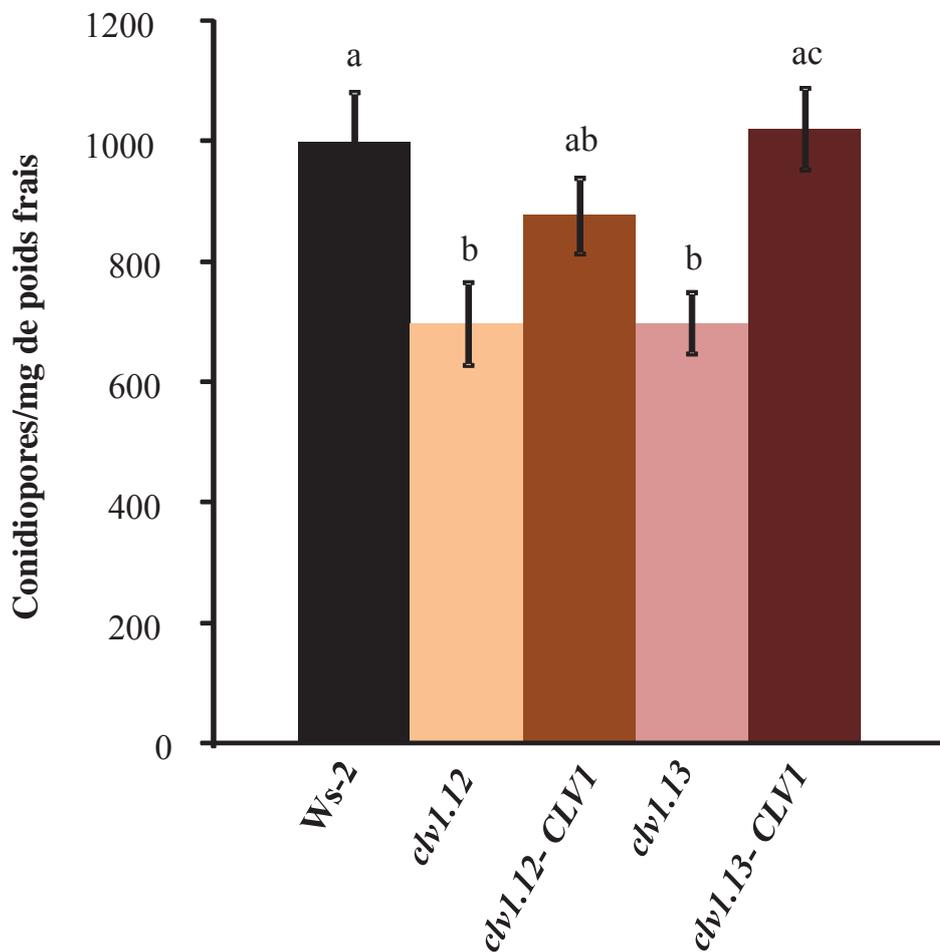
**Table S1.** Response of *clv1-12* and *clv1-13* mutant to strains belonging to different *R. solanacearum* phlotypes (Lebeau *et al.*, 2011). The experiments were repeated three times using at least 12 plants per essay. NS. : no symptoms, S: Susceptible, ER: enhanced resistance.

Strain Name	Phylotype	Arabidopsis line		
		Ws-2	<i>clv1-12</i>	<i>clv1-13</i>
<i>GMI1000</i>	I	S	ER	ER
<i>PSS190</i>	I	S	ER	ER
<i>Rd15</i>	I	S	ER	ER
<i>CFBP2957</i>	IIA	S	ER	ER
<i>MOLK2</i>	IIB	S	ER	ER
<i>PSI07</i>	IV	NS	NS	NS

**Table S2.** Response of *clv1-12* and *clv1-13* plants to different pathogens. Plants were inoculated with different pathogens as described in Material and Methods. Experiments were repeated twice. =: no difference compared to *wt* plants; -: development of more severe symptoms than in *wt* plants.

Pathogen	Type		Infection type	Tolerance
<i>Verticillium dahliae</i>	Fungus	Hemi-biotroph	Roots	=
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Fungus	Necrotroph	Leaves	-
<i>Botrytis cinerea</i>	Fungus	Necrotroph	Leaves	-
<i>Alternaria brassicola</i>	Fungus	Necrotroph	Leaves	=
<i>Xanthomonas campestris</i>	Bacterium	Biotroph	Leaves	=
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacterium	Biotroph	Leaves	=





**Figure 28. La protéine CLV1 est responsable de la sensibilité à l'oomycète *H. arabidopsidis*.**

Mesure de la production de conidiospores de plantes sauvages (Ws-2), des mutants *clv1.12* et *clv1.13* et d'une lignée complétée pour chaque mutant (*clv1.12-CLV1* et *clv1.13-CLV1*) suite à l'infection par *H. arabidopsidis*. La quantité de conidiospores par mg de poids frais est réduite d'environ 30% chez les deux mutants alléliques *clv1.12* et *clv1.13* comparés à l'écotype sauvage Ws-2. Les lignées complétées présentent une sensibilité comparable à celle de l'écotype sauvage. Les barres représentent la moyenne de 20 échantillons. Les différences significatives sont déterminées par un test de Student (lettre identique, pas de différence significative avec  $P > 0.01$ , lettre différente, différence significative avec  $P < 0.01$ ).

## PARTIE II : RESULTATS COMPLEMENTAIRES

### A. Rôle de CLV1 au cours de l'infection par *H. arabidopsidis*

La protéine CLV1 semble avoir un rôle plus général dans les interactions plantes-microorganismes. En effet, nous avons observé que les plantes *clv1* présentent une sensibilité accrue à deux champignons nécrotrophes (cf RESULTATS partie I). Ces mutants présentent également une résistance accrue en réponse à l'oomycète *H. arabidopsidis* (Fig. 28). Cette observation est surprenante puisque le processus infectieux de cet agent pathogène biotrophe est très différent de celui de *R. solanacearum*. En effet, *H. arabidopsidis* est un agent pathogène foliaire et non-vasculaire. Nous avons donc cherché à savoir si les mécanismes de résistance des mutants *clv1* contre ces deux agents pathogènes étaient les mêmes en utilisant différentes approches. Les travaux présentés dans cette section sur *H. arabidopsidis* sont réalisés en collaboration avec Harald Keller (INRA Antibes).

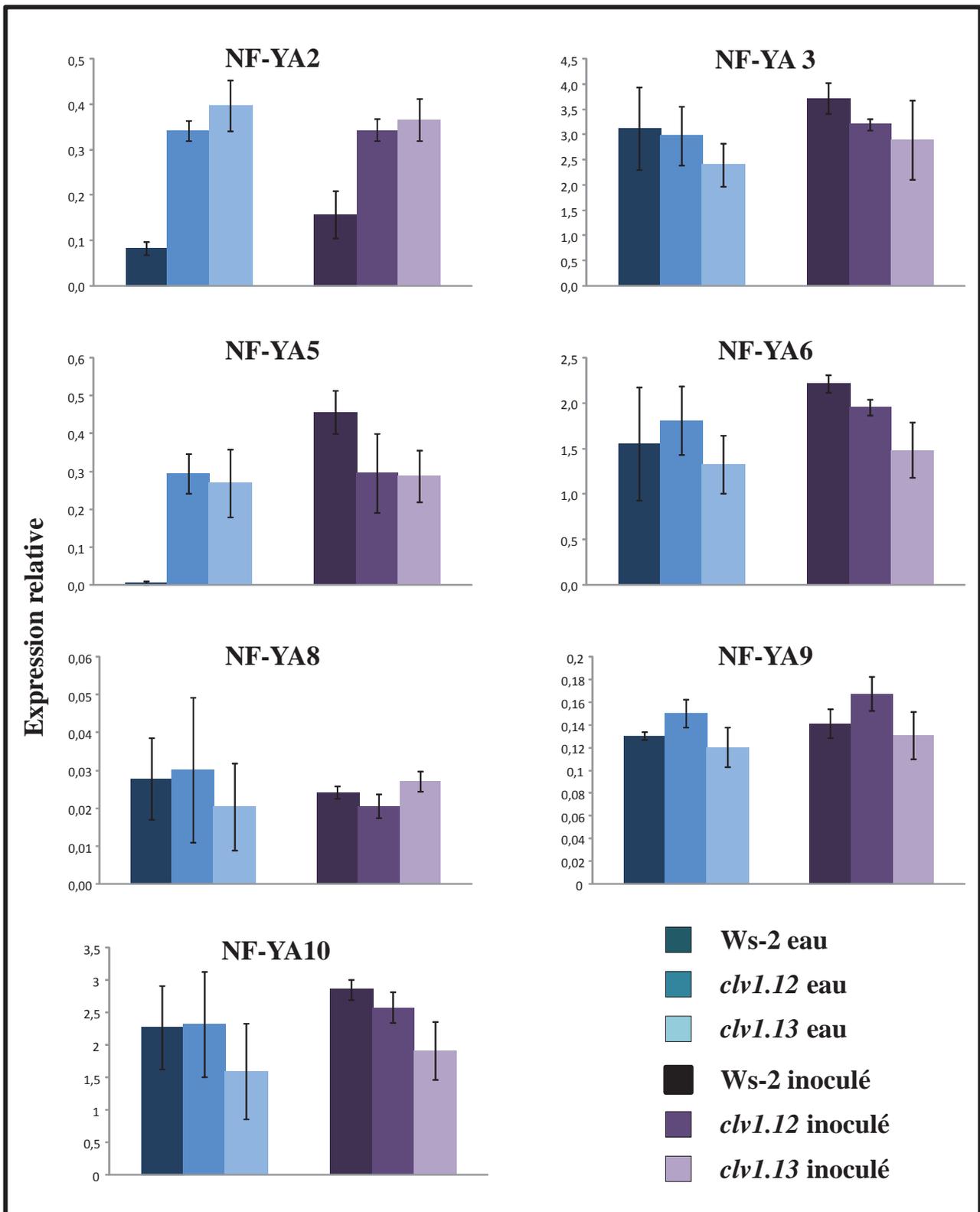
#### 1. Complémentation des mutants *clv1* en réponse à *H. arabidopsidis*

Le rôle de la protéine CLV1 dans la sensibilité d'*A. thaliana* à *H. arabidopsidis* a été confirmé par des expériences de complémentation. En effet, l'expression de la construction *pCLV1:CLV1* chez les mutants *clv1-12* et *clv1-13* restaurent la sensibilité des mutants au même niveau que celle de l'écotype sauvage (Fig. 28). Même si *H. arabidopsidis* n'est pas un pathogène vasculaire, il sera intéressant d'évaluer la complémentation des lignées exprimant le gène *CLV1* spécifiquement dans le phloème.

#### 2. Les mécanismes de résistance des plantes *clv1* à *H. arabidopsidis* et *R. solanacearum* sont-ils conservés ?

Afin de déterminer si les mécanismes impliqués dans la résistance des plantes *clv1* en réponse à *R. solanacearum* et *H. arabidopsidis* sont similaires, une analyse de transcriptome a été réalisée. Les résultats en cours d'analyse suggèrent que les mécanismes mis en jeu au cours des 2 types d'interaction sont différents. En particulier, l'expression des gènes *NF-YA* semble peu altérée dans le contexte de l'infection par l'oomycète.

Cette observation a été confirmée par l'analyse de l'expression de ces gènes par qRT-PCR. Le niveau d'expression de certains d'entre eux, particulièrement dérégulés dans les plantes *clv1* dans le contexte de l'interaction avec *R. solanacearum*, a été mesuré dans des plantes infectées par *H. arabidopsidis* comparées à d'autres traitées à l'eau (Fig. 29). Cette analyse



**Figure 29. Expression de gènes de la famille *NF-YA* au cours de l'infection par *H. arabidopsidis*.**

Accumulation de transcrits déterminée par qRT-PCR en réponse à un traitement à l'eau (en bleu), ou 3 jours après inoculation par des conidiospores d'un isolat virulent de *H. arabidopsidis* (en violet), chez les plantes sauvages *Ws-2* (couleur foncée) et mutantes *clv1.12* et *clv1.13* (respectivement de couleur intermédiaire et claire). L'expression relative de chaque gène a été calculée en utilisant le gène *At1g13320* en tant que gène de référence pour chaque échantillon. Chaque barre représente la moyenne de 2 répétitions biologiques et les barres d'erreur l'écart-type de la moyenne.

confirme les résultats obtenus par l'étude transcriptomique. Il faut toutefois noter que l'expression de deux gènes *NF-YA* est significativement modifiée :

- le niveau d'expression du gène *NF-YA2* est 3 à 4 fois plus élevé dans les plantes *clv1* que dans les plantes sauvages aussi bien dans la condition témoin (traitement à l'eau) qu'après infection par *H. arabidopsidis*.

- le gène *NF-YA5* quant à lui, est très fortement surexprimé dans les plantes *clv1* par comparaison à des plantes sauvages dans la condition témoin. De plus, ce gène est très fortement induit dans les plantes sauvages infectées par l'oomycète.

### 3. Conclusion et perspectives

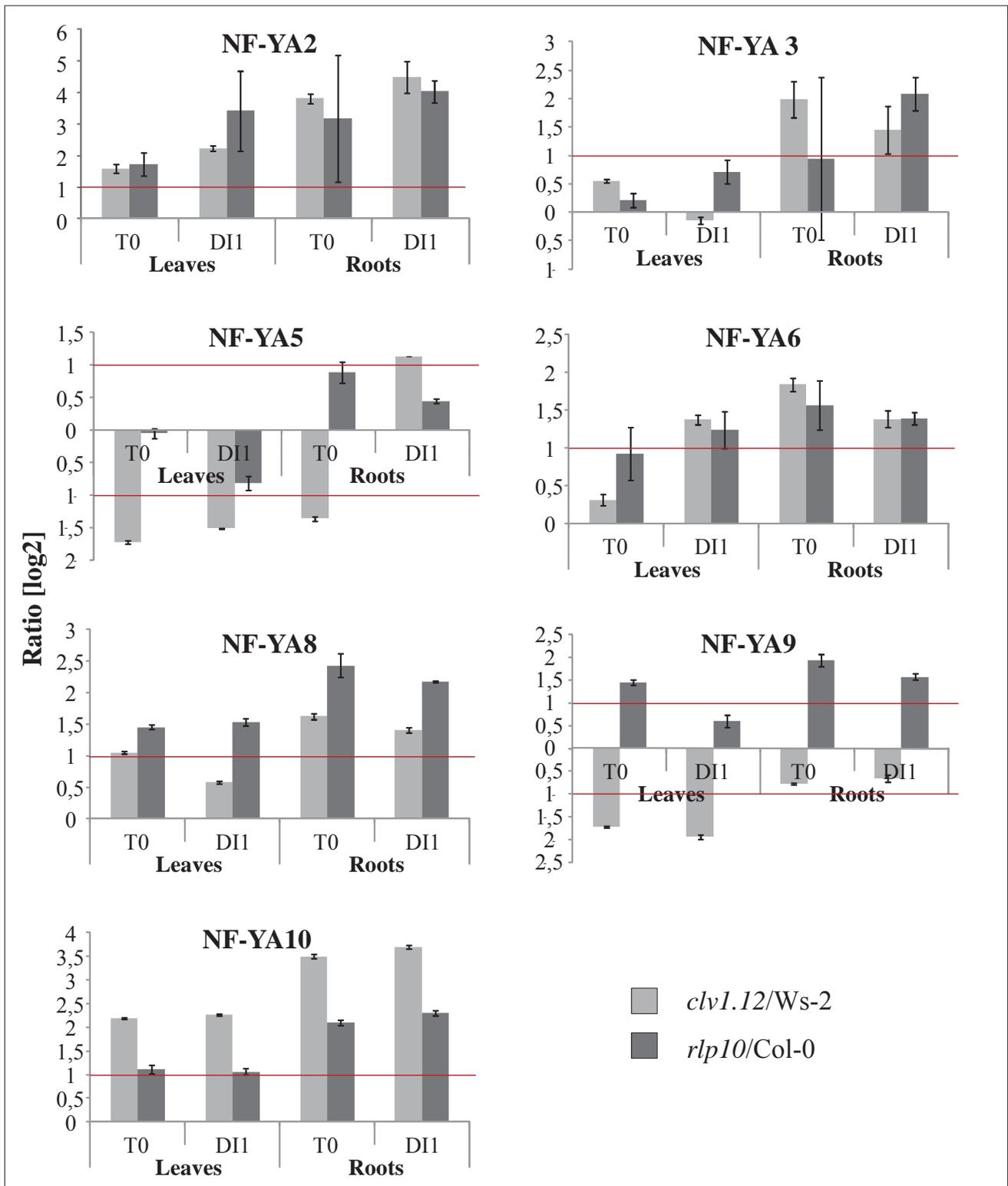
Ces résultats encore préliminaires obtenus suggèrent que les mécanismes sous-tendant la résistance accrue à la bactérie et à l'oomycète sont différents. Il faut toutefois noter que les plantes utilisées pour les inoculations de ces 2 agents pathogènes sont à des stades de développement différents. En effet, l'inoculation par *R. solanacearum* est réalisée sur des plantes adultes de 4 semaines alors que celle de *H. arabidopsidis* est réalisée sur des plantes de 10 jours.

De nombreuses questions restent en suspens auxquelles nous nous efforcerons de répondre :

- l'étude de la réponse de lignées mutantes et/ou surexprimant les gènes *NF-YA5* et *NF-YA2* en réponse à *H. arabidopsidis* devrait nous permettre de déterminer s'ils jouent réellement un rôle fonctionnel dans cette interaction.

- il est également envisagé de tester l'importance des voies SA, JA et ET sur la résistance accrue des plantes *clv1* à l'oomycète. L'utilisation des double mutants *clv1/jar1*, *clv1/sid2* et *clv1/ein2-1*, permettra de répondre à cette question.

- par ailleurs, les plantes *clv2* présentent également une résistance accrue en réponse à *H. arabidopsidis*. Diverses expériences seront réalisées afin de vérifier si les mécanismes mis en jeu sont les mêmes chez les mutants *clv1* et *clv2*. Par exemple, le niveau d'expression des gènes *NF-YA* sera mesuré et l'implication des voies SA, JA et ET dans la résistance accrue des plantes *clv2* à l'oomycète sera évalué à l'aide de double mutants.



**Figure 30. Expression de gènes de la famille NF-YA chez les mutants *clv1* (*clv1.12*) et *clv2* (*rlp10*).**

Les mesures en qRT-PCR ont été réalisées sur des feuilles et des racines de plantes de 4 semaines avant l'inoculation par *R. solanacearum* (T0) et à l'apparition des premiers symptômes de maladie (DI1) des plantes sauvages. Les valeurs correspondent au ratio de l'expression relative des mutants *clv1* ou *clv2* rapportée à celle de leur écotype sauvage respectif. L'expression relative de chaque gène a été calculée en utilisant le gène *At1g13320* en tant que gène de référence pour chaque échantillon. La ligne rouge indique le seuil de significativité. Chaque barre représente la moyenne de 2 répétitions biologiques et les barres d'erreur l'écart-type de la moyenne.

## **B. Rôle de CLV2 et CRN au cours de l'infection par *R. solanacearum*** (travail réalisé en collaboration avec Xavier Barlet)

Parmi les différents mutants affectés dans la voie de signalisation CLV testés en réponse à *R. solanacearum*, nous avons observé que les mutants *clv2* et *crn* présentent également une résistance accrue (cf Résultats partie I). L'étape de perception de cette voie de signalisation semble donc déterminante pour l'établissement de la maladie causée par cet agent pathogène. De plus, tout comme la protéine CLV1, les protéines CLV2 et CRN sont exprimées au niveau des tissus vasculaires (Müller *et al.*, 2008 ; Replogle *et al.*, 2011) ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte de l'interaction avec la bactérie vasculaire *R. solanacearum*.

