



HAL
open science

Mode d'action de l'acide β -aminobutyrique chez la vigne : un inducteur de résistance aux pathogènes et étude des mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes du mutant PAD2 d'arabidopsis déficient en glutathion

Carole Dubreuil Dubreuil-Maurizi

► To cite this version:

Carole Dubreuil Dubreuil-Maurizi. Mode d'action de l'acide β -aminobutyrique chez la vigne : un inducteur de résistance aux pathogènes et étude des mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes du mutant PAD2 d'arabidopsis déficient en glutathion. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS021 . tel-00603338

HAL Id: tel-00603338

<https://theses.hal.science/tel-00603338>

Submitted on 24 Jun 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTE-STIC



Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne
Plante-Microbe-Environnement

Laboratoire de Signalisation cellulaire et moléculaire dans les réactions de défense

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne
Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Carole DUBREUIL

**MODE D'ACTION DE L'ACIDE β -AMINO BUTYRIQUE CHEZ LA VIGNE :
UN INDUCTEUR DE RESISTANCE AUX PATHOGENES**

ET

**ETUDE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE
AUX PATHOGENES DU MUTANT *PAD2* D'ARABIDOPSIS
DEFICIENT EN GLUTATHION**

1^{er} octobre 2010

Mme B. MAUCH-MANI, Directrice de Recherche, Université de Neuchâtel, Suisse	Rapporteur
M. J-L MONTILLET, Directeur de Recherche, CEA, Cadarache	Rapporteur
M. J. DAT, Professeur, Université d'Angers	Examineur
M. D. WIPF, Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
M. B. POINSSOT, Maître de Conférence, Université de Bourgogne	Coencadrant de thèse

Directeur de thèse : Alain PUGIN, Professeur, Université de Bourgogne



RESUME

La compréhension des mécanismes de défense mis en place lors de la résistance des plantes vis-à-vis d'agents pathogènes a pour objectif de proposer des alternatives à l'utilisation de produits phytosanitaires utilisés en agriculture.

Dans une première partie, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance induite aux pathogènes par l'acide β -aminobutyrique (BABA) chez la vigne. En effet, cet acide aminé non protéique favorise un état physiologique particulier, appelé potentialisation, dans lequel la plante est capable de mobiliser plus rapidement et/ou plus intensément ses réactions de défense en réponse à un stress. Contrairement aux éliciteurs comme les oligogalacturonates (OG), nous avons montré que le BABA seul n'induisait pas les événements précoces de signalisation sur suspensions cellulaires de vigne, tels que les variations de la concentration en calcium cytosolique libre ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), la production de monoxyde d'azote (NO), la production d' H_2O_2 , la phosphorylation de MAPkinases, ni l'expression de gènes de défense. Seules la production d' H_2O_2 et l'expression plus intense du gène *RbohD* codant une NADPH oxydase sont potentialisées par le BABA dans les suspensions cellulaires élicitées par les OG. *In planta*, le BABA potentialise également une production d' H_2O_2 en réponse à l'infection par l'oomycète *Plasmopara viticola*. L'utilisation d'un inhibiteur de NADPH oxydase abolit complètement cette production d' H_2O_2 et bloque partiellement la résistance induite par le BABA. Nous montrons donc que la potentialisation de la production d' H_2O_2 dépendante d'une NADPH oxydase contribue à l'établissement de la résistance induite par le BABA chez la vigne.

Une deuxième partie a permis d'appréhender les événements cellulaires impliqués dans la résistance des plantes en se focalisant sur le mutant *pad2* (phytoalexin déficient) d'*Arabidopsis thaliana*. Ce mutant présente une sensibilité accrue à différents pathogènes et contient un taux de glutathion de l'ordre de 20 % par rapport à l'écotype sauvage. Nous avons tout d'abord montré que le faible taux de glutathion dépendait d'une quantité réduite de la première enzyme de sa biosynthèse, la glutamate-cystéine ligase. Le glutathion étant impliqué dans la mise en place des réactions de défense, nous avons tenté de définir le lien entre la déficience en glutathion et la sensibilité de *pad2* aux pathogènes. Nous avons tout d'abord montré que *pad2* possédait un état redox du glutathion plus oxydé que le sauvage. Une analyse transcriptomique à l'état basal a révélé que la plupart des gènes différentiellement exprimés étaient réprimés chez *pad2*. Parmi ces gènes, certains codent des protéines impliquées dans les flux d'ions qui pourraient déréguler la dépolarisation membranaire. Nous avons ainsi confirmé que la dépolarisation de la membrane plasmique est amoindrie chez *pad2* en réponse aux OG. De plus, des événements en aval tels que la production d' H_2O_2 et la production de NO sont également plus faibles chez le mutant par rapport au sauvage. Cette absence de la production d' H_2O_2 a également été spécifiquement observée sur plantes *pad2* infectées par l'oomycète *Phytophthora brassicae*. Il en résulte un développement accru du pathogène corrélé à une absence de réponse hypersensible, une mort cellulaire localisée normalement observée dans le cas du sauvage résistant. En réponse aux OG ou à l'infection par *P. brassicae*, les analyses transcriptomiques font ressortir un fort enrichissement de gènes relatifs à la dégradation des protéines chez *pad2*. De manière globale, nos résultats suggèrent que la déficience en glutathion chez *pad2* pourrait profondément modifier le turn-over des protéines, perturbant ainsi la signalisation cellulaire et les réponses biologiques associées.

Mots-clés : signalisation cellulaire, stress biotique ; vigne, acide β -aminobutyrique, potentialisation ; *Arabidopsis thaliana*, glutathion, mutant phytoalexin déficient (*pad2*)

ABSTRACT

Alternative strategies are required to reduce pesticide input into the environment for effective and sustainable plant protection. One solution is the activation of plant basal resistance that relies on the application of resistance inducer molecules.

In the first part of this study, we analyzed the mode of action of β -aminobutyric acid (BABA), a non-protein amino acid, in the grapevine induced resistance. BABA confers a physiological state, called priming, during which plants are able to mobilize better and/or more rapidly defense responses to biotic or abiotic stress. Unlike oligogalacturonides (OG), we showed that BABA did not induce early signaling events in grapevine cells such as variations of cytosolic free calcium concentration, H_2O_2 and nitric oxide production, MAPkinase phosphorylation, nor the expression of defense-related genes. Among them, only H_2O_2 production and the expression of *RbohD* gene, which encodes a NADPH oxidase, are primed by BABA in OG-treated cells. Moreover, BABA-treated plants display a stronger accumulation of H_2O_2 in response to the oomycete *Plasmopara viticola*. Application of an NADPH oxidase inhibitor completely abolishes this H_2O_2 production and leads to a reduction of BABA-induced resistance against *P. viticola*. These data suggest that the priming of an NADPH oxidase-dependent H_2O_2 production contributes to BABA-induced resistance in grapevine.

The second part consisted to analyze molecular events involved in plant resistance by using the *pad2* (phytoalexin deficient) mutant of *Arabidopsis thaliana* which is susceptible to a broad range of pathogens. We showed that the glutathione depletion depends on the low amount of glutamate-cysteine ligase protein, the first enzyme involved in its biosynthesis. We studied molecular events, which are involved in defense mechanisms, to understand the impact of the glutathione content on *pad2* susceptibility. Our results show that the redox state of glutathione is more oxidized in *pad2* than in wild type Col-0. Since cellular redox state change is known to regulate gene expression, a basal transcriptome analysis has been performed in *pad2* and wild type plants. Interestingly, most of the identified genes in *pad2* are down-regulated, some of them encoding proteins involved in ion fluxes. As expected, the plasma membrane depolarization and events downstream like H_2O_2 and NO production are impaired in *pad2* in response to OG. During infection with *Phytophthora brassicae*, the lack of H_2O_2 production is concomitant with an absence of the hypersensitive response, a localized cell death observed in the resistant wild type. After OG treatment or *P. brassicae* infection, microarray analysis brings out genes related to protein machinery including degradation in *pad2*. Taken together, these data suggest that the depletion of glutathione has an impact on protein turn-over which disturbs cell signaling events and related biological responses.

Key words: cell signaling, biotic stress; grapevine, β -aminobutyric acid, priming ; *Arabidopsis thaliana*, glutathione, *pad2* (phytoalexin deficient) mutant

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier M. **Sylvio Gianinazzi** et Mme **Vivienne Gianinazzi-Pearson** de m'avoir accueillie dans l'UMR Plante-Microbe-Environnement ; **Alain Pugin** et **David Wendehenne** de m'avoir intégrée et accueillie dans votre équipe.

Je tiens à remercier les membres du Jury, **Mme Brigitte Mauch-Mani**, **M. Jean-Luc Montillet**, **M. James Dat** et **M. Daniel Wipf** d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis très reconnaissante de l'intérêt et du temps que vous consacrerez à la lecture de ce manuscrit.

Brigitte, un très grand merci d'avoir suivi la réalisation de ce travail depuis mon Master recherche ; pour ta disponibilité, tes conseils, tes explications (que de questions sur les oomycètes ...) et l'accueil très chaleureux que j'ai reçu dans votre laboratoire.

Je remercie **M. Ali Betaieb** pour ses conseils donnés lors de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de **François Bouteau** (Université de Jussieu) pour son accueil très sympathique et de m'avoir fait découvrir l'électrophysiologie.

Grâce à tous les membres de mon équipe, je garderai un très très bon souvenir de ces années passées à Dijon. Tout à commencé par un stage de découverte...

Alain, tes cours étaient tellement passionnants qu'ils m'ont donné l'envie d'explorer le monde de la biochimie. Je te remercie sincèrement pour ta générosité et d'avoir accepté d'encadrer ce travail avec **Benoît**.

Ben, ton accompagnement m'a permis de découvrir deux projets fascinants où j'ai pu comprendre que la Recherche est sans limite et qu'il reste encore tellement à découvrir. Je te remercie de m'avoir confié la réalisation de ce travail de recherche.

David, toi qui est le pilier de la recherche au sein de notre laboratoire. Merci infiniment pour tous tes encouragements, ta disponibilité et ton aide précieuse apportée tout au long de ma thèse.

Agnès, tous ces petits moments ressourçants avec toi. Reste comme tu es ! Merci !

Steph, Sylvain, Olivier, merci d'avoir répondu présents à tous mes questionnements et d'avoir pris le temps de m'apporter de très bons conseils, sans oublier votre humour ! ; **Marielle, Sophie, Marc, Angela**, merci pour votre accompagnement lors des enseignements ; **Marie-Claire, Xavier, Delphine, Annick, Siham et Annie**, qui ont participé de près ou de

loin à ce travail ; **Elisabeth et Nelly** pour un secrétariat inégalable (gentillesse et efficacité) ainsi que le secrétariat de l'UMR.

Je voudrais remercier toute l'**équipe pédagogique de l'IUVV et de la biochimie (Fac de Gabriel)** pour m'avoir confié tous ces cours très agréables à dispenser et pour tous les bons conseils.

Patrick, on a bien bossé, hein ! mots-clés : balcon, bueno, refaire le monde ! ; **Emilie** ravie de partager ce bureau avec toi et merci pour tous tes encouragements ! **Emilie 2** et **Lucie**, bienvenue !

Merci à toute l'équipe des « anciens doctorants » : **Parul**(ounette), tous ces délires mémorables ; **Jen**, Everybody's gonna love today ; **Adrien** et **Angélique**, mes associés du FJC ; **Sab, Mathilde, Elo et Cécile**, sans oublier **Jan** et **Leslie**.

Bon courage aux prochains docteurs : **Sumaira**, tous ces moments pendant les longues cinétiques et PCRq ! ; **Jérémy** ; **Magda** ; **Hamid** ; **Manu**, membre du comité de relecture ; **Agnès** et **Jani**.

Julia, Jérôme et Léo pour votre bonne humeur quotidienne !

Thomas, tu as apporté le soleil du sud avec toi. Impossible d'oublier ton énergie, ta joie de vivre, ton soutien (jusqu'à la fin !) et tous ces moments partagés avec toi ! A toi maintenant et bon courage !

Les deux mots qui résonnent tout au long de cette thèse sont **Dégling team** (quel nom !). Pour ces week ends de délires, de bonne humeur, de rituels ; un grand merci à tous de m'avoir permis de m'évader, de me distraire. **Ju** et **Grid**, grâce à votre punch, j'ai toujours retrouvé un moral d'acier. **Audrey** ma Fofolle, merci pour tous ces moments de folie !

Cette partie serait inachevée sans avoir une pensée sans fin pour toute ma famille.

Papy et **Solange**, un grand merci pour avoir été présents et de m'avoir toujours soutenue **Gisèle** et **Edouard**, toutes ces petites attentions qui redonnent à chaque fois le peps, Merci !

Merci à toutes les « **pièces rapportées** » et **pépés** et **mémés**. J'ai passé des moments inoubliables avec vous !

Sourette, Stéphane, Fabien et **Chloé**, merci d'apporter tout ce bonheur. **Céline**, merci pour tous tes encouragements !

Mes remerciements les plus forts s'adressent à **mes parents**. Comment vous dire merci pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir toujours soutenue, guidée et d'être simplement là pour chaque instant.

Enfin, **Lio** pour ta patience sans limite et ton soutien inégalable. Cette thèse ne serait pas sans toi. Merci pour tout.

A ma famille,

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	7
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1 Situation du sujet.....	9
2 Contexte bibliographique	11
2.1 Les réactions de défense des plantes : de la perception du pathogène à la résistance	11
2.1.1 La perception de l'agent pathogène	12
2.1.1.1 <i>La résistance basale, la PTI (PAMP-triggered immunity).....</i>	<i>13</i>
2.1.1.2 <i>La résistance race-spécifique, l'ETI (effector-triggered immunity)</i>	<i>15</i>
2.1.2 La transduction du signal au niveau cellulaire	17
2.1.2.1 <i>Les flux ioniques à travers la membrane plasmique</i>	<i>17</i>
2.1.2.2 <i>La production de NO</i>	<i>19</i>
2.1.2.3 <i>La production de FAO.....</i>	<i>20</i>
2.1.2.4 <i>La phosphorylation et déphosphorylation de protéines</i>	<i>21</i>
2.1.2.5 <i>La synthèse de phytohormones</i>	<i>22</i>
2.1.3 Le développement des réponses de défense	24
2.1.3.1 <i>La synthèse de composés antimicrobiens</i>	<i>24</i>
2.1.3.2 <i>La synthèse de protéines PR.....</i>	<i>25</i>
2.1.3.3 <i>Le renforcement de la paroi cellulaire</i>	<i>26</i>
2.1.3.4 <i>La réponse hypersensible</i>	<i>27</i>
2.2 La potentialisation des réactions de défense des plantes.....	29
2.2.1 Le phénomène de potentialisation.....	30
2.2.1.1 <i>Dans la résistance systémique acquise (RSA) induite par les pathogènes, le SA et des composés synthétiques</i>	<i>30</i>
2.2.1.2 <i>Dans la résistance systémique induite (RSI) par les microorganismes non pathogènes : les rhizobactéries et les mycorrhizes</i>	<i>31</i>
2.2.1.3 <i>Par les LPS et les exopolysaccharides (EPS) de bactéries</i>	<i>32</i>
2.2.1.4 <i>Par les herbivores et la blessure.....</i>	<i>32</i>

2.2.1.5 Par la laminarine sulfatée PS3	33
2.2.2 La potentialisation induite par le BABA.....	33
2.3 Le glutathion, une molécule ubiquitaire dans les processus cellulaires	35
2.3.1 La structure du glutathion et de ses homologues	36
2.3.2 La biosynthèse, régulation et dégradation du glutathion.....	36
2.3.2.1 La biosynthèse du glutathion	36
2.3.2.2 La régulation de sa biosynthèse.....	36
2.3.2.3 La dégradation du glutathion	37
2.3.3 La compartimentation cellulaire du glutathion et sa distribution <i>in planta</i>	38
2.3.4 Les rôles physiologiques du glutathion chez les plantes	39
2.3.4.1 L'implication du glutathion dans la détoxification des métaux lourds et des xénobiotiques.....	40
2.3.4.2 Rôle dans le développement et le cycle cellulaire.....	41
2.3.4.3 Rôle dans l'équilibre redox cellulaire	42
2.3.4.4 La protection contre le stress oxydant	43
2.3.4.5 L'implication dans la réponse adaptative aux stress biotiques ou abiotiques.....	45
2.3.5 Les mutants <i>gsh1</i> d' <i>A. thaliana</i> : <i>pad2</i> , <i>cad2</i> , <i>rax1</i> et <i>rml1</i>	46
3 Les objectifs du travail de thèse	49
MATERIELS ET METHODES	51
1 Matériels.....	51
1.1 Matériels biologiques relatifs à la vigne.....	51
1.1.1 Suspensions cellulaires	51
1.1.2 Plantes	51
1.1.3 Agent pathogène : <i>Plasmopara viticola</i>	52
1.2 Matériels biologiques relatifs à <i>A. thaliana</i>	52
1.2.1 Suspensions cellulaires	52
1.2.2 Plantes	53
1.2.3 Agents pathogènes	53
1.2.3.1 <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	53
1.2.3.2 <i>Phytophthora brassicae</i> souche <i>D</i>	53
1.3 Eliciteurs et potentialisateurs.....	54
1.4 Composés pharmacologiques	54
2 Méthodes	55
2.1 Traitement des suspensions cellulaires.....	55