### **1. Les mécanismes de résistance des plantes *clv1*, *clv2* et *crn* à *R. solanacearum* sont-ils similaires ?**

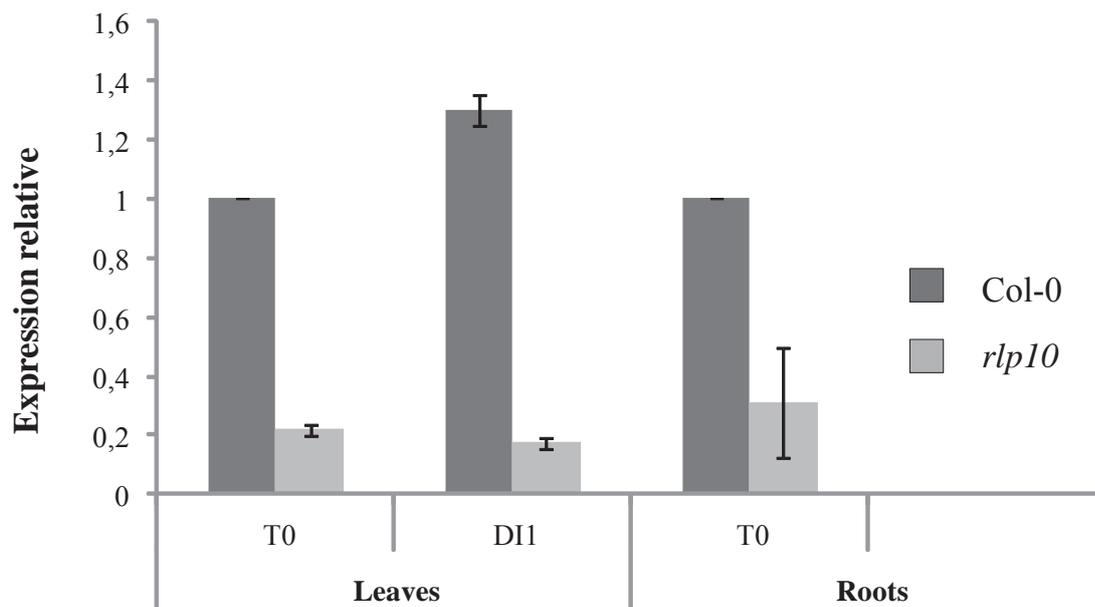
Nous nous intéressons désormais aux mécanismes sous-tendant la résistance de ces 2 mutants. Des analyses de transcriptome, en cours d'analyse, ont été effectuées avec le mutant *clv2* selon le même plan expérimental que pour le mutant *clv1*. Les listes de gènes dont l'expression est altérée dans ces deux transcriptomes seront croisées. Des observations préliminaires montrent une forte altération de l'expression des gènes *NF-YA*, résultats qui ont été validés par qRT-PCR (Fig. 30). Les profils d'expression des membres de cette famille de gènes dans les plantes *clv2* est très similaire à celui observé dans les plantes *clv1* (Fig. 30). De plus, la surexpression de ces gènes est corrélée avec la réduction de la quantité de miR169 comme le montre le dosage des miRNAs de la famille miR169 dans les plantes *clv2* (Fig. 31).

### **2. Conclusion et perspectives**

Les plantes *clv2* ont été transformées par des constructions surexprimant les microARNs miR169a ou miR169d. L'évaluation de la sensibilité de ces plantes transgéniques à *R. solanacearum* nous permettra de déterminer l'importance de ces microARNs dans la résistance accrue des plantes *clv2*.

La mesure du niveau d'expression des gènes *NF-YA* ainsi que le dosage des miR169 seront également réalisés sur les plantes *crn* afin de déterminer si les mécanismes de résistance de ces plantes peuvent être communs avec les plantes *clv1* et *clv2*.

Même si ces données sont encore préliminaires, elles suggèrent que les mécanismes aboutissant à la résistance accrue des plantes *clv1* et *clv2* à *R. solanacearum* sont très similaires. L'analyse du transcriptome des plantes *clv2* permettra de définir dans quelle



**Figure 31. Comparaison de l'expression des microARNs de la famille miR169 chez l'écotype Col-0 et le mutant *clv2 (rlp10)*.**

Quantification par qRT-PCR du niveau d'expression des miR169 dans les feuilles et les racines de plantes de 4 semaines avant inoculation par *R. solanacearum* (T0) et à l'apparition des premiers symptômes de maladie (DI1) des plantes sauvages. Chaque barre représente la moyenne de 2 répétitions biologiques et les barres d'erreur l'écart-type de la moyenne.

mesure les transcriptomes des mutants *clv1* et *clv2* se recoupent et d'envisager différentes hypothèses quant à la similarité de leurs mécanismes de résistance.

### **PARTIE III : LES MECANISMES DE CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN CAUSEE PAR *R. solanacearum***

#### **Introduction générale : les moyens de lutte contre les maladies des plantes**

Chaque année, on estime que 10 à 15% de la production mondiale est perdue à cause des maladies phytopathogènes pour un coût d'environ 220 milliards de dollars (Source : Society of general microbiology). De nombreuses stratégies de lutte contre les agents pathogènes ont pourtant été développées, parmi lesquelles on peut notamment citer :

- La lutte prophylactique est une stratégie préventive. Elle consiste à limiter les contaminations en prenant diverses précautions comme la désinfection du matériel agricole et le contrôle des plants ou des graines. L'utilisation de plantes non-hôtes peut également permettre de limiter le renouvellement de l'inoculum et par la rotation des cultures, peut réduire l'incidence de certaines maladies.
- Certaines pratiques culturales, telles que l'enrichissement du sol en azote, semblent renforcer la résistance des plantes à certaines bactéries bien que les mécanismes sous-tendant cette résistance accrue ne soient pas connus.
- La lutte génétique, très utilisée ces dernières décennies, permet de créer des cultivars résistants en utilisant les ressources génétiques intra- et inter-espèces. Une résistance spécifique, très efficace contre un agent pathogène donné peut toutefois être rapidement contournée par mutation, particulièrement lors de cultures successives et prolongées. Une résistance plus générale quant à elle, n'est pas totale mais ralentit la progression de la maladie causées par un grand nombre d'agents pathogènes.
- La lutte chimique, par l'utilisation de pesticides, constitue probablement la stratégie principalement utilisée pour contrôler les maladies des plantes. Cependant, les effets nocifs de telles substances sur la santé humaine et l'environnement ont conduit à la recherche de nouvelles méthodes de lutte, plus respectueuses de l'environnement.
- La lutte biologique qui fait l'objet de cette étude, fait partie des ces nouvelles stratégies.

La lutte biologique constitue une alternative pour lutter contre les agents phytopathogènes. Cette stratégie consiste à inoculer les plantes avec des microorganismes non pathogènes ou hypovirulents, capables de prémunir les plantes d'une infection ultérieure.

Concernant le flétrissement bactérien causé par des souches virulentes de *R. solanacearum*, différentes espèces de microorganismes sont capables de protéger les plantes de cet agent pathogène. On peut notamment citer des champignons mycorhiziens à arbuscules (Halos & Zorilla, 1979) et certaines bactéries antagonistes appartenant aux espèces *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* et *Streptomyces* (Frey *et al.*, 1994). Ces études fournissent souvent des résultats prometteurs de protection contre *R. solanacearum* dans des conditions contrôlées. Toutefois, leur application en champ se heurte à de nombreux problèmes notamment en raison des faibles capacités de compétition et d'adaptation de ces microorganismes par comparaison à des souches locales de *R. solanacearum* et aussi en raison des conditions environnementales.

Initialement, des tests de protection ont été réalisés sur des plants de tomate avec différents mutants affectés dans le locus *hrp*. Bien que ces mutants soient capables d'envahir la plante, leur colonisation et leur multiplication est réduite par rapport à une souche virulente (Trigalet & Trigalet –Demery, 1990). Ces souches non-pathogènes sont capables d'induire la protection contre une infection ultérieure par une souche virulente de *R. solanacearum* (Trigalet & Trigalet –Demery, 1990 ; Etchebar *et al.*, 1998). En outre, il apparaît que cette protection est durable sans affecter drastiquement la physiologie de la plante hôte (Frey *et al.*, 1994).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la capacité de protection des mutants *hrp* :

-Induction des mécanismes de défense chez la plante

Un brunissement des cellules proches des vaisseaux de xylème infectés par les mutants *hrp* ainsi que leur capacité à induire des réponses de défense suggèrent que la protection ferait aussi intervenir des mécanismes de résistance actifs (Godiard *et al.*, 1990 ; Jakobek *et al.*, 1993 ; Etchebar *et al.*, 1998). Cependant, aucune étude fine n'avait été réalisée sur ces mécanismes.

## -Compétition pour l'espace dans la plante

La compétition pour l'espace semble être impliquée dans les mécanismes de protection. En effet, les souches *hrp*- ayant la plus grande capacité de multiplication dans la plante sont les plus efficaces en terme de protection. Des travaux montrent que la colonisation du xylème par des mutants *hrp* de *R. solanacearum* constitue un facteur clé pour le contrôle biologique du flétrissement bactérien. L'utilisation de différents gènes marqueurs (*LacZ* et *UidA*), introduits respectivement chez les mutants ou chez la souche sauvage a permis les observations histologiques des deux souches simultanément. Au niveau des points de pénétration, les deux souches sont toutes deux présentes mais envahissent ensuite des vaisseaux du xylème différents dans le système racinaire (Etchebar *et al.*, 1998). Cependant, la compétition entre les souches de *R. solanacearum* ne permet pas d'expliquer à elle seule la résistance puisque dans certains cas, il n'existe pas de corrélation stricte entre une multiplication importante des mutants *hrp* et un niveau de protection élevé (Frey *et al.*, 1994).

Dans cet article, nous avons adapté la méthode de protection de la tomate à *A. thaliana* afin de faciliter l'étude des mécanismes impliqués dans la protection conférée par des souches non-pathogènes de *R. solanacearum*. La combinaison d'approches génétiques et transcriptomiques utilisées dans cette étude a permis d'ouvrir la voie vers la compréhension des mécanismes de contrôle biologique de la maladie du flétrissement bactérien.

# Biological control of bacterial wilt in *Arabidopsis thaliana* involves abscissic acid signalling

Dong Xin Feng<sup>1,2,3\*</sup>, Céline Tasset<sup>1,2\*</sup>, Mathieu Hanemian<sup>1,2\*</sup>, Xavier Barlet<sup>1,2</sup>, Jian Hu<sup>4</sup>,  
Dominique Trémouygue<sup>1,2</sup>, Laurent Deslandes<sup>1,2\*</sup> and Yves Marco<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, Laboratoire des Interactions Plantes–Microorganismes (LIPM), UMR441, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France; <sup>2</sup>CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes–Microorganismes (LIPM), UMR2594, Chemin de Borde Rouge F-31326 Castanet-Tolosan, France; <sup>3</sup>Department of International Cooperation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 12 Zhongguancun South Street, Beijing 100081, China; <sup>4</sup>College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

## Summary

Author for correspondence:  
Yves Marco  
Tel: +33 5 61 28 55 09  
Email: yves.marco@toulouse.inra.fr

Received: 13 October 2011  
Accepted: 8 February 2012

New Phytologist (2012)  
doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04113.x

**Key words:** abscissic acid (ABA), *Arabidopsis thaliana*, biological control, defense signalling, *hrp* genes, microarray, *Ralstonia solanacearum*.

- Means to control bacterial wilt caused by the phytopathogenic root bacteria *Ralstonia solanacearum* are limited. Mutants in a large cluster of genes (*hrp*) involved in the pathogenicity of *R. solanacearum* were successfully used in a previous study as endophytic biocontrol agents in challenge inoculation experiments on tomato. However, the molecular mechanisms controlling this resistance remained unknown.
- We developed a protection assay using *Arabidopsis thaliana* as a model plant and analyzed the events underlying the biological control by genetic, transcriptomic and molecular approaches.
- High protection rates associated with a significant decrease in the multiplication of *R. solanacearum* were observed in plants pre-inoculated with a  $\Delta hrpB$  mutant strain. Neither salicylic acid, nor jasmonic acid/ethylene played a role in the establishment of this resistance. Microarray analysis showed that 26% of the up-regulated genes in protected plants are involved in the biosynthesis and signalling of abscissic acid (ABA). In addition 21% of these genes are constitutively expressed in the irregular xylem cellulose synthase mutants (*irx*), which present a high level of resistance to *R. solanacearum*.
- We propose that inoculation with the  $\Delta hrpB$  mutant strain generates a hostile environment for subsequent plant colonization by a virulent strain of *R. solanacearum*.

## Introduction

Plants actively respond to a variety of chemical stimuli produced by soil- and plant-associated microbes. Such stimuli can either induce or condition plant host defenses that enhance resistance against subsequent infection by a variety of pathogens. Distinct defense pathways are activated by plants depending on the type of invader encountered.

Pre-treatment of plants with several types of bacteria including living and killed saprophytic bacteria, avirulent bacteria and *hrp*<sup>-</sup> (hypersensitive reaction and pathogenicity) bacterial mutants induced a wide range of defense mechanisms. A well documented induced response, known as systemic acquired resistance (SAR), involves the production of the signal molecule salicylic acid (SA) that plays a central role in the activation of disease resistance responses in plants (Ryals *et al.*, 1996; Vlot *et al.*, 2008). Another type of induced resistance, referred to as induced systemic resistance (ISR), develops in response to colonization of plant roots by selected strains of non-pathogenic rhizobacteria (Van Loon *et al.*, 1998; Shores *et al.*, 2010). In contrast to SAR, SA is not

required for ISR but components of the jasmonic acid (JA) and ethylene responses are necessary (Knoester *et al.*, 1999; van Wees *et al.*, 2000).

Bacterial wilt caused by the phytopathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* is one of the most important plant diseases worldwide (Hayward, 1991). *Ralstonia solanacearum* infects > 200 plant species including many species of agronomic importance, such as potato, tomato, peanut and banana. Wilt disease is endemic in all the tropical and subtropical areas and difficult to control because of the soil-borne nature of the bacterium. The most effective method is the use of resistant crop varieties, which can be effective in one environment but is often overcome by virulent pathogen isolates when environmental conditions change. Another strategy is based upon inoculation of tomato or potato with a *R. solanacearum hrp*<sup>-</sup> mutant strain followed by subsequent inoculation with a virulent strain. Under standardized conditions, protection rates > 80% were recorded 4 wk after pathogen inoculation (Trigalet & Trigalet-Demery, 1990; Frey *et al.*, 1993). The ability of the *hrp*<sup>-</sup> mutants to protect tomato plants from a subsequent attack by a virulent strain of the pathogen was not caused by a direct antagonism between the two strains, both derived from the same parental GM11000 strain

\*These authors contributed equally to this work.

(Frey *et al.*, 1994). This protective capacity appeared to be correlated with the ability of *hrp*<sup>-</sup> mutants to colonize xylem vessels (Frey *et al.*, 1994). Competition for space between the two bacterial strains may therefore be involved in the mechanism of protection (Etchebar *et al.*, 1998).

These observations do not however exclude the possibility of the induction of defense in susceptible hosts in response to invasion by the *hrp*<sup>-</sup> strain (Kempe & Sequeira, 1983; Frey *et al.*, 1993; Trigalet *et al.*, 1994). Vascular browning of cells in the vicinity of invaded tomato xylem vessels observed after inoculation with an *hrp*<sup>-</sup> strain as well as the fact that such mutants are capable of activating defense responses suggest the involvement of active plant defense mechanisms which may contribute to the protective effect of the *hrp*<sup>-</sup> strain (Godiard *et al.*, 1990; Jakobek *et al.*, 1993; Etchebar *et al.*, 1998).

Studies of the genetic basis of resistance to *R. solanacearum* showed the existence of complex mechanisms in tomato (Thoquet *et al.*, 1996a,b). To date, the *Arabidopsis thaliana* gene *RRS1-R* is the only characterized resistance gene (*R*) that confers resistance to *R. solanacearum* (Deslandes *et al.*, 2002, 2003). *Arabidopsis* mutants unable to develop disease symptoms upon infection by the bacteria were also identified. Indeed, mutations (*irx*) in any of the three *Arabidopsis* cellulose synthases (CESAs) required for secondary cell wall formation (IRX1/CESA8, IRX3/CESA7 and IRX5/CESA4) conferred enhanced resistance to *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Genetic and transcriptomic analyses revealed that *IRX/CESA*-mediated resistance was independent of SA, ET and JA signalling and identified a group of constitutively up-regulated genes, including abscisic acid (ABA)-responsive genes, in *irx/cesa* plants (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007).

In this report, *A. thaliana* was used as a model plant to better understand the molecular mechanisms involved in the biological control of bacterial wilt. Our data suggest that protection mediated by a *hrp*<sup>-</sup> mutant strain relies on a novel molecular mechanism different from those involved in SAR and ISR and based on the manipulation of components of the ABA biosynthetic and response machinery.

## Materials and Methods

### Bacterial strains

The GMI1000 strain of *Ralstonia solanacearum* is a tomato wild type isolate (Boucher *et al.*, 1987), which is virulent on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia (Col-0) and induces resistance on *A. thaliana* ecotype Niederzens (Nd-1). The *R. solanacearum*  $\Delta$ *hrpB* mutant strain used in this study is a derivative of strain GMI1000 (GMI1525, Genin *et al.*, 1992). Both were grown at 28°C in BGT medium (Boucher *et al.*, 1987). GMI1000 and GMI1525 bacteria were selected on rifampicin (50 µg ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (40 µg ml<sup>-1</sup>), respectively.

### Plant materials and inoculations

Four-week-old *A. thaliana* plants were root-inoculated by the  $\Delta$ *hrpB* mutant strain in a suspension of  $5 \times 10^8$  colony-forming

units (CFU) ml<sup>-1</sup>, as previously described (Deslandes *et al.*, 1998). Twenty-four hours after the first inoculation, plants were challenged by the virulent GMI1000 strain at a concentration of  $2 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>. Pathogenicity tests were conducted until complete wilting of unprotected plants. Heat-killed *R. solanacearum* bacteria were boiled for 30 s and used to inoculate plants in a suspension of  $5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Bacterial internal growth curves were performed according to the protocol described by Deslandes *et al.*, 1998. Disease symptoms were scored according to the percentage of wilted leaves, using the following a 0–4 scale (0, no wilting; 1, 0–25%; 2, 25–50%; 3, 50–75%; 4, 75–100% of wilted leaves).

Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC3000) were performed using  $\Delta$ *hrpB*-inoculated or water-treated *Arabidopsis* plants as described above. After 24 h, plants were leaf-infiltrated with  $2 \times 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup> of *Pst* DC3000 bacterial suspensions. Symptoms were scored at 5, 6, 7 and 8 d after infection. Plant inoculation with *Pst* DC3000 and *in planta* bacterial growth measured at 0 and 3 d after infiltration were performed as described in Raffaele *et al.* (2006).

*Arabidopsis* signalling mutants used in this study were obtained from the *Arabidopsis* Stock Center (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, Nottingham, UK). The *pad2* and *pad4* mutants were kindly provided by F. Ausubel (Harvard Medical School, Boston, USA).

### Transcriptome analysis

Microarray analysis was performed on aerial parts of five plants harvested 24 h after water treatment or inoculation by the  $\Delta$ *hrpB* strain and 5 d (25% of wilted leaves) after challenge inoculation with the GMI1000 virulent *R. solanacearum* strain. Two biological replicates corresponding to RNA extracted from different plants in two independent experiments were conducted. Total RNA was isolated from frozen tissues using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel; GmbH&Co.KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentrations were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, <http://www.nanodrop.com>) and RNA integrity was confirmed by Bioanalyzer 2100 electrophoresis (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com>). Probes were synthesized from RNA samples and hybridized to the Affymetrix *Arabidopsis* ATH1 GeneChip arrays (Affymetrix, <http://www.affymetrix.com>) according to the procedures provided by the manufacturer. Probes and hybridizations were performed by the microarray platform of Strasbourg Alsace-Lorraine Genopole at the IGBMC (<http://www-microarrays.u-strasbg.fr>).