2.2	Traitement des feuilles détachées ou disques foliaires.....	55
2.3	Inoculation des plantes par des pathogènes et observation du développement des pathogènes	56
2.3.1	Vigne – <i>P. viticola</i>	56
2.3.1.1	Inoculation des feuilles de vigne par <i>P. viticola</i>	56
2.3.1.2	Observation microscopique de <i>P. viticola</i> par coloration histochimique au bleu d'aniline.....	56
2.3.1.3	Tests de résistance des feuilles à <i>P. viticola</i>	56
2.3.1.4	Effet du BABA sur la viabilité <i>in vitro</i> et germination <i>in vivo</i> des zoospores de <i>P. viticola</i>	57
2.3.2	<i>A. thaliana</i> – <i>H. arabidopsidis</i>	57
2.3.2.1	Inoculation des plantes d' <i>A. thaliana</i> par <i>H. arabidopsidis</i>	57
2.3.2.2	Observation du développement du pathogène.....	57
2.3.3	<i>A. thaliana</i> – <i>P. brassicae</i>	57
2.3.3.1	Inoculation des plantes d' <i>A. thaliana</i> par <i>P. brassicae</i>	57
2.3.3.2	Observation du développement du pathogène.....	58
2.3.3.3	Observation de la réaction hypersensible	58
2.4	Variations de la concentration en calcium cytosolique libre sur suspensions cellulaires de vigne exprimant l'aequorine cytosolique	58
2.5	Variations du potentiel électrochimique de la membrane plasmique sur suspensions cellulaires	59
2.6	Analyse des protéines par immunodétection par western blotting.....	60
2.7	Mesure du NO intracellulaire	61
2.8	Etude de l'expression des gènes	62
2.8.1	PCR quantitative en temps réel	62
2.8.2	Etude transcriptomique	62
2.8.2.1	Préparation et hybridation des ARN sur les puces microarrays.....	62
2.8.2.2	Analyses statistiques des données	63
2.9	Mort cellulaire sur suspensions cellulaires.....	64
2.10	Production de FAO.....	65
2.10.1	Méthode par chimioluminescence sur suspensions cellulaires	65
2.10.2	Coloration au DAB sur tissus foliaires.....	65
2.11	Dosage de l'activité catalase totale et mesure de la demi-vie d'H ₂ O ₂ sur suspensions cellulaires	66
2.12	Dosage de l'activité peroxydase totale sur suspensions cellulaires	66

2.13 Imagerie par microscopie confocale à balayage laser et analyse ratiométrique de la fluorescence de la roGFP2.....	67
--	----

CHAPITRE I : MODE D’ACTION DE L’ACIDE BETA-AMINOBUTYRIQUE CHEZ LA VIGNE, UN INDUCTEUR DE RESISTANCE 68

1 Résumé de la publication 1 68

2 Publication 1 70

3 Résultats complémentaires 92

3.1 Le BABA n’élucide pas les événements précoces de signalisation dans des suspensions cellulaires de vigne quelle que soit sa concentration..... 92

3.1.1 Les variations de la concentration en Ca²⁺ cytosolique libre 92

3.1.2 La production de NO..... 92

3.2 Potentialisation de la production d’H₂O₂ par le BABA et étude de son implication dans la résistance induite chez *A. thaliana* 93

3.2.1 Le BABA potentialise la production d’H₂O₂ en réponse aux OG sur suspensions cellulaires d’*A. thaliana* 93

3.2.2 Implication des gènes *RbohD* et *RbohF* dans la résistance induite par le BABA chez *A. thaliana* à *H. arabidopsidis*..... 93

3.3 Le GABA est-il un bon contrôle négatif du BABA pour étudier la potentialisation ? 94

3.3.1 Le traitement par le GABA n’induit pas la résistance à *P. viticola* sur disques foliaires de vigne 94

3.3.2 Le GABA potentialise la production de NO en réponse aux OG dans les suspensions cellulaires de vigne..... 95

4 Discussion 96

4.1 Le traitement par pulvérisation des feuilles de vigne par le BABA permet une résistance à *P. viticola* 96

4.2 Le BABA n’exerce pas d’activité antimicrobienne directe sur *P. viticola* lors de la protection chez la vigne 97

4.3 Le BABA n’induit pas les événements précoces de signalisation et l’expression de gènes impliqués dans les réactions de défense chez la vigne 98

4.4 Le BABA potentialise la production d’H₂O₂ en réponse aux OG sur suspensions cellulaires ou à *P. viticola in planta* 100

4.5 Etude de la source de la production d’H₂O₂ potentialisée par le BABA 101

4.6 Etude de l’implication de la production d’H₂O₂ potentialisée dans la résistance induite par le BABA 103

5 Conclusion et Perspectives..... 105

CHAPITRE II : ETUDE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE AUX PATHOGENES DU MUTANT PAD2 D'ARABIDOPSIS DEFICIENT EN GLUTATHION	107
1 Résumé de la publication 2	107
2 Publication 2	109
3 Résultats complémentaires	133
3.1 Analyses de la séquence protéique de GSH1 : prédiction de structure tertiaire et des modifications post-traductionnelles chez le sauvage et les mutants <i>pad2</i> , <i>cad2</i> et <i>rax1</i> d' <i>A. thaliana</i>	133
3.1.1 Impact de la mutation de GSH1 sur le taux de glutathion : alignement de séquence primaire de GSH1 entre le sauvage, <i>pad2</i> , <i>cad2</i> et <i>rax1</i>	133
3.1.2 Prédiction de la structure tertiaire de GSH1 chez le sauvage, <i>pad2</i> , <i>cad2</i> et <i>rax1</i>	134
3.1.3 Prédiction de modifications post-traductionnelles de GSH1	134
3.1.3.1 Prédiction d'ubiquitinylation, de N-glycosylation et de O-glycosylation de GSH1	135
3.1.3.2 Prédiction de phosphorylation de GSH1	135
3.2 Résultats complémentaires à l'analyse transcriptomique en réponse aux OG et à <i>P. brassicae</i> chez <i>pad2</i>	136
3.2.1 Expression de gènes en réponse aux OG	136
3.2.2 Expression de gènes en réponse à l'infection par <i>P. brassicae</i>	137
4 Discussion	138
4.1 Etude de la protéine GSH1 pour comprendre le taux altéré de glutathion chez le mutant <i>pad2</i>	138
4.1.1 La mutation de GSH1 chez <i>pad2</i> ne modifie pas la structure tertiaire de la protéine prédite <i>in silico</i>	138
4.1.2 Le mutant <i>pad2</i> présente une faible quantité de la protéine GSH1 ; étude préliminaire de l'origine de cette altération	139
4.2 L'état redox du glutathion est altéré chez le mutant <i>pad2</i>	141
4.3 Impact de l'état redox du glutathion sur la transcription des gènes chez <i>pad2</i>	144
4.4 L'altération d'événements précoces de signalisation expliquerait l'absence de RH chez <i>pad2</i> en réponse à <i>P. brassicae</i>	147
4.5 La mutation du gène <i>GSH1</i> confère à <i>pad2</i> une sensibilité aux pathogènes <i>via</i> l'altération de la signalisation cellulaire	149
5 Conclusion et Perspectives	151

CONCLUSION GENERALE	154
ANNEXES	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	190

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

[Ca²⁺]_{cyt}	Concentration en calcium libre cytosolique	(i)GluR	Récepteur au glutamate (ionotropique)
ABA	Acide abscissique	γ-EC	γ-glutamyl-cystéine
Abs	Absorbance	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
ADN(c)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)	HPLC	Chromatographie liquide haute performance
APX	Ascorbate peroxydase	JA	Acide jasmonique
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)	jpi	Jours post-inoculation
avr	Avirulence	LOOH	Lipide peroxydé
BABA	Acide β-aminobutyrique	LOX	Lipoxygénase
BABA-IR	BABA-induced resistance	LPS	Lipopolysaccharide
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioate	LRR-(RK)	Leucine-rich repeat (receptor kinase)
cad2	<i>Cadmium sensitive mutant 2</i>	LZ-CC	Leucine-zipper/coil-coil domain
CAX	Cation exchanger	MAMP	Microbe-associated molecular pattern
CCX	Calcium cation exchanger	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
CDPK	Ca ²⁺ -dependent protein kinases	(M)DHA(R)	(Mono)déshydroascorbate (réductase)
Col-0	Columbia 0	MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium	MS	Murashige et Skoog
cv.	Cultivar	NBS	Nucleotide-binding site
Cy3	Cyanine 3	NO	Monoxyde d'azote
Cy5	Cyanine 5	NOS	NO synthase
DAB	3,3'-diaminobenzidine	NPR1	Non-expressor of pathogenesis-related genes 1
DAF-2DA	4,5-diaminofluorescéine diacétate	O₂⁻	Anion superoxyde
DAMP	Damage-associated molecular pattern	OG	Oligogalacturonates
DDG	2-désoxy-D-glucose	ONOO⁻	Peroxynitrite
DiBAC₄(3)	Bis(1,3-dibarbituric acid)-trimethine oxonol	pad	<i>Phytoalexin deficient</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde	PAL	Phenylalanine ammonia lyase
dnd1	<i>Defense, no death</i>	PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
DPI	Diphénylène iodonium	PCD	Mort cellulaire programmée
DTT	Dithiothréitol	PDF1.2	Plant defensin protein 1.2
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	PFC	Poids frais de cellules
EF1α	<i>Elongation factor 1α</i>	PLA2	Phospholipase A2
FAO	Formes actives de l'oxygène	PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride

PR	Pathogenesis-related	R-SO₃H	Acide sulfonique
PRR	Pattern recognition receptor	SA	Acide salicylique
PS3	Laminarine sulfatée	SAB	Sérum-albumine bovine
PTI	PAMP-triggered immunity	SDS	Sodium dodécylsulfate
pv.	Pathovar	SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
R	Gène de résistance	SIPK	Salicylic acid-induced protein kinase
<i>rax1</i>	<i>Regulator of APX2</i>	SOD	Superoxyde dismutase
Rboh	Respiratory burst oxydase homologue	SSC	Citrate de sodium
RH	Réponse hypersensible	STS	Stilbène synthase
RIN4	RPM1 interacting 4	TIR	Toll/interleukin-1 receptor
<i>rml1</i>	<i>Root meristemless 1</i>	TMV	Virus de la mosaïque du tabac
roGFP	GFP sensible à l'état redox	TNFα	Tumor necrosis factor
rpm	Rotation par minute	UBQ10	<i>Polyubiquitin</i>
RSA	Résistance systémique acquise	url	Unité relative de luminescence
RSI	Résistance systémique induite	VOC	Composés organiques volatils
R-SOH	Acide sulphénique	WIPK	Wound-induced protein kinase
R-SO₂H	Acide sulphinique		

<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>A. euteiches</i>	<i>Aphanomyces euteiches</i>	<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
<i>B. juncea</i>	<i>Brassica juncea</i>	<i>P. sojae</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
<i>B. lactucae</i>	<i>Bremia lactucae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>P. viticola</i>	<i>Plasmopara viticola</i>
<i>H. arabidopsidis</i>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>P. brassicae</i>	<i>Phytophthora brassicae</i>	<i>V. rupestris</i>	<i>Vitis rupestris</i>
<i>P. capsici</i>	<i>Phytophthora capsici</i>		

CONTEXTE
BIBLIOGRAPHIQUE

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1 SITUATION DU SUJET

Dans leur environnement, les plantes sont constamment sujettes à des variations climatiques ou à des agressions causées par d'autres organismes, pouvant nuire à leur bon développement. Elles ont développé, au cours de l'évolution, des stratégies efficaces et adaptées pour mieux répondre à ces stress biotiques ou abiotiques. En plus de structures physiologiques particulières qui protègent la plante de manière passive, la plante peut aussi réagir aux variations de son environnement en mettant en place des mécanismes cellulaires spécifiques.

Plus précisément, une première ligne de défense est formée par la cuticule d'une part, et par la paroi végétale d'autre part. La cuticule, constituée de cutine et de cires, recouvre la surface des organes aériens alors que la paroi pecto-cellulosique, composée de fibres de cellulose et de pectine, entoure chaque cellule végétale. Dans la plupart des cas, cette barrière physique préexistante, à l'origine de la résistance passive, est suffisante pour se protéger des variations climatiques et des attaques de microorganismes. Pourtant, cette barrière naturelle n'est pas sans faille et peut être contournée par certains microorganismes. Ainsi, de manière générale, la perception d'un agresseur conduit à la mise en place d'une cascade d'événements de signalisation cellulaire, qui déclenche des réponses spécifiques de défense afin de prémunir la plante contre des attaques ultérieures. Ce type de réponse est appelée résistance active.

Malgré l'efficacité des défenses induites suite à un stress biotique, la maladie est parfois observée et peut causer des pertes considérables de rendement, conduisant à des problèmes aussi bien économiques qu'humanitaires. Par exemple, au milieu du XIX^{ème} siècle, le phylloxéra, puceron originaire des Etats-Unis, provoqua une crise économique en détruisant le vignoble européen. A la même période, en Irlande, l'oomycète *Phytophthora infestans* fut à l'origine d'une épidémie de mildiou qui anéantit la production de pomme de terre, base alimentaire de la population, engendrant une importante famine. Pour minimiser les pertes engendrées par ces maladies, les exploitants ont recours aux produits phytosanitaires dont

l'utilisation accrue et massive n'est pas sans conséquence sur l'environnement et la santé de l'homme, et favorise l'apparition de souches pathogéniques résistantes.

Conscients de l'importance des problèmes observés, les autorités françaises ont proposé de nouvelles normes depuis 2007 avec la mise en place du Grenelle de l'Environnement, visant à diminuer de 50 % d'ici 2018 l'utilisation des pesticides et à supprimer les substances les plus toxiques. En parallèle, d'autres alternatives sont aujourd'hui envisagées pour réduire l'usage des produits phytosanitaires tout en assurant une résistance efficace des plantes contre les pathogènes. L'une d'entre elles est de produire des plantes résistantes par croisement ou transgénèse mais le manque de gènes de résistance caractérisés à ce jour limite l'utilisation de cette méthode. La lutte biologique permet également de combattre les pathogènes grâce à l'utilisation de microorganismes antagonistes mais son efficacité est plutôt prouvée contre les ravageurs et reste inférieure à celle des pesticides dans le cas des microorganismes. Enfin, la stimulation des défenses naturelles des plantes pour induire leur résistance semble être une stratégie de plus en plus intéressante puisque cette méthode se base sur l'utilisation de molécules, en remplacement ou en association à des pesticides.

Ces stimulateurs de défenses naturelles, appelés éliciteurs et potentialisateurs, activent respectivement de manière directe et indirecte les mécanismes de défense de la plante. Cependant, bien que leur efficacité ait été prouvée en laboratoire, le mode d'action de ces molécules au niveau cellulaire n'est pas complètement élucidé. Ainsi, l'étude de la résistance induite par des molécules élicitrices ou potentialisatrices sur des plantes modèles, ou d'intérêt agronomique, permet d'en comprendre les mécanismes pour mieux les utiliser. Depuis les années 1960, plusieurs études ont montré que l'acide β -aminobutyrique (BABA), un acide aminé non protéique et non synthétisé par les plantes, induisait une protection chez différentes espèces végétales contre plusieurs types de stress, aussi bien biotiques qu'abiotiques. Chez la vigne, cette molécule confère une résistance à différents agents pathogènes retrouvés au vignoble dont *Plasmopara viticola*, l'agent du mildiou.

Dans ce contexte, un des objectifs de ce travail de thèse a été de déterminer le mode d'action du BABA, éliciteur ou potentialisateur, dans la résistance induite chez la vigne. Ainsi, des approches biochimiques et pharmacologiques ont été utilisées sur suspensions cellulaires de vigne et/ou sur plante permettant d'identifier certains des mécanismes mis en jeu dans la résistance induite par le BABA.

En deuxième lieu et d'un point de vue plus général, l'utilisation d'interactions simplifiées entre plantes modèles et agents pathogènes permet de déterminer les acteurs

moléculaires mis en jeu dans chaque pathosystème. Ainsi, différents facteurs de virulence d'agents pathogènes ou mécanismes de résistance des plantes ont pu être caractérisés par une approche génétique. Le mutant *pad2* d'*Arabidopsis thaliana* a été identifié comme étant hypersensible à différents agents pathogènes tels que la bactérie *Pseudomonas syringae*, l'oomycète *Phytophthora brassicae* ou le champignon *Botrytis cinerea*. La mutation a été identifiée dans le gène codant la première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion et le mutant *pad2* est déficient en glutathion. Le glutathion, un tripeptide synthétisé par la plupart des organismes, est décrit comme une molécule clé intervenant dans un bon nombre de processus biologiques, notamment dans la mise en place des mécanismes de défense. Bien que les caractéristiques biochimiques du mutant *pad2* aient été décrites, la plupart des mécanismes moléculaires défailants et liés à la sensibilité du mutant restaient inconnus.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier les événements de signalisation cellulaires activés après élicitation ou infection par *P. brassicae* chez le mutant *pad2* d'*A. thaliana* afin d'essayer de comprendre l'origine des phénotypes de ce mutant.

A plus long terme, la connaissance des processus cellulaires mis en place lors de la résistance permettra de trouver et d'adapter de nouveaux traitements moins toxiques pour l'homme et l'environnement afin de diminuer l'utilisation de produits phytosanitaires dans les cultures de plantes d'intérêt agronomique.

2 CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Les réactions de défense des plantes : de la perception du pathogène à la résistance

L'interaction entre plantes et microorganismes résulte d'une fine coévolution aboutissant à une association entre deux organismes, appelée symbiose. Aujourd'hui, le terme « symbiose » est restreint à l'association bénéfique mutuelle entre les deux organismes. En fait, la notion d'interaction regroupe trois types de relation entre les deux partenaires : le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme. Les deux premières permettent à l'un et/ou à l'autre organisme de bénéficier de cette relation pour vivre sans nuire au développement de l'autre. Cependant dans certains cas, un seul des deux partenaires tire profit de la situation, aux dépens de l'autre. Ce mode de vie, appelé parasitisme, conduit alors les deux espèces à une coévolution compétitive où de nouveaux moyens de défense sont continuellement

sélectionnés chez l'hôte alors que le parasite évolue de façon à toujours pouvoir utiliser son hôte pour sa survie (Salvaudon *et al.*, 2008 ; Bergelson *et al.*, 2001).

Concernant l'hôte, les plantes ont développé des stratégies de défense leur permettant de lutter contre l'attaque et l'invasion de microorganismes tels que virus, bactéries, champignons, oomycètes ou bien d'insectes et de nématodes. Les plantes possèdent des barrières physico-chimiques naturelles souvent suffisantes pour se protéger des organismes potentiellement pathogènes. Ces barrières incluent des structures cellulaires telles que la paroi pecto-cellulosique et la cuticule qui empêchent la pénétration du microorganisme. Cette résistance passive est souvent accompagnée de composés antimicrobiens produits constitutivement par la plante : les phytoanticipines. Parfois, l'agresseur réussit à contourner cette première ligne de défense et déclenche des mécanismes de défense au niveau de la plante. Si les mécanismes de défense sont bloqués par l'agent pathogène, ou activés trop tard, le pathogène se développe, la maladie est observée et la plante est dite sensible. Ce schéma est qualifié d'interaction compatible. Néanmoins, dans la plupart des cas, la plante reconnaît l'agresseur et met en place rapidement des réactions de défense efficaces qui permettent aussi à la plante de se prémunir d'attaques ultérieures. Dans ce cas, l'interaction est dite incompatible et la plante résistante.

2.1.1 La perception de l'agent pathogène

Les plantes développent deux types de résistance en réponse aux pathogènes : la résistance basale et la résistance spécifique (Iriti & Faoro, 2007). Ces deux types de résistance définissent l'immunité innée chez les plantes (Jones & Dangl, 2006 ; Chisholm *et al.*, 2006). La résistance basale, ou non spécifique, peut être déclenchée lors d'interactions entre un grand nombre d'espèces végétales et de microorganismes, grâce à la perception de molécules de nature variée qui sont des signatures moléculaires d'agresseurs, appelées éliciteurs. Elles sont aussi regroupées sous le terme de PAMP (pour pathogen-associated molecular pattern) et sont reconnues par des récepteurs de la plante appelés PRRs (pour pattern-recognition receptors ; Zipfel, 2008). La résistance spécifique ou race-spécifique, quant à elle, est basée sur une interaction de type « gène pour gène » où seuls certains facteurs d'virulence, ou effecteurs, sont reconnus spécifiquement par un cultivar d'une espèce donnée possédant le gène de résistance correspondant (Flor, 1971).

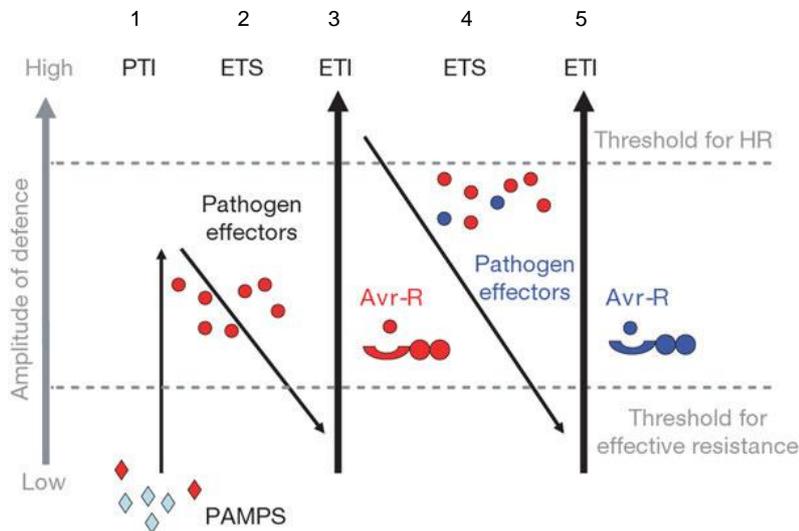


Figure 1. Modélisation de l'évolution du système immunitaire innée chez les plantes par pression de sélection exercée par les pathogènes. (1) La reconnaissance de PAMPs ou MAMPs (pathogen/microbe-associated molecular patterns) provenant de microorganismes par le récepteur de la plante de type PRR (pattern-recognition récepteur) conduit à la mise en place de la PTI (PAMP-triggered immunity). (2) Le pathogène contourne ces défenses en produisant des effecteurs qui vont interférer avec la PTI, conduisant à une ETS (effector-triggered susceptibility) chez la plante. (3) L'effeteur, produit de gène d'avirulence (*Avr*) est reconnu par un produit de gène de résistance (*R*) de la plante, activant l'ETI (effector-triggered immunity) qui est souvent accompagnée d'une réponse hypersensible (HR). (4) L'apparition de l'ETS résulte de la suppression de l'ETI par de nouveaux effecteurs non reconnus. (5) De nouvelles interactions Avr-R permettent la mise en place d'une nouvelle ETI chez la plante. D'après Jones & Dangl, 2006.

Ces deux types d'immunité ne sont pas opposés puisqu'il est désormais admis qu'ils s'inscrivent dans un processus d'évolution des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes (Figure 1). En effet, l'immunité basée sur la reconnaissance de PAMPs, appelée PTI (pour PAMP-triggered immunity), constitue un premier niveau de défense. Cependant, les pathogènes réussissent à contourner ces défenses en produisant des molécules effectrices interférant avec la PTI. La plante élabore alors un nouveau système de défense en produisant des protéines (codées par des gènes de résistance *R*) reconnaissant spécifiquement les effecteurs (codés par des gènes d'avirulence *avr* ; résistance race-spécifique). Cette nouvelle immunité ETI (pour effector-triggered immunity) pourra être de nouveau détournée par de nouveaux effecteurs que la plante devra reconnaître *via* la sélection de nouvelles protéines *R*.

2.1.1.1 La résistance basale, la PTI (PAMP-triggered immunity)

Bien que la stratégie de reconnaissance des pathogènes soit largement conservée entre insectes, mammifères et plantes (Nürnberger & Brunner, 2002 ; Nürnberger *et al.*, 2004), des différences existent au niveau de la perception du pathogène qui concernent soit les récepteurs soit les molécules reconnues (Zipfel & Felix, 2005).

Chez les plantes, les éliciteurs, dits généraux ou PAMP proviennent le plus souvent des structures du pathogène. Au regard de leur implication dans la survie des microorganismes, pathogènes ou non, les éliciteurs généraux sont désormais nommés MAMP pour microbe-associated molecular pattern (Mackey & McFall, 2006 ; Boller & Felix, 2009). Ils sont de natures très variées : (glyco)protéines, lipides ou oligosaccharides (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Boller & Felix, 2009).