Expression measures were normalized by the Robust Multi-array Average (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003) implemented in Bioconductor packages. The pairwise comparison between the two biological replicates of water-treated sample and the two replicates of the *hrp*<sup>-</sup> inoculated samples was performed to identify differentially expressed genes. A similar comparison between  $\Delta$ *hrp*<sup>-</sup> and water-treated samples was performed 5 d after inoculation with the virulent strain.

A statistical analysis was performed with the LIMMA package using an empirical Bayes linear modelling approach (Smyth, 2004, 2005) and *P*-values were adjusted by the Benjamini and Hochberg method which controls the false discovery rate (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995). Significant up-regulated and down-regulated genes were selected using an adjusted FDR value of 0.01 and normalized ratios (Signal Log<sub>2</sub> Ratio) of 0.8 relative to water-treated samples.

For real time RT-PCR analysis, the aerial parts of four plants were collected and RNA purified as described above for the transcriptional analysis. qRT-PCR reactions were performed in 384-well plates with a Lightcycler LC480 (Roche, <http://www.roche-applied-science.com>) using the LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I kit on 1 µg of total RNA (Roche applied Science, <http://www.roche-applied-science.com>) and cDNAs 10-fold diluted before use. The following conditions were used: one cycle of 9 min at 98°C followed by 45 cycles of 5 s at 95°C, 10 s at 65°C and 20 s at 72°C. The primer sets used in the experiments are listed in Supporting Information Table S6. The specificity of the amplification was systematically checked by melting curve analysis at the end of each run of real time RT-PCR. The relative expression of each gene of interest was calculated using At1g13320 as a reference gene for each sample.

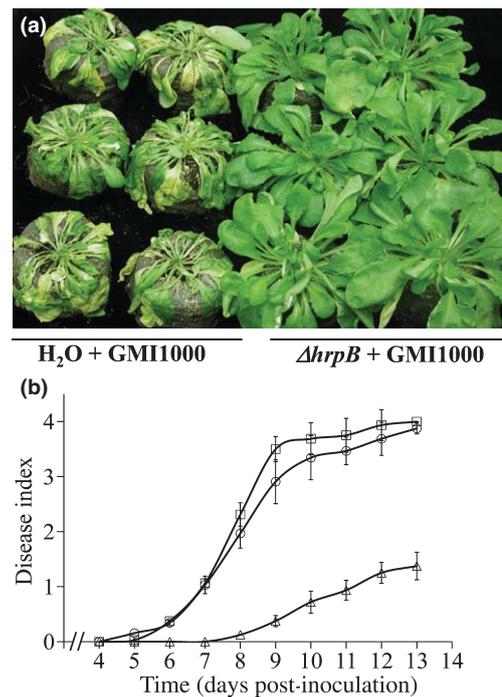
#### Accession numbers

The microarray hybridization data have been submitted to Array-Express database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>; accession number: E-MTAB-542).

## Results

Pre-inoculation of susceptible Col-0 plants with a  $\Delta hrpB$  strain led to increased resistance to strain GMI1000 of *R. solanacearum*

*Hrp* genes encode components of type III secretory pathways and are required by many phytopathogenic bacteria to elicit a hypersensitive response (HR) on non-host or resistant host plants and for pathogenesis on susceptible hosts (Alfano & Collmer, 1997). Genetically engineered *R. solanacearum* mutants in these genes have been described as potential biocontrol agents of tomato and potato bacterial wilt (Genin *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998). We reasoned that *Arabidopsis* may be a more suitable system to investigate the molecular mechanisms underlying plant protection mediated by *hrp*<sup>-</sup> mutant strains. Four-week-old *Arabidopsis* susceptible Col-0 plants were either root-inoculated with an avirulent *R. solanacearum* strain mutated in the *hrpB* gene that encodes an AraC family regulator (Genin *et al.*, 1992; Cunnac *et al.*, 2004) or treated with water. Twenty-four hours later, these plants were subsequently challenged with the virulent GMI1000 strain of *R. solanacearum*. Pre-inoculation with the  $\Delta hrpB$  strain protected the plants since only light wilting symptoms were observed 13 d after inoculation with the pathogenic strain (Fig. 1a,b). By contrast, when plants were pretreated only with water and later challenged with the virulent pathogen, wilt



**Fig. 1** Pre-inoculation with a  $\Delta hrpB$  strain protects plants from a subsequent challenge with a virulent *Ralstonia solanacearum* strain. (a) Phenotypic responses of *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants treated with water (left panel) or inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain (right panel), 9 d after subsequent root inoculation by the *R. solanacearum* GMI1000 strain. (b) Disease symptom development curves. Plants were scored daily using a scale between 0 and 4. Means and standard errors (SE) were calculated from a total of 70 plants per assay (from three independent experiments). Open triangles, Col-0 plants inoculated with  $\Delta hrpB$  and challenged with the virulent GMI1000 strain 24 h later; open circles, Col-0 plants co-inoculated with the  $\Delta hrpB$  and GMI1000 strains; open squares, Col-0 plants treated with water and inoculated with GMI1000 strain after 24 h.

disease developed 4–6 d after inoculation with the GMI1000 strain, leading to plant death after 8–10 d. The protective effect was observed whether inoculation with GMI1000 was performed 24, 48, 72 h or 1 wk after pre-inoculation with the  $\Delta hrpB$  mutant (data not shown).

This protection might require an active plant metabolism or result from a direct physical competition for space within the xylem vessels between the two strains, which might lead to exclusion of the GMI1000 strain by the  $\Delta hrpB$  mutant. In order to distinguish between these two hypotheses, both the virulent and avirulent strains were simultaneously co-inoculated using a 1 : 10 ratio. Even under these conditions that favored multiplication of the  $\Delta hrpB$  strain, co-inoculated plants wilted in a similar manner than control plants pre-treated with water (Fig. 1b). This suggests that competition is not the main determinant of  $\Delta hrpB$ -induced protection.

Various pretreatments induce different levels of resistance to a challenge inoculation with the pathogenic GMI1000 strain

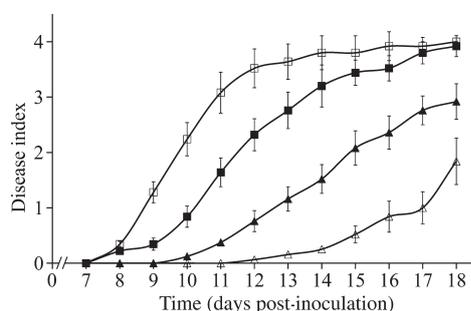
Several pioneering studies showed that pretreatment with various compounds such as bacterial lipopolysaccharides (LPS), avirulent or heat-killed bacteria (Sequeira & Hill, 1974; Rathmell &

Sequeira, 1975; Graham *et al.*, 1977; Tanaka, 1983, 1985) protect plants, to a certain extent, from a subsequent inoculation with a virulent strain of *R. solanacearum*. To compare the efficiency of such treatments, susceptible Col-0 plants were pre-inoculated with *Escherichia coli* cells or heat-killed GMI1000 bacteria. A challenge inoculation with the virulent *R. solanacearum* strain was then performed 24 h later. A slight delay in symptom appearance (24–48 h) was observed in plants pre-inoculated with *E. coli* cells compared to water treated plants (Fig. 2). The protective effect was stronger in Arabidopsis plants pre-treated with heat-killed GMI1000 bacteria. None of these pre-treatments however conferred the high level of protection observed in plants protected by the  $\Delta hrpB$  mutant strain (Fig. 2).

### Pre-inoculation of susceptible plants with the $\Delta hrpB$ strain limits bacterial multiplication of the virulent bacteria

We next tested whether reduced disease symptoms correlate with lower bacterial multiplication in protected plants. Bacterial growth was monitored on aerial parts of plants after root pre-inoculation with water or the  $\Delta hrpB$  strain, followed by inoculation with the GMI1000 *R. solanacearum* strain. The ratio of inocula of the virulent vs the mutant strain was 0.1, which explains the differences observed between the concentrations of the two bacterial strains at time 0 (Fig. 3).

Control plants were inoculated either with the GMI1000 or the  $\Delta hrpB$  strain. As reported previously (Deslandes *et al.*, 1998),  $\Delta hrpB$  bacterial populations remained to low levels in Col-0 plants whereas virulent GMI1000 bacteria reached very high concentrations ( $10^{12}$  CFU g<sup>-1</sup> FW; Fig. 3). Bacterial multiplication of the  $\Delta hrpB$  strain was comparable in plants subsequently inoculated or not by the virulent GMI1000 strain. Pretreatment of plants with water before inoculation with GMI1000 did not affect bacterial multiplication that reached a comparable level to that of control plants. On the contrary, in plants pre-inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain and later challenged with the virulent strain, the bacterial density of the GMI1000 strain increased slowly and remained 4–5 orders of magnitude lower than that



**Fig. 2** Disease symptom development curves in response to different protective treatments on wilt disease development. *Arabidopsis thaliana* plants were first treated with water (open squares), or inoculated with *Escherichia coli* cells (filled squares), heat-killed GMI1000 bacteria (filled triangles) or the  $\Delta hrpB$  strain (open triangles). They were then challenged with the virulent *Ralstonia solanacearum* GMI1000 strain 24 h later. Means and standard errors (SE) were calculated from a total of 70 plants per assay (from three independent experiments).

found in water-pretreated plants (*c.*  $10^7$  CFU g<sup>-1</sup> FW). These data indicate that the pre-inoculation of susceptible plants with the  $\Delta hrpB$  strain triggers an enhanced resistance response to the virulent strain that limits its multiplication *in planta*.

### Pre-inoculation with the $\Delta hrpB$ strain protects plants against subsequent attack by a virulent strain of *Pseudomonas syringae*

We then checked whether protection caused by pre-inoculation of the *R. solanacearum*  $\Delta hrpB$  strain was specific of root pathogens or was also efficient against foliar pathogens.  $\Delta hrpB$  pre-treated plants were therefore challenged with strain DC3000 of *Pseudomonas syringae*, a foliar bacterial pathogen, virulent on Col-0 plants. Water treated plants developed chlorotic symptoms after 3 d whereas plant pre-inoculation with the  $\Delta hrpB$  strain led to a significant reduction of symptoms in response to bacterial infection (Fig. 4a), which correlated with a decrease in bacterial multiplication in protected plants 3 d after inoculation (Fig. 4b).

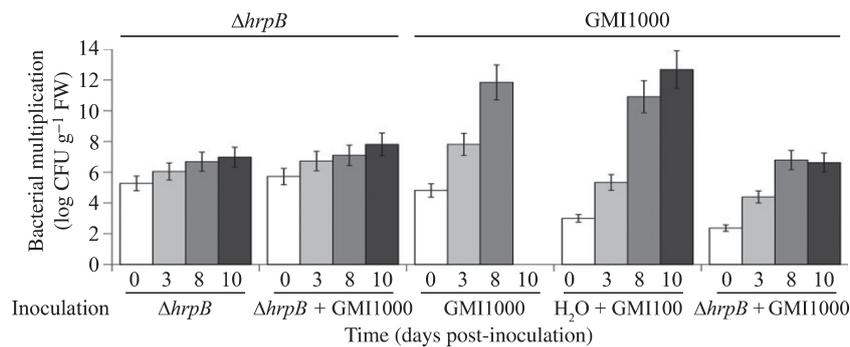
### Resistance conferred by plant pre-inoculation with a $\Delta hrpB$ strain does not involve classical defense-associated signalling pathways

The molecular mechanisms involved in biological control against *R. solanacearum* remain unexplained although various hypotheses have been proposed (Trigalet & Trigalet-Demery, 1990). In order to identify the signalling pathways involved in the establishment of this type of resistance, the protective ability of *hrpB* mutant against a subsequent invasion by a pathogenic strain was estimated in various Col-0 mutants affected in plant defense responses. The Arabidopsis mutants tested and their responses to the virulent strain GMI1000 are listed in Table 1. *NahG* and *sid2-2* plants altered in SA accumulation, as well as *cpr1*, *ndr1* and *npr1* mutants that are altered in the expression of pathogenesis-related (PR) proteins, were fully protected from the virulent GMI1000 strain after pre-inoculation with the  $\Delta hrpB$  mutant (Fig. S1). Likewise, mutants affected in the ethylene signalling pathways such as *ein2-1*, shown previously to be more tolerant to the bacteria (Hirsch *et al.*, 2002) or in the JA signalling pathways such as *jar1-1* and *coi1* displayed a similar protection to wild type plants. Finally, *pad2* and *pad4*, phytoalexin-deficient mutants were not affected in terms of the  $\Delta hrpB$ -induced protection (Fig. S1). These data suggest that neither SA, JA nor ethylene play a major role in the plant protection induced by the  $\Delta hrpB$  strain.

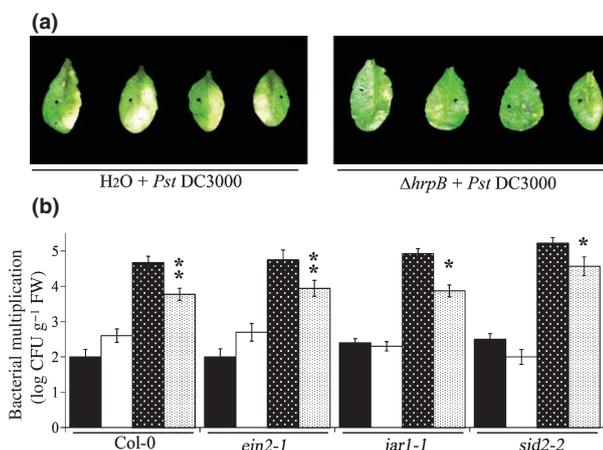
The same approach was used to show that these defense pathways were not involved in protection against *P. syringae*. Indeed, our data indicated that the phenotypical responses of protected mutants were similar to those of control Col-0 plants. Bacterial multiplication was estimated in the different mutants and confirmed this observation (Fig. 4b).

### Transcriptional reprogramming of $\Delta hrpB$ -protected plants

In order to gain some knowledge on the mechanisms governing  $\Delta hrpB$ -induced resistance, a transcriptome analysis was



**Fig. 3** Pre-inoculation of *Arabidopsis thaliana* plants with a  $\Delta hrpB$  strain of *Ralstonia solanacearum* limits multiplication of virulent bacteria *in planta*. Bacterial multiplication of  $\Delta hrpB$  or GMI1000 strain was determined at 0, 3, 8 or 10 days after inoculation as follows:  $\Delta hrpB$ , plants inoculated only with the  $\Delta hrpB$  strain;  $\Delta hrpB + GMI1000$ , plants pre-inoculated by the  $\Delta hrpB$  strain and then challenged with strain GMI1000 24 h later; GMI1000, plants inoculated only with the GMI1000 strain; H<sub>2</sub>O + GMI1000, plants treated first with water and then challenged with strain GMI1000 24 h later;  $\Delta hrpB + GMI1000$ , plants pre-inoculated by the  $\Delta hrpB$  strain and then challenged with strain GMI1000 24 h later. Bacterial concentrations used in this experiment were  $2 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> for the GMI1000 strain and  $5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> for the  $\Delta hrpB$  strain. Triplicate assays were performed on three plants for each time point. This experiment was repeated twice, and reproducible results were obtained. Error bars represent SE of the mean.



**Fig. 4** Pre-inoculation of *Arabidopsis thaliana* plants with  $\Delta hrpB$  protects plants against a foliar pathogen. (a) Phenotypic responses of *Arabidopsis* leaves treated with water (left panel) or inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain of *Ralstonia solanacearum* (right panel) and then leaf-infiltrated with a bacterial suspension of the *Pseudomonas syringae* DC3000 strain. Symptoms were scored at 3 d after infection. (b) *In planta* bacterial growth was measured at time 0 in plants pre-treated with water (black) or pre-inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain (white) and 3 d after inoculation in plants pre-inoculated with water (black with white dots) or with the  $\Delta hrpB$  strain (white with black dots). Mean bacterial densities are calculated from two independent experiments (four individual plants per experiment). Error bars represent SE of the mean. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; using a *t*-test.

performed. Plants were pre-inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain or treated with water. Twenty-four hours later, they were inoculated with the virulent GMI1000 strain. Plant samples were harvested 24 h after pre-treatment, before inoculation with the virulent strain (P24 for  $\Delta hrpB$ -inoculated plants, W24 for water-treated plants). Samples were also harvested 5 d after inoculation with the GMI1000 strain, at the appearance of the first wilting symptoms in unprotected plants (PD1 for protected plants, WD1 for wilting unprotected plants). Microarray data were generated using *A. thaliana* whole genome Affymetrix ATH1 chips. To confirm the reliability of the microarray results, 13 probe sets

**Table 1** Responses of various defense-related *Arabidopsis thaliana* mutants to *Ralstonia solanacearum* GMI1000, 10 d after inoculation by the  $\Delta hrpB$  strain

Arabidopsis lines	Affected pathways	Protection	References
<i>aba1-5</i>	ABA (biosynthesis)	Yes	Léon-Kloosterziel <i>et al.</i> (1996)
<i>aba2-1</i>	ABA (biosynthesis)	Yes	Léon-Kloosterziel <i>et al.</i> (1996)
<i>aba3</i>	ABA (biosynthesis)	Yes	Léon-Kloosterziel <i>et al.</i> (1996)
<i>abi1-1</i>	ABA (signalling pathway)	No	Koornneef <i>et al.</i> (1984)
<i>abi4-101</i>	ABA (signalling pathway)	Yes	Laby <i>et al.</i> (2000)
<i>ein2-1</i>	Ethylene	Yes	Guzman & Ecker (1990)
<i>jar1-1</i>	JA	Yes	Staswick <i>et al.</i> (1992)
<i>coi1</i>	JA	Yes	Feys <i>et al.</i> (1994)
<i>Pap1</i>	JA	Yes	Borevitz <i>et al.</i> (2000)
<i>cpr1</i>	SA (constitutive)	Yes	Bowling <i>et al.</i> (1994)
<i>sid2-2</i>	SA (biosynthesis)	Yes	Nawrath & Metraux (1999)
<i>pad2</i>	SA, camalexin biosynthesis	Yes	Glazebrook & Ausubel (1994)
<i>pad4</i>	SA, camalexin biosynthesis	Yes	Glazebrook <i>et al.</i> (1997)
<i>NahG</i>	SA (accumulation)	Yes	Lawton <i>et al.</i> (1995)
<i>npr1</i>	SA (response)	Yes	Cao <i>et al.</i> (1994)
<i>AtMyb96</i>	SA-ABA	Yes	Seo <i>et al.</i> (2009)
<i>ndr1</i>	R gene-mediated resistance	Yes	Century <i>et al.</i> (1995)

All the tested lines were in a Col-0 background except *abi1-1* for which the appropriate control (Ler-0) was used. In the 'Protection' column, 'Yes' means that plants were as protected as wild type plants; 'No' means that plants developed some wilt symptoms.

were selected to confirm expression differences with quantitative real time PCR (qRT-PCR). Selection of these probe sets was based on their statistically significant up- or down-regulated expression. The ratios from microarray and qRT-PCR were well correlated ( $R^2 = 0.7541$ ) and could be described by the linear regression equation  $y = 0.6907x - 0.8496$ , indicating good

consistency between the two methods (Fig. S2). The Classification Superviewer tool ([http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_classification\\_superviewer.cgi](http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi)) (Provart & Zhu, 2003) was used to define enriched functional classes in our analyses.