Concernant les MAMPs de nature peptidique, les protéines complètes ou des motifs peptidiques conservés sont capables d'induire des réponses de défense chez les plantes. Parmi eux, Flg22, un peptide de 22 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de la flagelline bactérienne, fait partie des exemples les plus étudiés (Felix *et al.*, 1999). De même, deux peptides elf18 et elf26 correspondant à la partie N-terminale acétylée du facteur d'élongation EF-Tu d'*Escherichia coli*, induisent une résistance notamment chez *A. thaliana* (Kunze *et al.*, 2004). D'autres motifs peptidiques comme RNP-1 placé du côté N-terminal de protéines « cold-shock » chez les bactéries gram-positives et négatives provoquent une résistance chez les solanacées (Felix & Boller, 2003). Le peptide Pep13 d'une transglutaminase localisée au niveau de la paroi cellulaire est fortement conservé chez dix

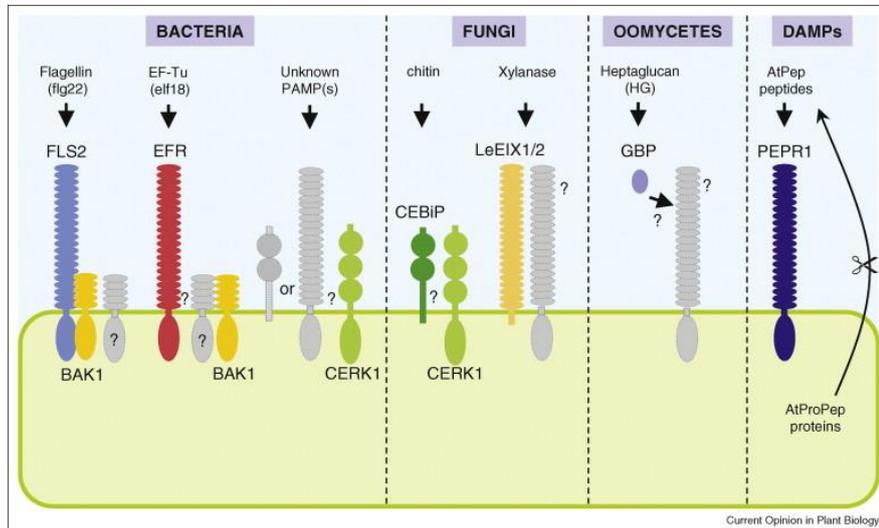


Figure 2. Récepteurs de type PRR (pattern recognition receptor) chez les plantes. Chez *A. thaliana*, la flagelline bactérienne (flg22) et le facteur d'élongation EF-Tu (elf18) sont reconnus respectivement par FLS2 et EFR, des récepteurs de type LRR-RK (leucine-rich repeat receptor-like kinase). Le site de haute affinité liant la chitine correspond à CEBIP (chitin-binding protein) chez le riz. La reconnaissance de la xylanase par LeEIX1/2 (ethylene-inducing xylanase) par un récepteur de type RLP (receptor-like protein) est observée chez la tomate, où seul LeEIX2 est capable d'induire la transduction du signal. Chez le soja, l'heptaglucane de l'oomycète est fixé par GBP (glucan-binding protein). Les peptides endogènes Pep chez *A. thaliana* sont reconnus par le récepteur de type LRR-RK PEPR1 (pep1 receptor). Les protéines BAK1 (brassinosteroid receptor1-associated kinase 1) et CERK1 seraient impliquées dans la signalisation pour la plupart des modèles. D'après Zipfel, 2009.

espèces de *Phytophthora* et présente des propriétés élicitrices chez le persil et la pomme de terre (Brunner *et al.*, 2002). Enfin, les élicitines, protéines fixant les stérols et sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora*, provoquent des réponses de défense incluant une mort cellulaire localisée et une résistance systémique acquise chez le tabac (Ricci *et al.*, 1989 ; Yu, 1995).

Des molécules lipidiques telles que l'acide arachidonique présent chez les oomycètes, ou l'ergostérol des champignons (ascomycètes et basidiomycètes) ont été décrites comme induisant des réponses de défense respectivement chez la pomme de terre, la tomate, le tabac et la vigne (Boller, 1995 ; Granado *et al.*, 1995 ; Lochman & Mikes, 2006 ; Laquittaine *et al.*, 2006). Enfin, les dérivés glucidiques comme des peptides de levure N-glycosylés, les peptidoglycanes, composés majeurs de la paroi des bactéries, sont aussi qualifiés de MAMP (Boller, 1995 ; Erbs *et al.*, 2008).

La plupart des éliciteurs sont sécrétés par les microorganismes ou proviennent de composés structuraux. Néanmoins, une nouvelle classe d'éliciteurs décrite par les immunologistes regroupe les produits issus de la dégradation des structures cellulaires de la plante ou du pathogène par des enzymes hydrolytiques produites par la plante ou le microorganisme. Ces éliciteurs endogènes sont qualifiés de DAMP (pour damage-associated molecular pattern ; Lotze *et al.*, 2007). Un exemple classique est celui des oligogalacturonates, un polymère d'acide α -1,4-galacturonique (OG ; Boller, 2005) issu de la dégradation de la paroi des cellules végétales. De nombreux travaux ont montré qu'ils étaient capables d'induire des réponses de défense chez les plantes comme la synthèse de phytoalexines, la production de formes actives de l'oxygène (FAO) et l'expression de gènes de défense chez différentes espèces comme le soja, le persil ou le tabac (Hahn *et al.*, 1981 ; Davis & Hahlbrock, 1987 ; Broekaert & Peumans, 1988). Chez *A. thaliana* ou la vigne, ils induisent une résistance contre le champignon *B. cinerea* en activant les mécanismes de défense (Ferrari *et al.*, 2007 ; Aziz *et al.*, 2004). De plus, des peptides éliciteurs produits par les plantes ont été découverts tels que la systémine chez la tomate ou AtPep1 chez *A. thaliana* (pour revue, Lotze *et al.*, 2007 ; Boller, 2005 ; Huffaker *et al.*, 2006).

La perception de ces éliciteurs généraux implique des récepteurs PRR localisés à la surface de la cellule (Nürnberger & Brunner, 2002; Figure 2). La majorité de ces récepteurs est regroupée dans la classe des LRR-RK (leucine-rich repeat receptor kinase), similaire aux Toll-like récepteurs retrouvés chez les animaux (Hayashi *et al.*, 2001). Deux exemples très étudiés sont FLS2 (flagellin sensing 2) et EFR (Elongation factor-Tu receptor) qui

reconnaissent respectivement la flagelline/flg22 et EF-Tu/elf18 chez *A. thaliana* (Gómez-Gómez & Boller, 2000 ; Zipfel *et al.*, 2006). Le peptide AtPep1, quant à lui, se fixe sur le récepteur PEPR1 (Pep1 receptor 1). Une autre classe nommée RLP (receptor-like protein) est représentée par LeEIX1 (ethylene-inducing xylanase) qui reconnaît la xylanase EIX1 chez la tomate (Ron & Avni, 2004). Enfin, des sites de haute affinité comme GBP (glucan-binding protein) et CeBIP (chitin-binding protein) participent à la fixation des oligosaccharides tels que l'heptaglucone de *Phytophthora sojae* et la chitine (polymère de β -1,4 N-acétylglucosamine) respectivement chez le soja et le riz (Kaku *et al.*, 2006). De plus, dans certains cas, d'autres molécules sont impliquées dans la reconnaissance des éliciteurs en ayant le rôle d'adaptateur de signalisation comme BAK1 (brassinosteroid receptor1-associated kinase 1 ; Zipfel, 2009).

Certaines études ont rapporté que la perception des PAMP par les PRRs pouvait conduire à une résistance induite contre divers pathogènes (Zipfel *et al.*, 2004 ; Hann & Rathjen, 2007). De plus, Lacombe *et al.* (2010) ont récemment montré que l'expression d'AtEFR chez la tomate et le tabac permet l'établissement d'une nouvelle réponse à EF-Tu (elf18) conférant une meilleure résistance aux bactéries.

2.1.1.2 La résistance race-spécifique, l'ETI (effector-triggered immunity)

Bien que la PTI soit le plus souvent suffisante pour engendrer une résistance de la plante, l'émergence de pathogènes ayant élaboré de nouvelles stratégies d'invasion a permis de supprimer ou contourner cette immunité *via* la production de molécules appelées effecteurs. Ces effecteurs sont des protéines codées par des gènes d'avirulence *avr* qui seront reconnues par les produits des gènes de résistance *R* de la plante. Ce modèle « gène pour gène » (Flor, 1971) provient de l'évolution des mécanismes de défense de la plante, présent dans le cas particulier d'une interaction entre un pathovar et un cultivar donnés (Dangl & Jones, 2001). Ce deuxième type de défense induite est appelé ETI (effector-triggered immunity).

Les effecteurs sont sécrétés par des pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les oomycètes (Chisholm *et al.*, 2006 ; Stergiopoulos & de Wit, 2009 ; Schornack *et al.*, 2009 ; Gohre & Robatzek, 2008) ; les mieux caractérisés proviennent de bactéries. Les bactéries pathogènes des animaux sont connues pour sécréter un nombre restreint d'effecteurs. Par contre, chez les plantes, les bactéries comme *P. syringae* sont capables de

Plant species	Plant R gene	Structure	Pathogen	Matching pathogen gene
Tomato	<i>Pto</i>		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPto</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPW8</i>		<i>Erysiphe</i> spp.	<i>Avr RPW8</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPM1</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>AvrRpm1</i> , <i>avrB</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPP8</i>		<i>Peronospora parasitica</i>	<i>AvrRpp8</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPS2</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrRpt2</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPS5</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPphB</i>
Potato	<i>Rx</i>		Potato virus X	Viral coat protein
Barley	<i>Mla6</i>		<i>Blumeria graminis</i>	<i>Avr-Ml6</i>
Rice	<i>Pi-ta</i>		<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>AvrPita</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPP5</i>		<i>P. parasitica</i>	<i>AvrRPP5</i>
<i>Arabidopsis</i>	<i>RPS4</i>		<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	<i>AvrRps4</i>
Flax	<i>L6</i>		<i>Melampsora lini</i>	<i>AvrL6</i>
Flax	<i>M</i>		<i>M. lini</i>	<i>AvrM</i>
Tobacco	<i>N</i>		Tobacco mosaic virus	Replicase
Tomato	<i>Cf-2</i>		<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr2</i>
Tomato	<i>Cf-4</i>		<i>C. fulvum</i>	<i>Avr4</i>
Tomato	<i>Cf-5</i>		<i>C. fulvum</i>	<i>Avr5</i>
Tomato	<i>Cf-9</i>		<i>C. fulvum</i>	<i>Avr9</i>
Rice	<i>Xa21</i>		<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>AvrXa21</i>

protein kinase domain; leucine-zipper/coil-coil domain; transmembrane region; nucleotide-binding site; toll/interleukin-1 receptor; leucine-rich repeat region.

Tableau I. Classification des gènes de résistance *R* et des gènes d'avirulence correspondants chez différentes espèces. D'après Nürnberger *et al.*, 2004.

sécréter approximativement 20 à 30 effecteurs pendant l'infection (Chang *et al.*, 2005). Les bactéries gram-négatives possèdent un système de sécrétion de type III (TTSS) qui injecte les effecteurs dans le cytoplasme de la plante hôte pour inhiber l'immunité de type PTI (Chisholm *et al.*, 2006).

L'analyse des produits des gènes de résistance *R* a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs motifs protéiques conservés chez les différentes espèces végétales (Dangl & Jones, 2001). Les séquences de type LRR, NBS (nucleotide-binding site) sont les plus fréquemment observées mais les protéines contiennent aussi des sites de type LZ-CC (leucine-zipper/coil-coil domain), TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ou des séquences transmembranaires bien que leur localisation soit majoritairement cytoplasmique (Tableau I). L'analyse du génome d'*A. thaliana* confirme que les gènes codant pour les protéines de type NBS-LRR sont divisés en deux groupes selon la région N-terminale de la protéine : CC-NBS-LRR et TIR-NBS-LRR (Meyers *et al.*, 2003).

Plusieurs modèles de reconnaissance des effecteurs par les protéines *R* ont été décrits chez différents pathosystèmes (Chisholm *et al.*, 2006 ; Jones & Dangl, 2006). Le premier présente une interaction directe entre l'effecteur et la protéine *R*, observée aussi bien avec les bactéries qu'avec les champignons et les oomycètes. Par exemple, chez la tomate, le facteur d'avirulence AvrPto issu de *P. syringae* est reconnu et se fixe directement sur la protéine Pto, qui enclenche des réponses de défense (Tang *et al.*, 1996). Il en est de même pour l'interaction entre l'effecteur Avr-Pita du champignon *Magnaporthe grisea* et la protéine Pi-ta du riz (Jia *et al.*, 2000). Cependant, dans de nombreux pathosystèmes, aucune interaction directe n'a été rapportée. Un modèle, dit modèle de garde, propose que l'effecteur interagisse avec une cible de virulence de l'hôte (Van der Biezen & Jones, 1998). Une protéine *R* de l'hôte reconnaît ensuite le complexe formé entre l'effecteur et sa protéine cible, ou la protéine cible modifiée suite à son interaction avec l'effecteur. Par exemple, l'effecteur AvrPphB de *P. syringae* clive la protéine kinase PBS1 d'*A. thaliana*, détectée par la suite par la protéine *R* RPS5 (Shao *et al.*, 2003). De la même manière, la protéine RIN4 (RPM1 interacting 4) est la cible de deux effecteurs de *P. syringae* : AvrRpt2 qui la clive, et AvrRpm1 qui la phosphoryle. La modification de cette protéine, dans les deux cas, est détectée respectivement par RPS2 et RPM1 de la plante, en formant un complexe avec RIN4 (Kim *et al.*, 2005).

2.1.2 La transduction du signal au niveau cellulaire

La perception de l'agent pathogène va conduire à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (Boller & Felix, 2009). Les événements de signalisation cellulaire précocement induits suite à la reconnaissance du microorganisme sont plus généralement étudiés *via* les éliciteurs et restent encore à détailler dans le cas des effecteurs (Zhao *et al.*, 2005 ; Hofius *et al.*, 2007). Parmi ces événements figurent des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique manifestées par des influx de Ca^{2+} , des efflux de K^+ et d'anions, en particulier de Cl^- ou NO_3^- (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Les flux calciques et anioniques déclenchent une dépolarisation de la membrane plasmique dont l'amplitude et la cinétique dépendent de la nature de l'éliciteur (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Ces flux d'ions peuvent agir en amont d'autres événements cellulaires, en particulier une production de monoxyde d'azote (NO) et de FAO, telles que O_2^- et H_2O_2 , ainsi qu'une cascade de phosphorylation impliquant des protéines kinases de type MAPK (mitogen-activated protein kinase) et des CDPK (Ca^{2+} -dependent protein kinases). La mobilisation de ces acteurs conduit à l'activation de facteurs de transcription concourant à une reprogrammation du transcriptome et ainsi à la mise en place de réponses de défense *via* l'expression des gènes appropriés. Ces mécanismes cellulaires sont observés dans différents modèles comme la perception de la flagelline par *A. thaliana* (Gómez-Gómez & Boller, 2002) ; l'élicitation du tabac par la cryptogéine (Garcia-Brugger *et al.*, 2006) ; les lipopolysaccharides, les sidérophores et les flagelles de *Pseudomonas putida* et *fluorescens* (Van Loon *et al.*, 2008) ; l'élicitation par les OG, la laminarine, un polymère de β -1,3-glucane, ou l'endopolygalacturonase 1 de *B. cinerea* (BcPG1) chez la vigne (Aziz *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2003 ; Vandelle *et al.*, 2006). La reconnaissance d'effecteurs (Avr4 et Avr9) du champignon *Cladosporium fulvum* par les protéines R (Cf-4 et Cf-9, respectivement) de la tomate conduise aussi à l'activation de ces événements (Stergiopoulos & de Wit, 2009).

2.1.2.1 Les flux ioniques à travers la membrane plasmique

Suite à la reconnaissance d'un éliciteur, les flux d'ions à travers la membrane plasmique sont parmi les événements les plus précoces puisqu'ils sont détectés dans les cinq premières minutes. De nombreux modèles rapportent un influx de Ca^{2+} , un échange de K^+/H^+ , un efflux de NO_3^- et de Cl^- en réponse à des éliciteurs chez les plantes comme le persil, le tabac ou *A. thaliana* (Nürnberger *et al.*, 1994 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002).

Parmi ces ions, le Ca^{2+} est considéré comme l'un des seconds messagers majeurs puisqu'il peut activer de nombreux événements dans la cellule végétale (Dodd *et al.*, 2010). Les éliciteurs tels que les MAMP mobilisent le Ca^{2+} provenant à la fois des pools extracellulaire (apoplaste) et intracellulaires comme la vacuole et le réticulum endoplasmique. En effet, des mesures de l'incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans la cellule ont permis de montrer un influx de Ca^{2+} suite à différents éliciteurs comme BcPG1 chez la vigne, Pep13 chez le persil ou les OG chez le tabac et la vigne (Poinssot *et al.*, 2003 ; Vandelle *et al.*, 2006 ; Nürnberger *et al.*, 2004 ; Mathieu *et al.*, 1991). De plus, plusieurs méthodes de mesure *in vivo* de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule ont rapporté que la concentration en Ca^{2+} cytosolique libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) variait de 50-100 nM à 1-5 μM en seulement 2 à 5 min après élicitation (Zhao *et al.*, 2005). Il est proposé que chaque éliciteur serait capable d'induire des variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans le cytosol qui lui seraient spécifiques, concept appelé « signature calcique » (Lecourieux *et al.*, 2005). Cette élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ serait préalable à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans d'autres compartiments cellulaires, en particulier le noyau (Lecourieux *et al.*, 2005). Concernant la nature des canaux/transporteurs de Ca^{2+} impliqués dans la mobilisation du Ca^{2+} dans la cellule, citons des pompes ATPases, des échangeurs $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, des canaux de type CNGC (cyclic nucleotide-gated channel), de type TPC (two pore channels) ou encore des récepteurs au glutamate (Dodd *et al.*, 2010).