First we investigated transcriptional reprogramming associated to pre-inoculation with  $\Delta hrpB$  strain after 24 h (P24/W24). Down- and up-regulated genes are listed in Tables S1 and S3, respectively. Among the 152 genes down-regulated in plants pre-inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain, a high enrichment of cell wall- and extracellular-related genes was observed. Cell-wall related genes were previously described as playing a role in the elaboration of the plant response to *R. solanacearum*. Indeed, *Arabidopsis irx/cesa* mutants impaired in cellulose synthase genes show an enhanced level of resistance to *R. solanacearum* and transcriptomic analysis of these mutants supported a direct role for

ABA in resistance to *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Interestingly,  $\Delta hrpB$ -dependent gene expression changes affect 336 genes that are up-regulated and enriched in abiotic or biotic stimuli response genes and 91 of these genes (27%) were previously identified as being involved in ABA biosynthesis and signalling (Li *et al.*, 2006) (Table S2a). A selection of marker genes involved in ABA biosynthesis, signalling and ABA-related transcription factors are listed in Table 2. Taken together, our data indicate that root inoculation with the  $\Delta hrpB$  strain leads to the activation of ABA-related pathways.

We then focused on the transcriptional reprogramming triggered by a subsequent infection with the virulent *R. solanacearum* GMI1000 strain (PD1/WD1). In  $\Delta hrpB$  pre-treated plants, 194 and 991 genes were up- and down-regulated, respectively, in comparison to unprotected plants developing wilt disease

**Table 2** Expression levels of selected transcripts up-regulated in protected *Arabidopsis thaliana* plants after 24 h classified according to functional groups

AGI	Gene description	Fold change	
		P24/W24	PD1/WD1
<b>Secondary metabolism</b>			
At5g38130	Transferase family protein similar to transferase family protein	2.43*	1.05
At2g37040	Phe ammonia lyase 1 (pal1); phenylalanine ammonia-lyase	1.74*	- 2.21*
At3g10340	Phenylalanine ammonia-lyase 4 (PAL4); ammonia ligase/ammonia-lyase/catalytic	1.82*	- 4.25*
At3g53260	Phenylalanine ammonia-lyase (PAL2)	2.19*	- 1.67*
At4g37980	ELICITOR-ACTIVATED GENE 3-1 (ELI3-1); binding/catalytic/oxidoreductase/zinc ion binding	1.79*	- 1.01
At3g21230	4-coumarate : CoA ligase 5 (4CL5); 4-coumarate-CoA ligase	2.47*	- 1.77*
<b>ABA</b>			
At3g14440	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3 (NCED3); 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	3.12*	- 3.83*
At4g19170	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4 (NCED4)	2.04*	1.25
At4g26080	ABA INSENSITIVE 1 (ABI1); calcium ion binding/protein serine/threonine phosphatase	1.76*	- 1.63*
At4g34000	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3 (ABF3)	2.47*	- 1.07
At5g57050	ABA INSENSITIVE 2 (ABI2); protein serine/threonine phosphatase	2.03*	- 2.00*
At5g59220	Protein phosphatase 2C. putative/PP2C. Putative similar to protein phosphatase 2C	4.03*	- 5.28*
<b>Abiotic stress</b>			
At1g59860	Heat shock protein. putative similar to heat shock protein GI:19617 from	2.49*	1.35
At1g74310	ATHSP101	1.83*	1.12
At2g20560	DNAJ heat shock family protein similar to DNAJ heat shock family protein	2.16*	- 1.92*
At3g07770	ATP binding similar to CR88 (EMBRYO DEFECTIVE 1956). ATP binding	1.78*	- 1.10
At3g09440	Heat-shock protein (At-hsc70-3) identical to (At-hsc70-3) (cytosolic Hsp70)	2.17*	- 1.84*
At3g12580	Heat shock protein 70 (HSP70); ATP binding	5.19*	- 1.91*
At3g14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein similar to heat shock protein binding	1.93*	- 1.57*
At5g09590	MITOCHONDRIAL HSP70 2 (MTHSC70-2); ATP binding	2.29*	- 1.19
At5g51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) similar to ATHSP23.6-MITO	2.27*	- 1.80*
At5g52640	Heat shock protein 90.1 (ATHSP90.1); ATP binding	2.94*	- 1.50
At5g56030	Heat shock protein 81-2 (HSP81-2); ATP binding	1.75*	- 1.44*
At1g13930	Similar to nodulin-related	1.75*	- 1.14
At3g56080	Dehydration-responsive protein-related similar to dehydration-responsive family protein	2.23*	1.20
At4g23680	Major latex protein-related/MLP-related similar to major latex protein-related	2.18*	1.12
At5g66400	RESPONSIVE TO ABA 18 (RAB18)	2.35*	- 6.71*
<b>ERFs</b>			
At2g22200	AP2 domain-containing transcription factor encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2 transcription factor family	1.78*	1.48
At4g25480	DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A (DREB1A); DNA binding	3.68*	- 1.63*
At4g28140	AP2 domain-containing transcription factor. putative encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF	2.28*	- 2.30*
At5g05410	DREB2A; DNA binding/transcription activator/transcription factor	2.36*	- 4.14*
At5g11590	TINY2 (TINY2); DNA binding/transcription factor	1.94*	1.21
At5g67180	AP2 domain-containing transcription factor. putative	1.90*	1.06

Columns on the right side of the table indicate the fold changes for plants inoculated with the  $\Delta hrpB$  strain after 24 h (P24/W24) and challenged afterwards with the GMI1000 virulent *Ralstonia solanacearum* strain (PD1/WD1). Positive values represent up-regulation, negative values represent down-regulation, and asterisks denote  $FDR < 0.01$ . The complete list of genes up-regulated in protected plants after 24 h ( $SLR > 0.08$  and  $FDR < 0.01$ ) is included in Supporting Information Table S1.



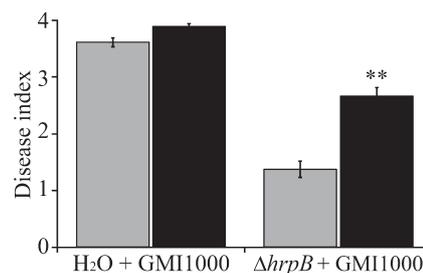
**Fig. 5** Number of differentially transcribed genes in *Ralstonia solanacearum*  $\Delta hrpB$ -protected *Arabidopsis thaliana* plants vs water-treated plants. The number of deregulated genes for the PD1/WD1 and P24/W24 stages (see the Results section for details) are presented on the x-axis and y-axis, respectively. Overlapping genes between PD1/WD1 and P24/W24 are shown in hierarchical clustering. Down-regulated and up-regulated genes are represented in green and in red, respectively. Hierarchical clustering (average linkage) was performed with Gene Cluster/Treeview (Eisen *et al.*, 1998) on data presented in Supporting Information Tables S1, S3, S4 and S5.

(Tables S4, S5). Both sets of genes were enriched in abiotic and biotic stimuli responsive genes. Apart from the induction of two thionin genes that encode peptides with strong antimicrobial properties (Loeza-Angeles *et al.*, 2008), very few up-regulated genes are associated to defense responses, thereby supporting the hypothesis that protection does not involve classical defense pathways. Interestingly, among down regulated genes, a large proportion of genes were previously described as being up-regulated during wilt disease development (Hu *et al.*, 2008). Furthermore, this set of down-regulated genes comprises 25% of the genes (86 genes) that were up-regulated in  $\Delta hrpB$ -pretreated plants (P24/W24), as shown in Fig. 5. Taken together, our data indicate that  $\Delta hrpB$  pretreatment positively regulates in symptomless plants a set of genes that are normally induced at later stage during disease development.

Analysis of the 1 kb promoter regions of the co-regulated genes using the Promoter program (Toufighi *et al.*, 2005) revealed that > 26% of the 991 down-regulated genes in protected plants (PD1/WD1) and > 35% of the 336 genes up-regulated 24 h after  $\Delta hrpB$  strain inoculation (P24/W24) contained one or more ABRE (ABA responsive element)-related response element(s), (ACGTG(G-T)C; TACGTGTC; YACGTGGC). Another DRE/CRT response element (Dehydration Responsive Element/C repeat, (A-G)CCGAC) (Tuteja, 2007) was also identified in 26% of the 991 and 24.7% of the 336 promoters. About 10% of these 336 and 991 promoters contained both ABRE and DRE elements. The significant over-representation of these motifs was confirmed using POBO (Kankainen & Holm, 2004).

### The *ABI1* gene is required for full $\Delta hrpB$ -mediated protection

To estimate the importance of ABA in the establishment of  $\Delta hrpB$ -mediated protection, five knock-out lines in ABA



**Fig. 6** The *ABI1* gene is required for  $\Delta hrpB$ -associated protection. Symptom development of Ler-0 (grey) and *abi1-1* (black) *Arabidopsis thaliana* plants 9 d after *Ralstonia solanacearum* GMI1000 inoculation. Plants were first inoculated with water or with the  $\Delta hrpB$  strain and 24 h later, were then challenged with the virulent GMI1000 strain. Mean disease indexes are calculated from three independent experiments (minimum 30 plants per condition and per experiment). Error bars represent SE of the mean. \*\*,  $P < 1.0 \times 10^{-8}$ ; using a *t*-test.

biosynthesis and signalling related genes were tested. Upon challenge with the virulent strain, the level of protection of *aba1-5*, *aba2-1*, *aba3* and *abi4-101* mutants was comparable to that of wild type plants. Interestingly, *abi1-1* mutant developed however significantly more disease symptoms than, wild type, Ler-0 pre-inoculated plants (Fig. 6), even if Ler-0 and *abi1-1* mutant plant displayed heterogeneous responses to the virulent GMI1000 strain, with some plants wilted completely and rapidly (within a day) while others were fully resistant to the pathogen. This result suggests that *ABI1-1* plays a key role in  $\Delta hrpB$ -induced protection.

### Discussion

Bacterial wilt caused by *R. solanacearum* is a serious disease of many valuable plant species in tropical and subtropical areas. Strategies for controlling this disease are limited and biological control of bacterial wilt using *hrp* mutant strains of the pathogen constitutes an alternative that has been developed for a decade, particularly in tomato. The molecular mechanisms underlying this resistance are completely unknown although several hypotheses have been proposed. In this study, we demonstrate that *Arabidopsis* plants can be protected by an initial root-inoculation with a  $\Delta hrpB$  strain against a subsequent challenge by a virulent strain of the pathogen and that ABA-related signalling pathways intervene in this process.

Various treatments including root-inoculation of *Arabidopsis* plants with *E. coli*, heat-killed GMI1000 and  $\Delta hrpB$  bacteria induced different levels of protection against the virulent *R. solanacearum* strain. Heat-killed virulent GMI1000 bacteria induced a higher level of protection than *E. coli*. This observation may be explained by the important role played by surface components of the pathogen in the recognition and induction of disease resistance. LPS is a cell surface component involved in the interaction with eukaryotic organisms (Newman *et al.*, 2000) and may therefore elicit plant defense responses (Leach *et al.*, 1983; Barton-Willis *et al.*, 1984; Leeman *et al.*, 1995; Milling *et al.*, 2010). When injected into tobacco leaves, a purified LPS fraction extracted from *R. solanacearum* was shown to strongly induce

disease resistance (Graham *et al.*, 1977). Apart from LPS, proteinaceous compounds may be involved in this protective effect since boiled extracts from *R. solanacearum* possess also a strong elicitor activity attributable to one or more proteins (Pfund *et al.*, 2004). However, heat-killed bacteria protect plants from a subsequent challenge with the virulent pathogen to a lesser extent than living bacteria, which supports the hypothesis of an active participation from both the host and the pathogen.

Two major reasons may explain the increased resistance observed after pre-inoculation with a *hrp*<sup>-</sup> strain: the resistance response displayed by the protected plant may arise from a direct competition for vascular colonization between the protective and virulent strain. It was previously shown that mutant and pathogenic strains compete to invade xylem vessels in tomato (Etchebar *et al.*, 1998). Our data suggest that physical competition plays a minor role in protection. Indeed, simultaneous co-inoculation of a 10-fold excess of the  $\Delta hrpB$  strain with the virulent strain does not lead to an increased resistance of the plants, which should be the case if the protecting bacteria hindered the colonization of a particular niche by the virulent strain. Alternatively, it may be caused by the induction of defense responses of the host plant. Induced resistance has been cited as a possible mechanism of biocontrol involving spontaneous nonpathogenic mutants of *R. solanacearum* (Kempe & Sequeira, 1983). A major role of the SA- or ethylene/JA acid-associated signalling pathways in the establishment of the *hrp*<sup>-</sup>-induced resistance can probably be ruled out: abrogation of these pathways had no effect on this resistance and few genes related to SA, JA and ethylene showed a differential expression in protected plants. Therefore, protection by the  $\Delta hrpB$  mutant is probably related neither to systemic acquired resistance, a SA-dependent response to a localized infection nor to the JA/ethylene-dependent ISR (Shoresh *et al.*, 2010). This protection affects also the multiplication of the bacterial pathogen *P. syringae*, which suggests that activated protective mechanisms are efficient both against foliar and root pathogens.

A transcriptome analysis was performed to decipher the mechanisms underlying protection by the  $\Delta hrpB$  strain. Two time points were analysed, a first one, 24 h after pre-treatment with  $\Delta hrpB$  strain or water (P24/W24) and a second one following a subsequent inoculation with the virulent strain (PD1/WD1). Already 24 h after pre-treatment with the  $\Delta hrpB$  strain, expression of almost 500 plant genes is modified, including many up-regulated genes that were previously shown to be induced by a virulent strain in wilting plants (Hu *et al.*, 2008). In  $\Delta hrpB$  protected plants subsequently inoculated with a virulent strain (PD1/WD1), 25% of these up-regulated genes become down regulated. Our data indicate that, in healthy plants, pre-treatment with  $\Delta hrpB$  strain brings forward a transcriptional reprogramming of genes normally induced later during wilt disease development (Fig. 5).

In healthy protected plants,  $\Delta hrpB$ -dependent gene expression changes mainly concern biotic and abiotic-stress related genes. Interestingly, strong induction of two thionin genes may partly explain the observed resistance. Thionins are small basic, cysteine-rich peptides that display a broad *in vitro* antifungal and

antibacterial activity resulting from permeabilization of cell membranes (Carrasco *et al.*, 1981; Molina *et al.*, 1993). Indeed, tomato transgenic plants expressing the Arabidopsis *THI2.1*, a gene strongly activated in protected plants challenged by the virulent strain, exhibit enhanced resistance to *R. solanacearum* (Chan *et al.*, 2005).

Additionally, this study uncovers the involvement of genes associated to biosynthesis and signalling of ABA after a  $\Delta hrpB$  pre-treatment (Tables 2, S2). To evaluate the importance of this hormone in  $\Delta hrpB$ -induced protection, mutants affected in genes related to ABA biosynthesis and signalling were tested. Among all of them (Table 1), ABA insensitive *abi1-1* plants developed significantly more disease symptoms than wild type plants. ABA responsive genes that are still ABA regulated in *abi1-1* mutant (Hoth *et al.*, 2002) might explain the partial loss of protection of the *abi1.1* mutant. Additionally, this partial loss of protection suggests that  $\Delta hrpB$ -induced resistance probably requires the activation of a whole set of genes and that inactivation of a single gene is not sufficient to prevent protection. Identification of ABRE- and DRE-related ABA response elements, depicted in abiotic stress responses (Tuteja, 2007), within many co-regulated gene promoters 24 h after protection suggests a regulation of gene expression through DREB or ABF transcription factors in the establishment of protection. DREB1A (At4g25480) and DREB2A (At5g05410) that are up-regulated 24 h after inoculation with the  $\Delta hrpB$  strain, are therefore potentially involved in ABA signalling during protection. This result highlights the importance of ABA signalling in the biocontrol of *R. solanacearum*. A previous study already showed the direct involvement of ABA signalling in resistance to *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007) thereby demonstrating that ABA plays a key role in the establishment of the plant response to this pathogen.

In plant–pathogen interactions, a complex role for ABA is emerging. In many cases, ABA involves cross-talks with SA- or ethylene/JA-associated signalling pathways (Mauch-Mani & Mauch, 2005; Melotto *et al.*, 2006; de Torres-Zabala *et al.*, 2007; Asselbergh *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011). Our transcriptomic and genetic data reveal that biological control of bacterial wilt is not associated with SA and JA-signalling pathways. Two main hypotheses may explain the activation of ABA-/abiotic stress-associated gene expression in protected plants. Inoculation of the  $\Delta hrpB$  strain may provoke a reduction of water transport in xylem vessels leading to a hydric stress and to the subsequent activation of ABA-related signalling. Alternatively, some *hrp*-dependent genes may play a role in the activation of the ABA-related signalling, for example by disrupting the complex interplay between hormone-mediated signalling events occurring during plant response to the pathogen. Indeed, in addition to *hrpB*, a regulatory switch that controls multiple virulence pathways including Type III secretion effectors (Occhialini *et al.*, 2005), *R. solanacearum* possesses another master pathogenicity component, HrpG. This regulator controls major steps during the interaction with plant cells by regulating genes involved in secondary metabolic pathways, detoxification of various antimicrobial compounds as well as genes directing the biosynthesis

of phytohormones and many genes of yet unknown function (Genin, 2010). Future studies will be aimed at the identification of bacterial genes potentially involved in the induction of biological control.

In conclusion, the present study demonstrates an active participation of the host plant through the activation of an ABA-dependent defense system independent of SA, JA and ethylene in the biological control exerted by the  $\Delta hrpB$  mutant of *R. solanacearum*. The molecular mechanisms underlying this form of resistance are still hypothetical: it is conceivable that dehydration stress caused by root-inoculated  $\Delta hrpB$  bacteria and/or some yet unknown bacterial determinants triggers a stress leading to the activation of signalling components common to both biotic and abiotic stress. Some of these components, including ABA-related genes, would generate directly or indirectly a hostile environment for bacteria as previously shown for the *irx* mutants. Alternatively, this environment may prime resistance: expression of *Thi2.1*, a peptide whose overexpression renders tomato plants resistant to *R. solanacearum*, was indeed significantly activated in protected plants challenged by the virulent bacteria. Presumably, the combinatory effect of these different mechanisms constitutes the basis of the  $\Delta hrpB$ -mediated protection. Whether these mechanisms are also efficient against other vascular pathogens remains an open question that we would like to address in future studies. In any case, their deciphering is a prerequisite for rational development of efficient biological control for agriculture.

## Acknowledgements

Quantitative RT-PCR experiments were carried out at the Toulouse Genopole 'PLAGE' platform. The authors thank Pariente J-L., Icher C. and Bosc S. for the plant production. J.H. was supported by the National Science Foundation of China (Grants 31071675 and 30671179). This work was supported by a PhD fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research CNRS (C.T.) and by a PhD fellowship from the Agence Nationale de la Recherche, Grant PCS-08-GENO-SCRIPS (M.H.). This work is part of the Laboratoire d'Excellence (LABEX) entitled TULIP (ANR-10-LABX-41).

## References

- Alfano JR, Collmer A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *Journal of Bacteriology* 179: 5655–5662.
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Höfte M. 2008. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 709–719.
- Barton-Willis PA, Wang MC, Holliday MR, Long MR, Keen NT. 1984. Purification and composition of lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Physiological Plant Pathology* 25: 387–398.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A* 57: 289–300.
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12: 2383–2394.
- Boucher CA, van Gijsegem F, Barberis PA, Arlat M, Zischek C. 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology* 169: 5626–5632.
- Bowling SA, Guo A, Cao H, Gordon AS, Klessig DF, Dong X. 1994. A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 6: 1845–1857.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X. 1994. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 6: 1583–1592.
- Cao FJ, Yoshioka K, Desveaux D. 2011. The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* 124: 489–499.
- Carrasco L, Vazquez D, Hernandez-Lucas P, Carbonero C, Garcia-Olmedo F. 1981. Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *European Journal of Biochemistry* 116: 185–189.
- Century KS, Holub EB, Staskawicz BJ. 1995. *NDRI*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 92: 6597–6601.
- Chan YL, Prasad V, Sanjaya, Chen KH, Liu PC, Chan MT, Cheng CP. 2005. Transgenic tomato plants expressing an *Arabidopsis thionin* (*Thi2.1*) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. *Planta* 221: 386–393.
- Cunnac S, Boucher C, Genin S. 2004. Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 186: 2309–2318.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounloham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 100: 8024–8029.
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 99: 2404–2209.
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y. 1998. Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11: 659–667.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 95: 14863–14868.
- Etchebar C, Trigalet-Demery D, van Gijsegem F, Vasse J, Trigalet A. 1998. Xylem colonization by an *HrpB* mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11: 869–877.
- Fan J, Hill L, Crooks C, Poerner P, Lamb C. 2009. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* 150: 1750–1761.
- Feys BF, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The Plant Cell* 6: 751–759.
- Frey P, Prior P, Marie C, Kotoujansky A, Trigalet-Demery D, Trigalet A. 1994. Hrp<sup>-</sup> mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3175–3181.
- Frey P, Trigalet-Demery D, Trigalet A. 1993. *hrp* mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of tomato bacterial wilt. In: Hartman GL, Hayward AC, eds. *Bacterial Wilt*. Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan. Canberra, ACT, Australia: ACIAR, 257–260.
- Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187: 920–928.
- Genin S, Gough CL, Zischek C, Boucher CA. 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology* 6: 3065–3076.

- Glazebrook J, Ausubel FM. 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 91: 8955–8959.
- Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R, Ausubel FM. 1997. Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146: 381–392.
- Godiard L, Raguet F, Froissard D, Legay JJ, Grosset J, Chartier Y, Meyer Y, Marco Y. 1990. Analysis of the synthesis of several pathogenesis-related proteins in tobacco leaves infiltrated with water and with compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 3: 207–213.
- Graham TL, Sequeira L, Huang TS. 1977. Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 424–432.
- Guzman P, Ecker JR. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* 2: 513–523.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65–87.
- Hernandez-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sanchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo MC, Keller K, Barlet X, Sanchez-Rodriguez C *et al.* 2007. Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell* 19: 890–903.
- Hirsch J, Deslandes L, Feng DX, Balagué C, Marco Y. 2002. Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 92: 1142–1148.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* 115: 4891–900.
- Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 3: e2589.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264.
- Jakobek JL, Smith JA, Lindgren PB. 1993. Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 5: 57–63.
- Kempe J, Sequeira L. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease* 67: 499–503.
- Knoester M, Pieterse CM, Bol JF, Van Loon LC. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signalling at the site of application. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12: 720–7.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377–383.
- Laby R, Kincaid M, Kim D, Gibson S. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* 23: 587–596.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 863–870.
- Leach JE, Sherwood J, Fulton RW, Sequeira L. 1983. Comparison of soluble proteins associated with disease resistance induced by bacterial lipopolysaccharide and viral necrosis. *Physiological Plant Pathology* 23: 377–385.
- Leeman M, Vanpelt JA, Denouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B. 1995. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85: 1021–1027.
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaert JA, Koornneef M. 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant Journal* 10: 655–661.
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW. 2006. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Research* 16: 414–427.
- Loeza-Angeles H, Sagrero-Cisneros E, Lara-Zárate L, Villagómez-Gómez E, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. 2008. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnology Letters* 30: 1713–1719.
- Mauch-Mani B, Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 409–414.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.
- Milling A, Babujee L, Allen C. 2010. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistance tomato plants. *PLoS ONE* 6: e15853.
- Molina A, Ahl-Goy P, Fraile A, Sanchez-Monge R, Garcia-Olmedo F. 1993. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Science* 92: 169–177.
- Nawrath C, Metraux JP. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell* 11: 1393–1404.
- Newman M-A, von Roepenack E, Daniels M, Dow M. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* 1: 25–31.
- Ochialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 938–49.
- Pfund C, Tans-Kersten J, Dunning FM, Alonso JM, Ecker JR, Allen C, Bent A. 2004. Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17: 696–706.
- Provart N, Zhu T. 2003. A browser-based functional classification SuperViewer for *Arabidopsis* genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* 2003: 271–272.
- Raffaele S, Rivas S, Roby D. 2006. An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 580: 3498–3504.
- Rathmell W, Sequeira L. 1975. Induced resistance in tobacco leaves: the role of inhibitors of bacterial growth in the intercellular fluid. *Physiological Plant Pathology* 5: 65–73.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809–1819.
- Seo PJ, Xiang F, Qiao M, Park JY, Lee YN, Kim SG, Lee YH, Park WJ, Park CM. 2009. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signalling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 275–289.
- Sequeira L, Hill L. 1974. Induced resistance in tobacco leaves: the growth of *Pseudomonas solanacearum* in protected tissues. *Physiological Plant Pathology* 4: 447–455.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21–43.
- Smith J, Offord L, Kibata G, Murimi Z, Trigalet A, Saddler G. 1998. The development of a biological control agent against *Ralstonia solanacearum* race 3 in Kenya. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J, eds. *Bacterial wilt disease*. Berlin & Heidelberg, Germany: Springer/INRA, 337–342.
- Smyth GK. 2004. Linear models and empirical Bayes for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3: 1–26.
- Smyth GK. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, eds. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. New York, NY, USA: Springer, 397–420.

- Staswick PE, Su W, Howell SH. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 6837–40.
- Tanaka H. 1983. Protection of tobacco and tomato against root infection of *Pseudomonas solanacearum* by heat-killed bacterial cells. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 49: 66–68.
- Tanaka H. 1985. Induced resistance in tobacco against bacterial wilt and its possible mechanisms. *Bulletin of the Utsuhomiya Tobacco Experimental Station* 21: 1–66.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N. 1996a. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9: 826–836.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anaïs G, Mangin B, Bazin B, Nazer R, Grimsley N. 1996b. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9: 837–842.
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bögre L, Grant M. 2007. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* 26: 1434–1443.
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart N. 2005. The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant Journal* 43: 153–163.
- Trigalet A, Frey P, Trigalet-Demery D. 1994. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: state of the art and understanding. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 225–233.
- Trigalet A, Trigalet-Demery D. 1990. Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 27–38.
- Tuteja N. 2007. Abscisic acid and abiotic stress signalling. *Plant Signalling and Behaviour* 2: 135–138.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453–485.
- Vlot AC, Klessig DF, Park SW. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11: 436–442.
- van Wees SC, de Swart EA, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CM. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 8711–8716.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Responses of various defense-related *Arabidopsis thaliana* mutants to the GMI1000 strain, 10 d after inoculation by the  $\Delta hrpB$  strain.

**Fig. S2** Scatter diagram of gene expression ratios in control and  $\Delta hrpB$ -pre-inoculated plants calculated from qRT-PCR and microarray data.

**Table S1** List of plant genes up-regulated after inoculation by the  $\Delta hrpB$  strain for 24 h and challenged by the GMI1000 strain vs control plants treated with water and inoculated by the GMI1000 strain

**Table S2** List of plant genes up-regulated 24 h after inoculation with  $\Delta hrpB$  either involved in: (a) Biosynthesis and signalling of ABA (Li *et al.*, 2006) or (b) Genes up-regulated in the *irx* mutants (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007)

**Table S3** List of plant genes down-regulated in plants inoculated by the  $\Delta hrpB$  strain for 24 h vs control plants treated with water and inoculated by the GMI1000 strain

**Table S4** List of plant genes up-regulated after inoculation by the  $\Delta hrpB$  strain for 24 h and then challenged by the GMI1000 strain vs control plants treated with water and inoculated by the GMI1000 strain

**Table S5** List of plant genes down-regulated in plants inoculated by the  $\Delta hrpB$  strain for 24 h and then challenged by the GMI1000 strain vs control plants treated with water and inoculated by the GMI1000 strain

**Table S6** List of primer combinations (Forward and Reverse) used for gene expression validation by qRT-PCR

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

# Discussion

---

---

## DISCUSSION GENERALE

### **Introduction**

Les moyens de lutte contre la maladie du flétrissement causée par *R. solanacearum* étant très limités, l'étude des mécanismes de résistance et de sensibilité d'*A. thaliana* en réponse à cette bactérie est cruciale pour élaborer de nouvelles stratégies de lutte. Dans ce contexte, trois grands types d'approches sont développées dans l'équipe.

- L'étude de la résistance spécifique médiée par le couple RRS1-R/popP2 ainsi que la caractérisation des cibles végétales de popP2, permettent de mieux comprendre d'une part les mécanismes de perception de l'agent pathogène par la plante et d'autre part, la façon dont *R. solanacearum* manipule certaines fonctions biologiques de l'hôte pour l'infecter. Cette étude a permis entre autre, de montrer que PopP2 possède une fonction d'acétyltransférase et que certaines des cibles qu'elle modifie sont des composantes importantes des voies de défense (Bernoux *et al.*, 2008 ; Tasset *et al.*, 2010).

- Une autre approche développée, a consisté à montrer que la lutte biologique bien décrite chez la tomate, pouvait être transposée chez *A. thaliana*, donnant ainsi accès à toutes les ressources disponibles chez cette plante modèle. Cette étude a permis de montrer l'existence d'un mécanisme original de protection faisant intervenir l'ABA, et différent donc, des résistances systémiques bien décrites telles que la SAR ou l'ISR, dépendantes respectivement du SA et du JA/ET. Une meilleure compréhension de ce mécanisme pourrait à terme permettre le développement de nouvelles stratégies de lutte contre le flétrissement causée par *R. solanacearum*.

- La recherche de mutants d'*A. thaliana* incapables de développer des symptômes de maladie en réponse à une souche virulente de *R. solanacearum* a plusieurs objectifs :

- L'identification de mutants affectés dans des voies de défense classique (SA, JA, ET) et qui de ce fait, présente une résistance accrue à l'agent pathogène. Dans le contexte de nos travaux, nous ne nous sommes pas intéressés à cette classe de mutants très étudiés par ailleurs.
- L'identification de cibles d'effecteurs de l'agent pathogène.
- L'identification de composantes requises pour le développement des symptômes de maladie, ce qui inclue d'une part des composantes végétales indispensables à la « fitness » (au sens large) de l'agent pathogène, mais aussi des gènes dont la

dérégulation va créer un environnement défavorable au microorganisme envahissant. La caractérisation du rôle de tels gènes ou de l'effet de leur mutation, constituent des outils importants pour améliorer la compréhension du processus infectieux de *R. solanacearum*.

Dans le contexte de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé aux mécanismes de protection ainsi qu'aux mécanismes de sensibilité à *R. solanacearum*. Ces deux aspects sont discutés ci-dessous.

## **PARTIE I : CONTROLE BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DU FLÉTRISSEMENT BACTERIEN**

Cette approche, qui consiste à utiliser une souche non-pathogène de *R. solanacearum* pour contrôler l'infection ultérieure de la plante hôte par une souche virulente, constitue une méthode de la lutte biologique potentiellement efficace contre cet agent pathogène. Au cours de nos travaux, nous avons développé un nouveau modèle d'étude des mécanismes sous-tendant le contrôle biologique du flétrissement bactérien en utilisant *A. thaliana* en tant que plante hôte.

Nos résultats suggèrent que la compétition spatiale entre les deux souches bactériennes utilisées dans cette étude ne joue pas un rôle majeur dans les mécanismes de protection.

D'autre part, ces travaux fournissent des informations nouvelles sur cette protection qui fait intervenir des mécanismes indépendants des voies de signalisation classiques du SA ou du JA/ET. En combinant des approches génétiques et transcriptomiques, nous avons mis en évidence le rôle primordial de l'ABA dans ce processus. Des données de plus en plus nombreuses mettent en lumière le rôle complexe de cette hormone dans les interactions plantes-microorganismes pathogènes notamment dans la maladie du flétrissement bactérien causée par *R. solanacearum*. En effet, les voies de signalisation de l'ABA sont activées dans certains mutants d'*A. thaliana*, tels les mutants *irx* qui présentent une résistance accrue à *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Par ailleurs, certains mutants affectés dans les voies de signalisation de l'ABA présentent une sensibilité accrue à *R. solanacearum* (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). L'ABA est une hormone bien connue pour son rôle dans la régulation de nombreux stress abiotiques comme la réponse aux stress hydriques. Les symptômes de flétrissement sont similaires à ceux observés lors d'une déshydratation et les voies de signalisation de cette hormone pourraient donc être impliquées dans les défenses mises en place contre la bactérie.

Quelles sont les étapes des voies de signalisation de l'ABA qui jouent un rôle clé et comment interviennent-elles dans cette interaction restent des questions ouvertes. L'utilisation de mutants d'*A. thaliana* affectés dans la biosynthèse, la perception et la signalisation ainsi que la mesure du niveau d'expression de gènes impliqués dans ces différentes étapes pourrait fournir des données intéressantes. Le rôle de cette hormone est probablement très complexe car de nombreux mutants testés ne présentent pas de phénotype particulier en réponse à *R. solanacearum*. Le dosage de l'ABA dans des plantes protégées ainsi que l'étude de l'impact

de certains inhibiteurs chimiques de la synthèse d'ABA (fluoridone) sur la protection, pourraient également être réalisée.

Il est également essentiel de vérifier que les résultats obtenus chez *A. thaliana* s'appliquent aussi à des plantes d'intérêt agronomiques telles que la tomate ou la pomme de terre en reproduisant certaines des expériences mentionnées ci-dessus (dosage de l'ABA, utilisation de mutants si ceux-ci sont disponibles, mesure de l'expression de gènes marqueurs des voies de l'ABA...). Nous avons montré que cette protection s'applique à *P. syringae*, et il sera également intéressant de tester si elle est efficace vis-à-vis d'autres agents pathogènes.

Il convient toutefois de noter que, dans cette étude, les analyses de transcriptomes ont été réalisées sur des feuilles alors que *R. solanacearum* est un agent pathogène qui pénètre dans les plantes par les racines. Les résultats obtenus au cours de l'étude de la résistance accrue du mutant *clv1* ont montré que l'expression génique dans les tissus foliaires et racinaires est assez différente au cours de l'infection. D'autres analyses transcriptomiques réalisées sur des racines permettraient donc de comparer les variations du transcriptome entre ces deux tissus. De plus, ce type d'étude présenterait un intérêt particulier puisque très peu de données sont disponibles sur les réactions de défense dans les racines.

## **PARTIE II : RESISTANCE ACCRUE DES MUTANTS *clv1* A *R. SOLANACEARUM***

### **1. Les LRR-RLKs à la croisée du développement et des réponses d'adaptation aux stress**

Pour leur survie, les plantes dépendent de la coordination appropriée entre les programmes de développement et les réponses aux changements de l'environnement. Elles doivent être capables de percevoir des signaux internes et externes puis d'intégrer ces données vers une réponse adéquate. Par exemple, des plantes subissant divers stress tels que la sécheresse, le manque de nutriments ou le froid, sont capables d'induire une floraison précoce (Wada & Takeno, 2010 ; Yaish *et al.*, 2011).

Les LRR-RLKs sont des récepteurs capables de percevoir un signal et de déclencher des voies de signalisation associées à des processus aussi variés que le développement, la réponse aux phytohormones et les réponses de défense aux agents pathogènes. Leur fonction demeure d'une façon générale peu connue. Cependant, certains LRR-RLKs sont très étudiés car ils constituent des composantes liant les processus développementaux et les réponses aux stress biotiques. C'est le cas des LRR-RLKs BAK1 et ERECTA (ER).

En ce qui concerne ER, cette protéine joue un rôle important dans de nombreux processus développementaux tels que la différenciation cellulaire et le développement d'organes, la signalisation associée à l'auxine et aux gibbérellines, et les réponses de défense envers différents agents pathogènes (van Zanten *et al.*, 2009).

BAK1 est un autre exemple de LRR-RLK multifonctionnel. Cette protéine est capable de s'associer avec de nombreux autres LRR-RLK impliqués notamment dans la résistance basale (Chinchilla *et al.*, 2007) et la perception des brassinostéroïdes (Li *et al.*, 2002). Ce récepteur est par ailleurs impliqué dans la photomorphogenèse et limite la propagation de la mort cellulaire suite à la perception d'un agent pathogène (Kemmerling *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2007).

Mon travail de thèse démontre que CLV1 constitue un nouvel exemple de LRR-RLK possédant des fonctions diverses et établissant un lien entre développement et stress biotiques. J'ai initié la caractérisation du rôle de cette protéine dans le cadre d'une interaction compatible entre *A. thaliana* et la bactérie *R. solanacearum*. Au cours de cette caractérisation, j'ai mis en évidence que CLV1 régule de nombreux facteurs de transcription dont le niveau d'expression est contrôlé par des microARNs. Mes travaux soulèvent de nombreuses

questions sur les mécanismes mis en jeu. Différentes approches pourraient permettre d'avancer dans leur compréhension.

## **2. La résistance accrue des mutants *clv1* est-elle dépendante de composantes des voies de signalisation CLAVATA ?**

Diverses observations suggèrent effectivement que la voie de signalisation CLAVATA classiquement étudiées au niveau du méristème caulinaire ne sont pas impliquées dans la résistance des plantes *clv1* à la bactérie : a) La réponse à *R. solanacearum* d'allèles faibles ou forts de *clv1* est comparable. Cette observation suggère que la fonction de cette protéine dans la sensibilité peut probablement être dissociée de celle qu'elle joue au niveau du méristème caulinaire. b) Cette hypothèse est renforcée par les expériences montrant que des plantes *clv1* exprimant CLV1 sous la dépendance du promoteur *SUC2* dans le phloème ont une sensibilité comparable à celle de plantes sauvages. c) Par ailleurs, à l'exception des 2 autres récepteurs CLV2 et CRN, aucune autre composante de la voie CLAVATA connue ne semble impliquée dans la réponse à la bactérie. L'ensemble de ces données suggère que la résistance accrue des plantes *clv1* fait intervenir une autre voie de signalisation que celle décrite dans le méristème caulinaire.

## **3. Les récepteurs CLV1, CLV2 et CRN agirait-ils au sein d'un même complexe ?**

On peut se demander si CLV1, CLV2 et CRN ont des fonctions redondantes dans le développement du flétrissement bactérien. Des double-mutants existent et il est envisagé de tester leur réponse à la bactérie. Ceci dit, certains éléments suggèrent que les mêmes mécanismes pourraient être mis en jeu. Dans des plantes *clv1* et *clv2*, on observe de nombreuses modifications communes et en particulier, une diminution de l'accumulation de miR169 ainsi que la modification de l'expression des mêmes gènes de la famille *NF-YA*.

Ces protéines pourraient agir au sein d'un même complexe (Zhu *et al.*, 2010) pour effectuer la transduction d'un signal pathogène. Lors de l'attaque par la bactérie, ce complexe serait requis pour la régulation de mécanismes associés au développement de la maladie. La modification (voire l'absence) d'une des composantes de ce complexe aboutirait peut-être à la séquestration/altération d'autre(s) composante(s) végétale(s) nécessaire(s) à l'agent pathogène. Une autre alternative serait que ces modifications entraînent des perturbations dans la biogénèse de certains microARNs et en particulier les miR169, aboutissant à l'accumulation des protéines *NF-YA* et à la résistance des plantes.

L'hypothèse de l'existence d'un tel complexe est en accord avec le fait qu'il existerait une certaine flexibilité dans la formation de complexes de perception, un nombre relativement restreint de récepteurs permettant ainsi à la plante de répondre à une gamme de stimuli quasi infinie. La recherche d'interacteurs de CLV1 a été entreprise mais les candidats obtenus tel que PYL4, un récepteur de l'ABA, n'ont pu être validés. Ce travail devra être poursuivi.

#### **4. Reconnaissance d'autres membres de la famille des gènes *CLE* par les récepteurs CLV1, CLV2 et CRN**

Ces récepteurs pourraient par ailleurs percevoir d'autres ligands que CLV3 et activer ainsi une ou plusieurs voies de signalisation encore méconnue(s) et altérant la réponse des plantes mutantes dans ces gènes à divers stimuli. De nombreux peptides CLE, de la même famille que CLV3, sont capables de se lier à CLV1 et CLV2 (Guo *et al.*, 2010). Certains sont même capables de compléter les mutants *clv3* lorsqu'ils sont exprimés au niveau du méristème. Ces peptides CLE exprimés dans différents tissus pourraient donc être perçus par CLV1 et CLV2 (Sharma *et al.*, 2003) et être requis pour le développement de la maladie.

#### **5. CLV1, CLV2 et CRN sont-ils impliqués dans la perception d'un signal bactérien ?**

Certains peptides CLEs font partie du répertoire d'effecteurs des nématodes à kyste et miment la fonction des CLEs endogène d'*A. thaliana*, induisant les mêmes voies de signalisation (Wang *et al.*, 2005 ; Lu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010a,b) Une étude a récemment montré que CLV2 et CRN sont les récepteurs des peptides CLEs de nématodes à kyste et que les mutants *clv2* et *crn* présentent une résistance accrue au nématode à kyste *Heterodera schachtii* (Replogle *et al.*, 2011). Ces récepteurs, nécessaires à l'infection, semblent donc être manipulés par cet agent pathogène bien que leur rôle exact au cours de l'infection demeure obscur.

Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse que, comme chez les nématodes, ce type de manipulation se produit au cours de l'infection d'*A. thaliana* par *R. solanacearum*. Cependant, aucun gène orthologue de peptides CLE n'a pu être identifié dans le génome de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*. Nous ne pouvons toutefois exclure qu'une autre composante bactérienne (ou plusieurs) puisse(nt) être perçue(s) par CLV1, CLV2 et CRN. Le criblage de mutants de *R. solanacearum* dont la virulence n'est plus affectée par la mutation *clv1* permettrait peut-être d'identifier les composantes bactériennes perçues potentiellement par ces récepteurs. Ces composantes pourraient jouer un rôle clé dans l'interaction car elles

semblent très conservées : les plantes *clv1* et *clv2* présentent en effet une résistance accrue à toutes les souches testées qui appartiennent à différents phylotypes de l'espèce.

#### **6. Quels sont les domaines de CLV1 et CLV2 importants pour l'établissement de la maladie ?**

Les différents mutants *clv1* et *clv2* utilisés au cours de cette étude peuvent nous permettre de répondre à cette question. En effet, certains de ces mutants n'expriment pas la protéine CLV1 (*clv1-12* et *clv1-13*) ou la protéine CLV2 (*rlp10*), tandis que d'autres comportent des mutations ponctuelles au niveau de leur différents domaines (*clv1-1*, *clv1-4* et *clv2-3*). La réponse à *R. solanacearum* de ces différents mutants alléliques étant similaire, il semble que toute modification de ces 2 protéines entraîne une résistance accrue à la bactérie.

#### **7. Y-a-t-il une relocalisation subcellulaire de CLV1 en réponse à *R. solanacearum***

Il a été montré que suite à la perception de CLV3, CLV1 est internalisé dans des vésicules (Nimchuk *et al.*, 2011). Ce phénomène d'internalisation est également observé avec le récepteur FLS2 suite à la perception de la flagelline (Robatzek *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'étudier la dynamique subcellulaire de CLV1 en réponse à *R. solanacearum*.

#### **8. Quels sont les mécanismes qui sous-tendent la résistance accrue des plantes *clv1* à *R. solanacearum* ?**

L'expression génique dans les plantes *clv1* est fortement altérée. Au-delà des gènes *NF-YA*, de nombreux gènes sont dérégulés dans le mutant. Parmi ceux-ci, peu de gènes associés aux voies de défense classique ont été retrouvés confirmant de ce fait que les voies SA, JA et ET ne sont pas impliquées dans la résistance des plantes *clv1* à *R. solanacearum*. Les mécanismes responsables semblent donc faire intervenir d'autres composantes.

#### **9. Des hormones sont-elles impliquées dans la résistance des plantes *clv1* ?**

Les analyses transcriptomiques ont révélé que plusieurs gènes codant des facteurs de transcription appartenant aux familles ARF et ARR, impliquées dans les voies de signalisation auxine et cytokinines respectivement, sont surexprimés dans les mutants *clv1* par comparaison à des plantes sauvages.

L'auxine et les cytokinines jouent des rôles importants, notamment au niveau du méristème caulinaire. L'action des cytokinines permet de maintenir l'activité du méristème caulinaire au cours du cycle de vie de la plante et ces hormones sont intimement liées à la voie de signalisation CLV. L'auxine quant à elle, joue un rôle dans la régulation spatio-temporelle de

l'initiation de la formation des organes à partir du méristème caulinaire (Perales & Reddy, 2012). Le rôle de ces deux hormones est aussi en train d'émerger dans les interactions biotiques. Les données actuelles, bien que très fragmentaires, indiquent qu'elles régulent de manière opposée la voie du SA (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

L'auxine et les cytokinines pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de résistance accrue que présentent les mutants *clv1* en réponse à *R. solanacearum*. Leur implication pourrait être évaluée notamment en testant la réponse de mutants affectés dans leurs voies de signalisation. Des mutants dans certains gènes *ARR* ont déjà été testés au sein de l'équipe mais aucune différence dans la réponse à *R. solanacearum* n'a pu être observée. Cependant, ces hormones pourraient constituer des nœuds entre différentes voies de signalisation qui permettrait d'intégrer les processus développementaux et les réponses au stress.

#### **10. Rôle des gènes *NF-YA* et des miR169 dans la résistance accrue à *R. solanacearum***

##### **- Les gènes *NF-YA*, des facteurs de transcription encore peu connus chez les végétaux**

Les analyses transcriptomiques réalisées sur les mutants *clv1* ont révélé que l'expression de la plupart des gènes de la famille *NF-YA* est altérée. Dans la levure et les cellules animales, ces facteurs de transcription agissent sous forme d'un complexe hétéro-trimérique, composé d'un membre de chaque famille *NF-YA*, *NF-YB* et *NF-YC*, capables de se lier sur les motifs CCAAT présents dans de nombreux promoteurs eucaryotes. Chez les plantes, il existe encore peu d'évidence sur l'existence de tels complexes. Toutefois, le génome d'*A. thaliana* code pour environ 10 gènes dans chacune des familles de *NF-Y* (Gusmaroli *et al.*, 2002) alors que leur nombre est beaucoup plus faible chez les animaux (de l'ordre d'un à deux gènes) (Maity and de Crombrughe, 1998). Ceci pourrait s'expliquer la grande variété des processus dans lesquels les *NF-Ys* sont impliqués tels que l'embryogenèse (Kwong *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2003), la floraison (Kumimoto *et al.*, 2010) et les stress abiotiques (Li *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2009).

Plusieurs des gènes *NF-YA* sont surexprimés dans les mutants *clv1* par comparaison avec des plantes sauvages. Ces gènes présentent une grande spécificité d'expression en particulier au niveau tissulaire (feuilles ou racines) et sont affectés de façon très diverse par l'infection.

Par ailleurs, ce sont principalement les gènes *NF-YA* qui sont enrichis dans nos listes de gènes dérégulés chez les plantes *clv1*. En comparaison, seuls les gènes *NF-YB2*, *NF-YC2* et *NF-YC3* ont une expression altérée, tous trois étant réprimés dans des feuilles infectées par la bactérie.

Cette observation suggère que la régulation de l'expression des gènes *NF-YA* est primordiale pour le contrôle de l'activité du complexe NF-Y chez les plantes *clv1*. Diverses études ont montré qu'il en était de même dans les systèmes plus étudiés (animaux, levure) et également chez les végétaux, par exemple au cours de la sénescence de feuilles d'*A. thaliana* (Breeze *et al.*, 2011).

Les gènes *NF-Y* étant des facteurs de transcription, se pose la question des gènes cibles et leur rôle dans la résistance accrue des plantes *clv1* à *R. solanacearum*. Chez les animaux, il a été montré que les gènes *NF-YA* étaient impliqués dans différents processus tels que l'expression des gènes du protéasome (Xu *et al.*, 2012), dans des processus de modification de la chromatine (Tiwari *et al.*, 2011), les carences en fer (Saletta *et al.*, 2011). A l'heure actuelle, les données chez les végétaux sont très fragmentaires. Des études réalisées sur le gène *NF-YA5* suggèrent qu'il contrôlerait l'expression de gènes de réponse au stress (Li *et al.*, 2008).

Parmi les gènes identifiés par l'analyse transcriptomique des plantes *clv1* et potentiellement régulés par les NF-YA, la plupart contiennent comme attendu le motif CCAAT dans leurs régions promotrices, motif présent chez une grande majorité de gènes.

#### - **Les microARNs miR169, modulateurs des réponses à différents stimuli environnementaux**

Les transcrits des gènes *NF-YA* sont la cible de la famille de microARNs miR169, dont la quantité est fortement réduite dans les mutants *clv1* par comparaison aux plantes sauvages. L'expression de certains miR169 est modifiée par des traitements au froid (Zhou *et al.*, 2008), des stress salins (Zhao *et al.*, 2009) et hydriques (Li *et al.*, 2008) ainsi que par la carence en azote et en phosphate (Zhao *et al.*, 2011 ; Pant *et al.*, 2009). Les gènes *NF-YA* joueraient un grand rôle dans la réponse aux différents stimuli de l'environnement bien qu'attribuer une fonction à chacun des membres de cette famille s'avère difficile du fait de la probable redondance fonctionnelle de ces gènes. En tout cas, ces gènes n'activent probablement pas des voies de défense classiques puisque la résistance accrue des mutants *clv1* à la bactérie est indépendante des voies SA, JA et ET.

Dans ce contexte, il serait intéressant de réaliser une étude comparative sur différentes réponses de défense telles que l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène, les dépôts de callose,.. lors de l'infection de plantes altérées dans l'expression de miR169 (Mimicry ou surexpresser). Nous envisageons également d'évaluer le niveau de tolérance des mutants *clv1* en réponse aux différents stress affectant l'expression de ces microARNs.

Le phloème est un tissu enrichi en miR169 par rapport aux feuilles et aux racines (Buhtz *et al.*, 2010) et la quantité de ces microARNs dans ce tissu est influencée par les teneurs en azote. En effet, dans des conditions de limitation en azote, la quantité de miR169 présent dans le phloème diminue (Pant *et al.*, 2009). De plus, certains miR169 sont capables de cibler les transcrits codant pour des transporteurs d'azote (Zhao *et al.*, 2011). Il a été proposé que ces microARNs puissent agir comme un signal « longue distance » pouvant réguler le métabolisme azoté.

La réduction de disponibilité en azote augmente souvent la sensibilité aux agents pathogènes (Solomon *et al.*, 2003 ; Pageau *et al.*, 2006). La diminution de la quantité de miR169 dans des plantes *clv1* pourrait modifier le métabolisme azoté et par des mécanismes non connus, jouer un rôle dans la résistance accrue à *R. solanacearum*. Dans ce contexte, il serait intéressant de doser la teneur en azote des mutants *clv1* et de tester leur sensibilité à une carence en azote. Afin de déterminer si l'azote joue un rôle important dans la résistance de ces mutants, on pourrait par ailleurs envisager de faire croître des plantes sous différentes conditions de nutrition azotée avant de les inoculer par la bactérie.

On peut aussi se demander quels sont les isoformes des miR169 dont l'expression est la plus affectée dans les mutants *clv1*. Le dosage de chacun des différents membres de la famille miR169 pourrait être envisagé.

Finalement, quels sont les mécanismes qui conduisent à une dérégulation de l'expression des miR169 dans les plantes *clv1* ? Une approche possible serait de vérifier si les composantes végétales impliquées dans la biogénèse de ces microARNs ont une expression altérée dans les plantes mutantes.

#### - **Les miR169 sont-ils impliqués dans le développement du méristème caulinaire ?**

La dérégulation de l'expression des miR169 dans les mutants *clv1* est intrigante. On peut se demander si ce microARN joue un rôle dans le développement du méristème caulinaire. Ceci d'autant plus qu'un membre de la famille NF-YA chez *Medicago truncatula*, MtHAP2-1, dont l'expression est finement régulée par un miR169, joue un rôle clé dans le développement des nodules. L'extinction de l'expression de *MtHAP2-1*, soit par mutation ou surexpression de ce miRNA, conduit à l'arrêt prématuré de la croissance du nodule caractérisé par une absence de méristème (Combiér *et al.*, 2006). Dans ce contexte, il est donc envisagé de réaliser des observations de méristèmes de plantes d'*A. thaliana* altérées dans l'expression de certains miR169 afin de vérifier s'ils jouent un rôle dans leur développement.

## 11. Rôle de CLV1 et CLV2 dans les interactions symbiotiques

Les orthologues de *CLV1* tels que les gènes *HARI* chez *Lotus japonicus* (Nishimura *et al.*, 2002) ; *SYM29* chez *Pisum sativum* (Krusell *et al.*, 2002) ; *GmNARK* chez *Glycine max* (Searle *et al.*, 2003) ; *SUNN* chez *Medicago truncatula* (Schnabel *et al.*, 2005) ; ainsi que les orthologues de *CLV2* : *Ljclv2* chez *L. japonicus* et *SYM28* chez *P. sativum* (Krusell *et al.*, 2011) sont impliqués dans l'autorégulation de la nodulation (AON). L'inactivation de ces gènes affecte la capacité des plantes à réguler le nombre de nodules. Ces plantes perdent par ailleurs leur capacité à inhiber la nodulation dans des conditions de fortes concentrations en nitrate (Reid *et al.*, 2011). Chez *L. japonicus*, *M. truncatula* et *G. max*, la surexpression de certains gènes *CLE* supprime ou réduit la nodulation, d'une manière systémique et dépendante des orthologues de *CLV1* (Okamoto *et al.*, 2009; Mortier *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2011; Saur *et al.*, 2011).

Ces données illustrent l'importance des gènes *CLV1* et *CLV2* dans les symbioses rhizobiennes.

### Conclusion : Rôle générale de CLV1 dans les interactions plantes-microorganismes

Le travail réalisé a permis d'étendre la gamme des protéines de type LRR-RLK impliquées aussi bien dans des processus développementaux qu'en réponse à des agents pathogènes. Les données disponibles dans la littérature et celles obtenues au cours de mes travaux montrent que *CLV1* (ainsi que *CLV2* et *CRN*) joue(nt) un rôle central dans l'interaction des plantes avec des microorganismes aussi variés que des bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*, différents microorganismes pathogènes tels les nématodes à kyste, l'oomycète *H. arabidopsidis*, les champignons *P. cucumerina* et *B. cinerea*, et enfin la bactérie *R. solanacearum*. Ce travail soulève de nombreuses questions abordées dans cette discussion et ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle crucial joué par ce récepteur dans les réponses aux contraintes environnementales.

# Références

---

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahuja I., Kissen R., Bones A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**, 73-90.
- Akira, S., and Hemmi, H.** (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* **85**, 85-95.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E., and Vries, S.d.** (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* **17**, 3337-3349.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S.** (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal* **19**, 2304-2314.
- Alfano, J.R.** (2009). Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Molecular Plant Pathology* **10**, 805-813.
- Alfano, J.R., and Collmer, A.** (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology* **179**, 5655-5662.
- Alvarez, B., Lopez, M.M., and Biosca, E.G.** (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology (Reading)* **154**, 3590-3598.
- Angot A, Vergunst A, Genin S, Peeters N.** (2007). Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathogens* **3**, 3.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14620-14625.
- Arbibe L., Kim D.W., Batsche E., Pedron T., Mateescu B., Muchardt C., Parsot C., Sansonetti P.J.** (2007). An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nature Immunology* **8**, 47-56.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A., and Boucher, C.A.** (1992). Transcriptional organization and expression of the large hrp gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 187-193.
- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Breusegem, F.v., and Hofte, M.** (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* **144**, 1863-1877.
- Audenaert, K., Meyer, G.B.d., and Hofte, M.M.** (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**, 491-501.
- Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell (Cambridge)* **112**, 369-377.
- Barrett L.G., Kniskern J.M., Bodenhausen N., Zhang W., Bergelson J.** (2009). Continua of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytologist* **183**, 513-29.
- Becraft, P.W.** (2002). Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**, 163-192.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell (Cambridge)* **115**, 591-602.
- Bernoux, M., Ellis, J.G., and Dodds, P.N.** (2011a). New insights in plant immunity signaling activation. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 512-518.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., Wit, P.J.G.M.d., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**,

- Bernoux, M., Ve, T., Williams, S., Warren, C., Hatters, D., Valkov, E., Zhang, X., Ellis, J.G., Kobe, B., and Dodds, P.N.** (2011b). Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation. *Cell Host & Microbe* **9**, 200-211.
- Bhattacharjee S., Hiller N.L., Liolios K., Win J., Kanneganti T.D., Young C., Kamoun S., Haldar K.** (2006). The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens* **2**, 50.
- Bhuiyan, N.H., Gopalan, S., Wei, Y., and King, J.** (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany* **60**, 509-521.
- Birch, P.R.J., Armstrong, M., Bos, J., Boevink, P., Gilroy, E.M., Taylor, R.M., Wawra, S., Pritchard, L., Conti, L., Ewan, R., Whisson, S.C., West, P.v., Sadanandom, A., and Kamoun, S.** (2009). Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1133-1140.
- Birker, D., Heidrich, K., Takahara, H., Narusaka, M., Deslandes, L., Narusaka, Y., Reymond, M., Parker, J.E., and O'Connell, R.** (2009). A locus conferring resistance to *Colletotrichum higginsianum* is shared by four geographically distinct *Arabidopsis* accessions. *Plant Journal* **60**, 602-613.
- Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A.M., and Simon, R.** (2010). Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology* **152**, 166-176.
- Block, A., Li, G.Y., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R.** (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 396-403.
- Boch, J., and Bonas, U.** (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 419-436.
- 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 (Washington)* **326**, 1509-1512.
- Boller, T.** (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 116-122.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379-406.
- Bolton, M.D., Esse, H.P.v., Vossen, J.H., Jonge, R.d., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., Berg, G.C.M.v.d., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., Koster, C.G.d., Wit, P.J.G.M.d., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**, 119-136.
- Boucher, C., Genin, S., and Arlat, M.** (2001). Current concepts of pathogenicity in plant pathogenic bacteria
- 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-U116.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science (Washington)* **289**, 617-619.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y., Penfold, C.A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A., and Buchanan-Wollaston, V.** (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**, 873-894.
- Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., and Bessis, R.** (1999). Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**, 298-302.

- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., Bolle, M.F.C.d., and Cammue, B.P.A.** (2006b). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 393-416.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F.C., and Cammue, B.P.A.** (2006a). The role of ethylene in host-pathoven interactions. In *Annual Review of Phytopathology*, pp. 393-416.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J., and Bolwell, G.P.** (1998). Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant Journal* **15**, 333-343.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nurnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO Journal* **21**, 6681-6688.
- Buechel S., Leibfried A., To J.P., Zhao Z., Andersen S.U., Kieber J.J., Lohmann J.U.** (2010). Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. *European Journal of Cell Biology* **89**, 279-84.
- Buhtz, A., Pieritz, J., Springer, F., and Kehr, J.** (2010). Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biology* **10**, (13 April 2010).
- Caillaud, M.C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., Engler, J.d.A., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., and Favery, B.** (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 423-437.
- Cao, F., Yoshioka, K., and Desveaux, D.** (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* **124**, 489-499.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell (Cambridge)* **88**, 57-63.
- Carrillo, L., Martinez, M., Alvarez-Alfageme, F., Castanera, P., Smaghe, G., Diaz, I., and Ortego, F.** (2011). A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. *Transgenic Research* **20**, 305-319.
- Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A., and Ellis, J.G.** (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* **18**, 243-256.
- Catanzariti, A.M., Dodds, P.N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J.G., and Staskawicz, B.J.** (2010). The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 49-57.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., and Caranta, C.** (2008). Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal* **54**, 56-68.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., and Frommer, W.B.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature (London)* **468**, 527-532.
- Chen, X., Shang, J., Chen, D., Lei, C., Zou, Y., Zhai, W., Liu, G., Xu, J., Ling, Z., Cao, G., Ma, B., Wang, Y., Zhao, X., Li, S., and Zhu, L.** (2006). A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant Journal* **46**, 794-804.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., Vries, S.d., and Kemmerling, B.** (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science* **14**, 535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature (London)* **448**, 497-500.
- Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I.** (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell* **19**, 284-95.
- Clark, S.E., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a

- putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* (Cambridge) **89**, 575-585.
- Clouse, S.D., Langford, M., and McMorris, T.C.** (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* **111**, 671-678.
- Cock, J.M., and McCormick, S.** (2001). A large family of genes that share homology with CLAVATA3. *Plant Physiology* **126**, 939-942.
- Cohn, J.R., and Martin, G.B.** (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* **44**, 139-154.
- Combiér, J.P., Frugier, F., Billy, F.d., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A.** (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* **20**, 3084-3088. Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III, Sciences de la Vie* **324**, 915-922.
- Cunnac, S., Boucher, C., and Genin, S.** (2004a). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **186**, 2309-2318.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2004b). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology* **53**, 115-128.
- Danna, C.H., Millet, Y.A., Koller, T., Han, S.W., Bent, A.F., Ronald, P.C., and Ausubel, F.M.** (2011). The Arabidopsis flagellin receptor FLS2 mediates the perception of Xanthomonas Ax21 secreted peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9286-9291.
- de Jonge, R., and Thomma, B.P.H.J.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* **17**, 151-157.
- DeRoy, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9927-9932.
- Denny, T.P., and Baek, S.R.** (1991). Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 198-206.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., Lorenzo, G.d., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J.** (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant* **1**, 423-445.
- Deslandes, L., and Rivas, S.** (2011). The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 42-48.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D., Manirath, K., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8024-8029.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2404-2409.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 659-667.
- Deyoung B.J., Clark S.E.** (2008). BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with CLAVATA signaling. *Genetics* **180**, 895-904.
- DeYoung, B.J., Bickle, K.L., Schrage, K.J., Muskett, P., Patel, K., and Clark, S.E.** (2006). The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. *Plant Journal* **45**, 1-16.

- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8888-8893.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., and Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1696**, 237-244.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- Elsas, J.D.v., Kastelein, P., Bekkum, P.v., Wolf, J.M.v.d., Vries, P.M.d., and Overbeek, L.S.v.** (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* **90**, 1358-1366.
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., and Lamb, C.** (2009). Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* **150**, 1750-1761.
- Fan, W.H., and Dong, X.N.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1377-1389.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., Almeida-Engler, J.d., Lecomte, P., Chantal, V., Arkowitz, R.A., and Abad, P.** (2004). Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* **16**, 2529-2540.
- Fegan, M., and Prior, P.** (2005). How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"?
- 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 Journal* **18**, 265-276.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant Journal* **4**, 307-316.
- Feng, D., Deslandes, L., Keller, H., Revers, F., Favery, B., Lecomte, P., Hirsch, J., Olivier, J., and Marco, Y.** (2004). Isolation and characterization of a novel *Arabidopsis thaliana* mutant unable to develop wilt symptoms after inoculation with a virulent strain of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **94**, 289-295.
- Field, B., Jordan, F., and Osbourn, A.** (2006). First encounters - deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist* **172**, 193-207.
- Flor H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* **9**, 275-296.
- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A.** (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344-350.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., and Oliver, R.P.** (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology* **10**, 1421-1428.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Fang, T., 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 (London)* **447**, 284-288.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Fujisaki, K., Ravelo, G.B., Naito, S., and Ishikawa, M.** (2006). Involvement of THH1, an *Arabidopsis thaliana* homologue of the TOM1 gene, in tobamovirus multiplication. *Journal of General Virology* **87**, 2397-2401.
- Gagne, J.M., and Clark, S.E.** (2010). The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell* **22**, 729-743.
- Garcia, A.V., and Parker, J.E.** (2009). Heaven's gate: nuclear accessibility and activities of plant immune regulators. *Trends in Plant Science* **14**, 479-487.
- Garg, R.P., Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Denny, T.P., and Schell, M.A.** (2000). Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **182**, 6659-6666.
- Garvis S., Munder A., Ball G., de Bentzmann S., Wiehlmann L., Ewbank J.J., Tümmler B., Filloux A.** (2009). *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized

- role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathogens* **5**, e1000540.
- Genin, S., and Boucher, C.** (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 107-134.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C., and Boucher, C.A.** (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology* **6**, 3065-3076.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., and McCourt, P.** (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117-1126.
- Gillings, M. R., and Fahy, P.** (1994). Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Gish, L.A., and Clark, S.E.** (2011). The RLK/Pelle family of kinases. *Plant Journal* **66**, 117-127.
- Giulini, A., Wang, J., and Jackson, D.** (2004). Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. *Nature (London)* **430**, 1031-1034.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205-227.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., and Gafni, Y.** (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 157-161.
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 156-162.
- Godfrey, D., Bohlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H.** (2010). Powdery mildew and rust fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* **11**, (20 May 2010).
- Göhre V., Spallek T., Häweker H., Mersmann S., Mentzel T., Boller T., de Torres M., Mansfield J.W., Robatzek S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology* **18**, 1824-32.
- Gohre, V., and Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 189-215.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**, 251-256.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **18**, 277-284.
- Gordon, S.P., Chickarmane, V.S., Ohno, C., and Meyerowitz, E.M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16529-16534.
- Gu, B., Kale, S.D., Wang, Q., Wang, D., Pan, Q., Cao, H., Meng, Y., Kang, Z., Tyler Brett, M., and Shan, W.** (2011). Rust secreted protein Ps87 is conserved in diverse fungal pathogens and contains a RXLR-like motif sufficient for translocation into plant cells. *PLoS ONE*, e27217.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C.** (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* **189**, 377-387.
- Guo, Y.F., Han, L.Q., Hymes, M., Denver, R., and Clark, S.E.** (2010). CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating *Arabidopsis* stem cell specification. *Plant Journal* **63**, 889-900.
- Gusmaroli, G., Tonelli, C., and Mantovani, R.** (2002). Regulation of novel members of the *Arabidopsis thaliana* CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. *Gene* **283**, 41-48.
- Gust, A.A., Raja, B., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig,**

- E., Lee, J., Felix, G., and Nurnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 32338-32348.
- Hammond-Kosack K.E., Rudd J.J.** (2008). Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. *Plant Signaling Behavior* **3**, 993-995.
- Hayward A.C.** (2000). *Ralstonia solanacearum*. In *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 4. Edited by Lederberg J. Academic Press;:32-42.
- He, K., Gou, X.P., Yuan, T., Lin, H.H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S.D., and Li, J.** (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell death pathways. *Current Biology* **17**, 1109-1115.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315-319.
- Heil, M., and Bostock, R.M.** (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* **89**, 503-512.
- Hematy, K., Cherk, C., and Somerville, S.** (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 406-413.
- Hernandez-Blanco, C., Feng, D., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A.** (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* **19**, 890-903.
- Heuer, H., Yin, Y., Xue, Q., Smalla, K., and Guo, J.** (2007). Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4379-4384.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mahonen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R., and Kakimoto, T.** (2004). In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8821-8826.
- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D., Balague, C., and Marco, Y.** (2002). Delayed symptom development in ein2-1, an Arabidopsis ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **92**, 1142-1148.
- Hok, S., Danchin, E.G.J., Allasia, V., Panabieres, F., Attard, A., and Keller, H.** (2011). An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. *Plant, Cell and Environment* **34**, 1944-1957.
- Hu, J., Barlet, X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D., Somssich, I., and Marco, Y.** (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, e2589.
- Hua, J., Chang, C., Sun, Q., and Meyerowitz, E.M.** (1995). Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis *Ers* gene. *Science (Washington)* **269**, 1712-1714.
- Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A.** (2006). An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10098-10103.
- Huibers, R.P., Jong, M.d., Dekter, R.W., and Ackerveken, G.v.d.** (2009). Disease-specific expression of host genes during downy mildew infection of Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1104-1115.
- Irish V.F. and Sussex I.M.** (1992). A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.
- Iriti M., Faoro F.** (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 66-8.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., and Stebbins, C.E.** (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science (Washington)* **0**, 222-225.
- Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E.** (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1933.
- Jeppesen, M.G., Navratil, T., Spremulli, L.L., and Nyborg, J.** (2005). Crystal structure of the bovine mitochondrial elongation factor Tu(.)Ts complex. *Journal of Biological Chemistry*

- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* **19**, 4004-4014.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature (London)* **444**, 323-329.
- Jones, M.G.K., and Payne, H.L.** (1978). Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of Nematology* **10**, 70-84.
- Jonge, R.d., and Thomma, B.P.H.J.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* **17**, 151-157.
- Jonge, R.d., Esse, H.P.v., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Krol, S.v.d., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science (Washington)* **329**, 953-955.
- Jørgensen, J.H.** (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, **63**, 41-152.
- Juge, N.** (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* **11**, 359-367.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science (Washington)* **324**, 89-91.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11086-11091.
- Kao, C.C., Barlow, E., and Sequeira, L.** (1992). Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **174**, 1068-1071.
- 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 (Washington)* **318**, 648-651.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R., and Bonas, U.** (2009). Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *Plant Journal* **59**, 859-871.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S.A., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J.E., Mussig, G., Thomma, B.P.H.J., Albrecht, C., Vries, S.C.d., Hirt, H., and Nurnberger, T.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell death control. *Current Biology* **17**, 1116-1122.
- Kepinski, S., and Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature (London)* **435**, 446-451.
- Kim, D., and Hwang, B.** (2011). The pepper receptor-like cytoplasmic protein kinase CaPIK1 is involved in plant signaling of defense and cell-death responses. *Plant Journal* **66**, 642-655.
- Kim, H.S., and Delaney, T.P.** (2002). Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant Journal* **32**, 151-163.
- Kim, T.W., and Wang, Z.Y.** (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 681-704.
- Kobe, B., and Kajava, A.V.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 725-732.
- Kramer R.W., Slogowski N.L., Eze N.A., Giddings K.S., Morrison M.F., Siggers K.A., Starnbach M.N., Lesser C.F.** (2007). Yeast functional genomic screens lead to identification of a role for a bacterial effector in innate immunity regulation. *PLoS Pathogens* **3**, e21.
- Krasileva, K.V., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2010). Activation of an Arabidopsis resistance protein is specified by the in planta association of its leucine-rich repeat domain with the cognate oomycete effector. *Plant Cell* **22**, 2444-2458.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., Bruijn, F.d., Pajuelo, E., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature (London)* **420**, 422-426.
- Krusell, L., Sato, N., Fukuhara, I., Koch, B.E.V., Grossmann, C., Okamoto, S., Oka-Kira, E., Otsubo, Y., Aubert, G., Nakagawa, T., Sato, S., Tabata, S., Duc, G., Parniske, M., Wang, T.L., Kawaguchi, M., and Stougaard, J.** (2011). The *Clavata2* genes of pea and *Lotus*

- japonicus affect autoregulation of nodulation. *Plant Journal* **65**, 861-871.
- Kuhlemeier, C.** (2007). Phyllotaxis. *Trends in Plant Science* **12**, 143-150.
- Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N., and Holt, B.F., III.** (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **63**, 379-391.
- 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.
- Kwong, R.W., Bui, A.Q., Lee, H.S., Kwong, L.W., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell* **15**, 5-18.
- Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C.** (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1058-1068.
- Lebeau, A., Daunay, M.C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E., and Prior, P.** (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* **101**, 154-165.
- Lee, H., Chah, O.-K., and Sheen, J.** (2011). Stem-cell-triggered immunity through CLV3p-FLS2 signalling. *Nature* **473**, 376-U559.
- Lee, H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (2003). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2152-2156.
- Lee, M., Qi, M., and Yang, Y.** (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 527-535.
- Lee, S.-W., Han, S.-W., Sriyanum, M., Park, C.-J., Seo, Y.-S., and Ronald, P.C.** (2009). A Type I-Secreted, Sulfated Peptide Triggers XA21-Mediated Innate Immunity. *Science* **326**, 850-853.
- Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S.H.** (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant Receptor-Like Kinase/Pelle genes. *Plant Physiology* **150**, 12-26.
- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., and Lohmann, J.U.** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature (London)* **438**, 1172-1175.
- Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development (Cambridge)* **129**, 3195-3206.
- Lewis J.D., Guttman D.S., Desveaux D.** (2009). The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 1055-1063.
- Leyser, O.** (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Current Biology* **16**, R424-R433.
- Li H., Xu H., Zhou Y., Zhang J., Long C., Li S., Chen S., Zhou J.M., Shao F.** (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **16**, 1000-1003.
- Li, J., Wen, J.Q., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., and Walker, J.C.** (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell (Cambridge)* **110**, 213-222.
- Li, W., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X.P., Jin, H.L., and Zhu, J.K.** (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* **20**, 2238-2251.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J.** (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology* **168**, 512-522.
- Lindsay, D.L., Sawhney, V.K., and Bonham-Smith, P.C.** (2006). Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development

- in Arabidopsis. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Liu, W., Zhou, X., Li, G., Li, L., Kong, L., Wang, C., Zhang, H., and Xu, J.** (2011). Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathogens*, e1001261.
- Loake, G., and Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence - the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 466-472.
- Long J.A., Moan E.I., Medford J.I., Barton M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **4**, 66-69.
- Loon, L.C.v.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 753-765.
- Loon, L.C.v., and Pieterse, C.M.J.** (2002). Biocontrol agents in signaling resistance.
- Loon, L.C.v., Rep, M., and Pieterse, C.M.J.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135-162.
- Lorang, J.M., Sweat, T.A., and Wolpert, T.J.** (2007). Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14861-14866.
- Lu, D.P., Lin, W.W., Gao, X.Q., Wu, S.J., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T.P., He, P., and Shan, L.** (2011). Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science (Washington)* **332**, 1439-1442.
- Lu, D.P., Wu, S.J., Gao, X.Q., Zhang, Y.L., Shan, L., and He, P.** (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 496-501.
- Lu, S.W., Chen, S.Y., Wang, J.Y., Yu, H., Chronis, D., Mitchum, M.G., and Wang, X.H.** (2009). Structural and functional diversity of CLAVATA3/ESR (CLE)-like genes from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1128-1142.
- Lukasik, E., and Takken, F.L.W.** (2009). STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 427-436.
- Macho, A.P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzon, C.R., and Genin, S.** (2010). A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1197-1205.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell (Cambridge)* **112**, 379-389.
- Maekawa, T., Cheng, W., Spiridon, L.N., Toller, A., Lukasik, E., Saijo, Y., Liu, P., Shen, Q., Micluta, M.A., Somssich, I.E., Takken, F.L.W., Petrescu, A.J., Chai, J., and Schulze-Lefert, P.** (2011). Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death. *Cell Host & Microbe* **9**, 187-199.
- Maity S.N. and de Crombrughe B.** (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends in Biochemical Science* **23**, 174-178.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., and Arlat, M.** (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* hrp genes in the presence of plant cells. *Molecular Microbiology* **27**, 437-453.
- Marois, E., Ackerveken, G.v.d., and Bonas, U.** (2002). The Xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 637-646.
- Marumo S., Katayama M., Komori E., Ozaki Y., Natsume M., Kondo S.** (1982). Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea*. *Agricultural & Biological Chemistry Tokyo* **46**, 1967-1968.
- Mathews, D.M., and Dodds, J.A.** (2006). Detection of multiple viruses in Verbena, Diascia and Lobelia plants. *Acta Horticulturae*, 219-227.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 409-414.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell (Cambridge)* **95**, 805-815.

- Meier, I., and Somers, D.E.** (2011). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 538-546.
- Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y.** (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 101-122.
- Meng, F.H., Yao, J., and Allen, C.** (2011). A motN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *Journal of Bacteriology* **193**, 2477-2486.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., and Dietrich, R.** (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2551-2565.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H.H., and Michelmore, R.W.** (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 809-834.
- Milling, A., Babujee, L., and Allen, C.** (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS ONE*, e15853.
- Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H., and Sawa, S.** (2008). The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **49**, 1752-1757.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19613-19618.
- Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E.** (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 708-724.
- Mortier, V., Herder, G.d., Whitford, R., Velde, W.v.d., Rombauts, S., D'Haeseleer, K., Holsters, M., and Goormachtig, S.** (2010). CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology* **153**, 222-237.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J.** (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science (Washington)* **326**, 1501.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., and Vries, R.P.d.** (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**, S63-S70.
- Mukhtar, M.S., Carvunis, A.R., Dreze, M., Eppe, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., Pevzner, S.J., Donovan, S.E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M.M., Gebreab, F., Gutierrez, B.J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C.J., McDonald, N., Gai, L.T., Chen, H.M., and He, Y.J.** (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science (Washington)* **333**, 596-601.
- Muller, R., Bleckmann, A., and Simon, R.** (2008). The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**, 934-946.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E.** (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**, 501-520.
- Murphy, A.M., Pryce-Jones, E., Johnstone, K., and Ashby, A.M.** (1997). Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 53-65.
- Nadeau, J.A., and Sack, F.D.** (2002). Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science* **296**, 1697-1700.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H.** (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* **10**, 339-346.
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraiishi, T., Iwabuchi, M., and Narusaka, Y.** (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant Journal* **60**, 218-226.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., and Voinnet, O.** (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science (Washington)* **321**, 964-967.
- 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 Physiology* **135**, 1113-1128.

- Nicaise, V., Roux, M., and Zipfel, C.** (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology* **150**, 1638-1647.
- Nicholson, R.L., and Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 369-389.
- Nimchuk, Z.L., Tarr, P.T., and Meyerowitz, E.M.** (2011a). An evolutionarily conserved pseudokinase mediates stem cell production in plants. *Plant Cell* **23**, 851-854.
- Nimchuk, Z.L., Tarr, P.T., Ohno, C., Qu, X., and Meyerowitz, E.M.** (2011b). Plant stem cell signaling involves ligand-dependent trafficking of the CLAVATA1 receptor kinase. *Current Biology* **21**, 345-352.
- Nishikiori, M., Dohi, K., Mori, M., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M.** (2006). Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. *Journal of Virology* **80**, 8459-8468.
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C.** (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., and Kawaguchi, M.** (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature (London)* **420**, 426-429.
- 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 (Washington)* **313**, 220-223.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defence gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 430-438.
- Nuhse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7521-7526.
- Nurnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1994). High-affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma-membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E.A., Oussatche, 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 Journal* **33**, 245-257.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., and Matsubayashi, Y.** (2008). *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science (Washington)* **319**, 294.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y.** (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biolology* **5**, 578-580.
- Okamoto S., Ohnishi E., Sato S., Takahashi H., Nakazono M., Tabata S., Kawaguchi M.** (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell & Physiology* **50**, 67-77.
- Onate-Sanchez, L., and Singh, K.B.** (2002). Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology* **128**, 1313-1322.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009). The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular Microbiology* **11**, 191-198.
- Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J.F., and Masclaux-Daubresse, C.** (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**, 547-557.
- Pandelova, I., Betts, M.F., Manning, V.A., Wilhelm, L.J., Mockler, T.C., and Ciuffetti, L.M.**

- (2009). Analysis of transcriptome changes induced by Ptr ToxA in wheat provides insights into the mechanisms of plant susceptibility. *Molecular Plant* **2**, 1067-1083.
- Pandey, S.P., and Somssich, I.E.** (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology* **150**, 1648-1655.
- Pant, B.D., Musialak-Lange, M., Nuc, P., May, P., Buhtz, A., Kehr, J., Walther, D., and Scheible, W.R.** (2009). Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiology* **150**, 1541-1555.
- Park, J., Park, J., Kim, Y., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S., Kim, J., Lee, Y., and Park, C.** (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 10036-10046.
- Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2006). The Arabidopsis suppressor of auxin resistance proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *Plant Cell* **18**, 1590-1603.
- Patrick, J.W.** (1989). Solute efflux from the host at plant-microorganism interfaces. *Australian Journal of Plant Physiology* **16**, 53-67.
- Pedley, K.F., and Martin, G.B.** (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 215-243.
- Perales M., Reddy G.V.** (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 10-16.
- Perilli, S., Moubayidin, L., and Sabatini, S.** (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 21-26.
- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 696-706.
- Pitzschke A., Hirt H.** (2010). New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO Journal* **29**, 1021-1032.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H.** (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 421-426.
- Poueymiro, M., and Genin, S.** (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 44-52.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., and Genin, S.** (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GM11000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 538-550.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., and Fegan, M.** (2000). Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Systematic and Applied Microbiology* **23**, 479-486.
- Reid, D.E., Ferguson, B.J., and Gresshoff, P.M.** (2011). Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 606-618.
- Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., and Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature (London)* **426**, 255-260.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., and Prior, P.** (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**, (15 June 2010).
- Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S., and Peeters, N.** (2011). Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytologist* **192**, 976-987.
- Replogle, A., Wang, J.Y., Bleckmann, A., Hussey, R.S., Baum, T.J., Sawa, S., Davis, E.L., Wang, X.H., Simon, R., and Mitchum, M.G.** (2011). Nematode CLE signaling in Arabidopsis requires CLAVATA2 and CORYNE. *Plant Journal* **65**, 430-440.

- Rivas, S., and Thomas, C.M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 395-436.
- Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Koechner, P., Felix, G., Shiu, S.-H., and Boller, T.** (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology* **64**, 539-547.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes & Development* **20**, 537-542.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G.** (2011a). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 317-343.
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., and Jones, J.D.G.** (2011b). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant Journal* **67**, 218-231.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Rajendra, B., and Jones, J.D.G.** (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 372-379.
- Rojó, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., and Fletcher, J.C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969-977.
- Romer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., Bonas, U., and Lahaye, T.** (2009). Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiology* **150**, 1697-1712.
- Rooney, H.C.E., Klooster, J.W.v.t., Hoorn, R.A.L.v.d., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G., and Wit, P.J.G.M.d.** (2005). *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science (Washington)* **308**, 1783-1786.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M.** (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5812-5817.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., and Levy, M.** (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature (London)* **415**, 497-502.
- Saletta, F., Rahmanto, Y.S., Siafakas, A.R., and Richardson, D.R.** (2011). Cellular iron depletion and the mechanisms involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA damage family of genes. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 35396-35406.
- Saur, I.M.L., Oakes, M., Djordjevic, M.A., and Imin, N.** (2011). Crosstalk between the nodulation signaling pathway and the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **190**, 865-874.
- Schell, M.A.** (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* **38**, 263-292.
- Schmelz, E.A., Engelberth, J., Alborn, H.T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., and Tumlinson, J.H., III.** (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10552-10557.
- Schmidt, S.M., and Panstruga, R.** (2011). Pathogenomics of fungal plant parasites: what have we learnt about pathogenesis? *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 392-399.
- Schnabel, E., Journet, E.P., Carvalho-Niebel, F.d., Duc, G., and Frugoli, J.** (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology* **58**, 809-822.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jurgens, G., and Laux, T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell (Cambridge)* **100**, 635-644.
- Schornack, S., Damme, M.v., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E.** (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors

- targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17421-17426.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 9444-9451.
- Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., and Zipfel, C.** (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genetics* **7**, e1002046.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., and Gresshoff, P.M.** (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science (Washington)* **299**, 109-112.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., and Hoorn, R.A.L.v.d.** (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell* **20**, 1169-1183.
- Shan, L., He, P., Li, J.M., Heese, A., Peck, S.C., Nurnberger, T., Martin, G.B., and Sheen, J.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host & Microbe* **4**, 17-27.
- Sharma, V.K., Ramirez, J., and Fletcher, J.C.** (2003). The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins. *Plant Molecular Biology* **51**, 415-425.
- Sharp, J.K., Valent, B., and Albersheim, P.** (1984). HOST-PATHOGEN INTERACTIONS .26. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A BETA-GLUCAN FRAGMENT THAT ELICITS PHYTOALEXIN ACCUMULATION IN SOYBEAN. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 1312-1320.
- Shen, Q., 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 (Washington)* **315**, 1098-1103.
- Shibuya, K., Barry, K.G., Ciardi, J.A., Loucas, H.M., Underwood, B.A., Nourizadeh, S., Ecker, J.R., Klee, H.J., and Clark, D.G.** (2004). The central role of PhEIN2 in ethylene responses throughout plant development in petunia. *Plant Physiology* **136**, 2900-2912.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B.** (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10763-10768.
- Shpak, E.D., Berthiaume, C.T., Hill, E.J., and Torii, K.U.** (2004). Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development (Cambridge)* **131**, 1491-1501.
- Skamnioti, P., and Gurr, S.J.** (2007). Magnaporthe grisea cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell* **19**, 2674-2689.
- SKOOG F., MILLER C.O.** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of Society for Experimental Biology* **11**, 118-130.
- Skylar, A., Hong, F.X., Chory, J., Weigel, D., and Wu, X.L.** (2010). STIMPY mediates cytokinin signaling during shoot meristem establishment in Arabidopsis seedlings. *Development (Cambridge)* **137**, 541-549.
- Slootweg, E., Roosien, J., Spiridon, L.N., Petrescu, A.J., Tameling, W., Joosten, M., Pomp, R., Schaik, C.v., Dees, R., Borst, J.W., Smant, G., Schots, A., Bakker, J., and Goverse, A.** (2010). Nucleocytoplasmic distribution is required for activation of resistance by the potato NB-LRR receptor Rx1 and is balanced by its functional domains. *Plant Cell* **22**, 4195-4215.
- Solomon, P.S., Tan, K., and Oliver, R.P.** (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology* **4**, 203-210.
- Song, J., Win, J., Tian, M.Y., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., Hoorn, R.A.L.v.d., and Kamoun, S.** (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 1654-1659.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B.,**

- Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., and Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *XA21*. *Science* **270**, 1804-1806.
- Soylu, S.** (2006). Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* **170**, 942-952.
- Spanu, P.D., Abbott, J.C., Amselem, J., Burgis, T.A., Soanes, D.M., Stuber, K., Themaat, E.V.L.v., Brown, J.K.M., Butcher, S.A., Gurr, S.J., Lebrun, M.H., Ridout, C.J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N.J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G.R., Benjdia, M., Bidzinski, P., Bindschedler, L.V., Both, M., Brewer, M.T., Cadle-Davidson, L., Cadle-Davidson, M.M., Collemare, J., and Cramer, R.** (2010). Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science (Washington)* **330**, 1543-1546.
- Stassen, J.H.M., and Ackerveken, G.v.d.** (2011). How do oomycete effectors interfere with plant life? *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 407-414.
- Steeves, T.A., and Sussex, I.M.** (1989). Patterns in plant development.
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H.A., Okmen, B., Beenen, H.G., van Lieere, S., Kema, G.H.J., and de Wit, P.J.G.M.** (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7610-7615.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Mettraux, J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 235-270.
- Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C., and Clark, S.E.** (1998). Control of meristem development by *CLAVATA1* receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiology* **117**, 1217-1225.
- Stracke, R., Ishihara, H., Huep, G., Barsch, A., Mehrstens, F., Niehaus, K., and Weisshaar, B.** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant Journal* **50**, 660-677.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., and Brisson, N.** (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature Biotechnology* **19**, 769.
- Sugimoto, K., Takeda, S., and Hirochika, H.** (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* **12**, 2511-2527.
- Sun, W.X., 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.
- Sutton, P.N., Gilbert, M.J., Williams, L.E., and Hall, J.L.** (2007). Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum* **129**, 787-795.
- Sutton, P.N., Henry, M.J., and Hall, J.L.** (1999). Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* **208**, 426-430.
- Tameling, W.I.L., Nooijen, C., Ludwig, N., Boter, M., Sloopweg, E., Goverse, A., Shirasu, K., and Joosten, M.H.A.J.** (2010). RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *Plant Cell* **22**, 4176-4194.
- Tang, X.Y., Xiao, Y.M., and Zhou, J.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1159-1166.
- Tans-Kersten, J., Huang, H.Y., and Allen, C.** (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* **183**, 3597-3605.
- Tao, Y., Xie, Z.Y., Chen, W.Q., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G.Z., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**, 317-330.
- Tasset, C., Bernoux, M., Jauneau, A., Pouzet, C., Briere, C., Kieffer-Jacquino, S., Rivas, S., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2010). Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens*, e1001202.

- Thaler, J.S., and Bostock, R.M.** (2004). Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**, 48-58.
- Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351-357.
- Tiwari V.K., Stadler M.B., Wirbelauer C., Paro R., Schübeler D., Beisel C.** (2011). A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation. *Nature Genetics* **44**, 94-100.
- To, J.P.C., and Kieber, J.J.** (2008). Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science* **13**, 85-92.
- To, J.P.C., Deruere, J., Maxwell, B.B., Morris, V.F., Hutchison, C.E., Ferreira, F.J., Schaller, G.E., and Kieber, J.J.** (2007). Cytokinin regulates type-A Arabidopsis response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901-3914.
- 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 Journal* **38**, 119-130.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**, 373-378.
- Torres-Zabala, M.d., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Egea, P.R., Bogre, L., and Grant, M.** (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* **26**, 1434-1443.
- Trotochaud, A.E., Tong, H., Guang, W., Yang, Z., and Clark, S.E.** (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signalling complex that includes KAPP and a rho-related protein. *Plant Cell* **11**, 393-405.
- Trudgill D.L., Blok V.C.** (2001). APOMICTIC, POLYPHAGOUS ROOT-KNOT NEMATODES: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. *Annual Review in Phytopathology* **39**, 53-77.
- Truksa, M., MacKenzie, S.L., and Qiu, X.** (2003). Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 141-147.
- Truniger V., Aranda M.A.** (2009). Recessive resistance to plant viruses. *Advances in Virus Research* **75**, 119-159.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., and Katagiri, F.** (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant Journal* **53**, 763-775.
- Tudzynski B., Sharon A.** (2002). Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. In *The Mycota*, ed. K Esser, JW Bennett, pp. 183-212. New York: Springer.
- Ulker, B., and Somssich, I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 491-498.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* **14**, 103-110.
- Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M.F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., Gentzbittel, L., and Petitprez, M.** (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 159-167.
- Valls M., Genin S., Boucher C.** (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* **2**, e82.
- van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A.** (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology* **10**, 248.
- van der Hoorn, R.A.L., and Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- Vance, C.P., Kirk, T.K., and Sherwood, R.T.** (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 259-288.
- Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A.** (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 241-251.
- Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.A., Hirt, H., and Mengiste, T.** (2006). The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in Arabidopsis resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **18**, 257-273.

- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 177-206.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F., and Park, S.W.** (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 436-442.
- Vogel, J., and Somerville, S.** (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1897-1902.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Schiff, C., and Somerville, S.C.** (2002). PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2095-2106.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Somerville, C.R., and Somerville, S.C.** (2004). Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant Journal* **40**, 968-978.
- Wada, K.C., and Takeno, K.** (2010). Stress-induced flowering. *Plant Signaling and Behavior* **5**, 944-947.
- Walton, J.D.** (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* **8**, 1723-1733.
- Wang J., Replogle A., Hussey R., Baum T., Wang X., Davis E.L., Mitchum M.G.** (2011). Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* **12**, 177-186.
- Wang, J.Y., Lee, C., Replogle, A., Joshi, S., Korkin, D., Hussey, R., Baum, T.J., Davis, E.L., Wang, X.H., and Mitchum, M.G.** (2010). Dual roles for the variable domain in protein trafficking and host-specific recognition of *Heterodera glycines* CLE effector proteins. *New Phytologist* **187**, 1003-1017.
- Wang, X.H., Mitchum, M.G., Gao, B.L., Li, C.Y., Diab, H., Baum, T.J., Hussey, R.S., and Davis, E.L.** (2005). A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 187-191.
- Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., and Liu, M.** (2007). *Arabidopsis* EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology* **64**, 633-644.
- Williams, R.W., Wilson, J.M., and Meyerowitz, E.M.** (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10467-10472.
- Wu, S.C., Halley, J.E., Luttig, C., Fernekes, L.M., Gutierrez-Sanchez, G., Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (2006). Identification of an endo-beta-1,4-D-xylanase from *Magnaporthe grisea* by gene knockout analysis, purification, and heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 986-993.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X.Y., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**, 74-80.
- Xiao, S., Calis, O., Patrick, E., Zhang, G., Piyavadee, C., Muskett, P., Parker, J.E., and Turner, J.G.** (2005). The atypical resistance gene, RPW8, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**, 95-110.
- Xiao, S., Charoenwattana, P., Holcombe, L., and Turner, J.G.** (2003). The *Arabidopsis* genes RPW8.1 and RPW8.2 confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 289-294.
- Xu H., Fu J., Ha S.W., Ju D., Zheng J., Li L., Xie Y.** (2012). The CCAAT box-binding transcription factor NF-Y regulates basal expression of human proteasome genes. *Biochimica & Biophysica Acta* **1823**, 818-825.
- Yaish, M.W., Colasanti, J., and Rothstein, S.J.** (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3727-3735.
- Yamaji, Y., Kobayashi, T., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Suzuki, M., Namba, S., and Hibi, T.** (2006). In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. *Virology* **347**, 100-108.
- Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Yoshida, A., Yoshii, A., Shimizu, T., Namba, S., and Hibi, T.** (2010). Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. *Archives of Virology* **155**, 263-268.
- Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M.** (2002). Complete inhibition of tobamovirus

- multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *Journal of Virology* **76**, 2491-2497.
- Yang, B., Sugio, A., and White, F.F.** (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10503-10508.
- Yao, J., and Allen, C.** (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* **188**, 3697-3708.
- Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.C., and Jahn, M.M.** (2007). Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**, 2913-2928.
- Zabala, M.d.T., Bennett, M.H., Truman, W.H., and Grant, M.R.** (2009). Antagonism between salicylic acid and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant Journal* **59**, 375-386.
- Zabka, V., Stangl, M., Bringmann, G., Vogg, G., Riederer, M., and Hildebrandt, U.** (2008). Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytologist* **177**, 251-263.
- Zanten, M.v., Snoek, L.B., Proveniers, M.C.G., and Peeters, A.J.M.** (2009). The many functions of ERECTA. *Trends in Plant Science* **14**, 214-218.
- Zeenko, V.V., Ryabova, L.A., Spirin, A.S., Rothnie, H.M., Hess, D., Browning, K.S., and Hohn, T.** (2002). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA. *Journal of Virology* **76**, 5678-5691.
- Zhang J., Shao F., Li Y., Cui H., Chen L., Li H., Zou Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X., Zhou J.M.** (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe* **1**, 175-185.
- Zhang, J., Shao, F., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., and Zhou, J.-M.** (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-Induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe* **1**, 175-185.
- Zhao, B., Ge, L., Liang, R., Li, W., Ruan, K., Lin, H., and Jin, Y.** (2009). Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Molecular Biology* **10**, (8 April 2009).
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J.K., Zhang, F., and Li, W.** (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytologist* **190**, 906-915.
- Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J., and Lohmann, J.U.** (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature (London)* **465**, 1089-1092.
- Zhou, X.F., Wang, G.D., Sutoh, K., Zhu, J.K., and Zhang, W.X.** (2008). Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1779**, 780-788.
- Zhu, Y., Wang, Y., Li, R., Song, X., Wang, Q., Huang, S., Jin, J., Liu, C., and Lin, J.** (2010). Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis. *Plant Journal* **61**, 223-233.
- 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 (Cambridge)* **125**, 749-760.
- 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 (London)* **428**, 764-767.

**Author :** Mathieu Hanemian

**Supervisor :** Yves Marco

**Disruption of the receptor kinase *CLAVATA1* gene leads to decreased  
miR169 accumulation and enhances disease resistance to *Ralstonia  
solanacearum* in *Arabidopsis thaliana***

The molecular mechanisms associated to disease development caused by the phytopathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* are poorly understood. Search for mutants altered in their response to the pathogen led to the identification of some susceptibility genes including targets of virulence factors as well as plant components required for pathogen fitness.

The *CLAVATA1* (*CLV1*) gene, extensively studied for its role in plant development, encodes a receptor-like kinase with a leucin-rich repeat extracellular domain. This protein plays indeed a key role in maintaining a pool of stem cell within the shoot apical meristem. The *clv1* mutation leads to an increased resistance to *R. solanacearum*, associated with a decrease of *in planta* bacterial growth.

The aim of my PhD work was the understanding of the mechanisms underlying the increased resistance conferred by the *clv1* mutation in using different approach (molecular, genetic and transcriptomic). We have been able to demonstrate the implication of the *NF-YA* transcription factor family, controlled by microRNA miR169, in the increased resistance of these mutants.

These results demonstrate that the CLV1 protein is a required component for the establishment of the disease caused by *R. solanacearum*. and illustrate the wide diversity of functions fulfilled by receptors kinases.

**Mots clés :** *Arabidopsis thaliana*, *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, susceptibility, receptor-like kinase, *NF-YA*, miR169.

**Unité de recherche**

**LABORATOIRE DES INTERACTIONS**

**PLANTES-MICROORGANISMES (LIPM)**

**Auteur :** Mathieu Hanemian

**Directeur de thèse :** Yves Marco

## **Rôle de la protéine CLV1 dans la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum***

Les mécanismes moléculaires associés au développement de la maladie causée par la bactérie phytopathogène *R. solanacearum* sont relativement peu connus à ce jour. La recherche de mutants d'*Arabidopsis* incapables de développer des symptômes de flétrissement associée à la maladie a mené à l'identification de gènes dit de sensibilité. Les produits de ces gènes peuvent être des cibles de facteurs de virulence aussi bien que des composantes végétales requises pour la « fitness » de la bactérie.

Le gène *CLAVATA1* (*CLV1*), très étudié dans le contexte du développement, code pour une protéine appartenant à la famille des récepteurs kinase possédant un domaine extracellulaire riche en leucine. Cette protéine joue un rôle crucial dans le maintien d'une population de cellules souches au niveau du méristème caulinaire donnant naissance à toute la partie aérienne de la plante. La mutation *clv1* entraîne une résistance accrue à *R. solanacearum* associée à une réduction de la croissance bactérienne *in planta*.

Mes travaux de thèse ont consisté à élucider les mécanismes sous-tendant la résistance accrue conférée par la mutation du gène *CLV1* en utilisant différents types d'approche (génétique, moléculaire et transcriptomique). Nous avons été capables de démontrer l'implication de facteurs de transcription de la famille de gènes *NF-YA*, eux-mêmes contrôlés par les microARNs miR169, dans la résistance accrue des mutants *clv1*.

Ces résultats démontrent que la protéine CLV1 est une composante requise pour l'établissement de la maladie causée par *R. solanacearum*. Mes travaux de thèse mettent en lumière une nouvelle fonction de cette protéine et illustrent la grande diversité des rôles biologiques de protéines de type récepteur-kinase.

**Mots clés :** *Arabidopsis thaliana*, *Ralstonia solanacearum*, flétrissement bactérien, sensibilité, récepteur kinase, *NF-YA*, microARN.

**Unité de recherche**

**LABORATOIRE DES INTERACTIONS**

**PLANTES-MICROORGANISMES (LIPM)**