L'implication de flux d'anions dans la signalisation cellulaire en réponse aux éliciteurs a été supportée essentiellement par des approches pharmacologiques et biochimiques (Zimmermann *et al.*, 1998 ; Jabs *et al.*, 1997). L'efflux d'anions, en particulier de Cl^- et NO_3^- , a été décrite comme un événement de signalisation précoce puisque observable dans les cinq premières minutes de traitement par un éliciteur, la cryptogéine (Wendehenne *et al.*, 2002 ; Pugin *et al.*, 1997). Dans les suspensions cellulaires de tabac, l'efflux de NO_3^- provoqué par la cryptogéine est responsable d'une perte de 60 % du contenu en NO_3^- de la cellule (Wendehenne *et al.*, 2002). De plus, il a été rapporté que l'influx de Ca^{2+} module cet efflux qui est fortement impliqué dans la dépolarisation de la membrane plasmique (Gauthier *et al.*, 2007). En retour, l'efflux de NO_3^- contrôlerait l'influx de Ca^{2+} en activant des canaux perméables au Ca^{2+} voltage-dépendants et, en conséquence, des événements Ca^{2+} -dépendants tels que la production de FAO. Concernant l'efflux de Cl^- , les réponses de défense de plusieurs plantes requièrent ce mouvement d'ions à travers la membrane plasmique (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Jabs *et al.*, 1997). De plus, des efflux de K^+ ont été également observés dans des suspensions de tabac en réponse à la cryptogéine et à d'autres éliciteurs (Pugin *et al.*, 1997).

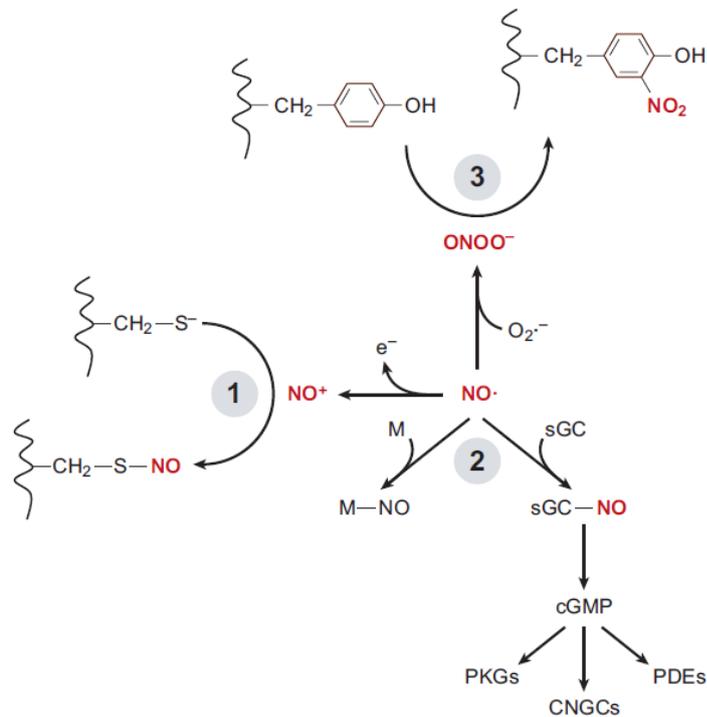


Figure 3. Modifications post-traductionnelles de protéines induites par le monoxyde d'azote (NO) chez les animaux. 1) La S-nitrosylation de résidus cystéines de protéines intervient par la liaison réversible entre le l'ion nitrosonium (NO⁺) et un groupement thiol, conduisant à la formation d'un S-nitrosothiol. 2) Le radical NO peut réagir avec les métaux de transition appartenant à des protéines, formant des métalloprotéines (M-NO). Par exemple, l'interaction réversible avec l'atome de fer héminique de la guanylate cyclase (sGC) catalyse la formation de GMPc qui se fixe sur les protéines kinases-GMPc dépendantes (PKGs), sur des canaux de type CNGC (cyclic nucleotide-gated channel) et sur des phosphodiésterases (PDEs). 3) Le NO peut réagir avec l'anion superoxyde O₂⁻ formant le peroxynitrite ONOO⁻. La tyrosine nitration de protéines est réalisée grâce à la fixation d'ONOO⁻ sur le carbone 3 du cycle aromatique d'une tyrosine formant des résidus 3-nitrosotyrosine. D'après Besson-Bard *et al.*, 2008.

2.1.2.2 *La production de NO*

Le NO est une espèce radicalaire gazeuse et diffusible qui est formée, chez les animaux, à partir de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par les NO synthases (NOS ; Stuehr *et al.*, 2004). Chez les plantes, aucune NOS n'a été identifiée jusqu'à maintenant bien que des activités enzymatiques similaires aient été mesurées. Par contre, il existe d'autres voies enzymatiques bien définies qui font intervenir une nitrate réductase, ayant comme substrat le nitrite, et les polyamines oxydases dont la voie de synthèse est dépendante de la L-arginine (Besson-Bard *et al.*, 2008). Chez les animaux, le NO est décrit comme médiateur impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la vasodilatation, la neurotransmission ou la réaction immunitaire. Chez les plantes, de nombreux processus physiologiques comme la germination, la croissance racinaire, la floraison, la fermeture stomatique, requièrent la production de cette molécule (Besson-Bard *et al.*, 2008). Grâce à sa nature radicalaire, le NO interagit avec un grand nombre de molécules comme les FAO mais est aussi responsable de modifications post-traductionnelles de protéines (Figure 3). Parmi ces modifications, la S-nitrosylation est la formation d'une liaison entre le cation nitrosonium NO^+ , issu de l'oxydation du NO, et le groupement thiol de résidus cystéines réduits de protéines. Le NO peut également réagir avec des métaux de transition appartenant aux groupements prosthétiques de métalloprotéines. Enfin, il peut réagir avec O_2^- pour former le peroxy-nitrite ONOO^- qui est impliqué dans le processus de tyrosine nitration de protéines cibles.

De nombreuses études ont rapporté une production de NO en réponse aux éliciteurs et à des microorganismes potentiellement pathogènes (Lamotte *et al.*, 2004). Cette production est régulée par des événements comme l'influx de Ca^{2+} et des événements de phosphorylation. Une fois produit, le NO contribue à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en mobilisant le Ca^{2+} provenant des pools internes, probablement *via* des événements de phosphorylation (Lamotte *et al.*, 2006). Une protéine kinase de la famille SnRK2 potentiellement impliquée dans ce processus a été identifiée chez le tabac (Wawer *et al.*, 2010). La possibilité que cette dernière constitue un médiateur du NO sur la mobilisation du Ca^{2+} n'a toutefois pas été démontrée. Outre la mobilisation du second messager Ca^{2+} , le NO produit dans le contexte de l'élicitation contribue à la synthèse de H_2O_2 dans certains modèles d'étude et module l'accumulation de transcrits codés par certains des gènes de défense, notamment ceux impliqués dans le métabolisme secondaire et/ou reliés au stress oxydatif (Grun *et al.*, 2006 ; Vandelle *et al.*, 2006).

2.1.2.3 La production de FAO

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le H_2O_2 sont les FAO majoritairement produites après reconnaissance d'un agresseur (Lamb & Dixon, 1997 ; Torres *et al.*, 2006). Ces FAO contribuent à limiter le développement du pathogène grâce à leur action toxique directe sur le pathogène, mais aussi en participant au renforcement de la paroi cellulaire et surtout par leur implication dans la cascade de signalisation cellulaire et le développement de la RH (Lamb & Dixon, 1997). Elles jouent ainsi un rôle important dans la résistance des plantes.

De nombreuses études focalisées sur l'identification de la source enzymatique majeure de la production d' H_2O_2 mobilisée dans les mécanismes de défense des plantes ont démontré l'implication d'une activité NADPH oxydase (Pugin *et al.*, 1997 ; Torres & Dangl, 2005 ; Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2002). Les NADPH oxydases ont été initialement décrites chez les mammifères comme des complexes régulant la mort du pathogène dans les neutrophiles (Lambeth, 2004). L'enzyme est localisée au niveau de la membrane plasmique et est composée de 2 sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox}. Son activation se fait par le recrutement à la membrane plasmique de plusieurs protéines, p47^{phox}, p67^{phox} et 2 petites protéines G, Rac et Rap1 (Lamb & Dixon, 1997). L'identification du gène codant la NADPH oxydase chez les plantes a révélé que la protéine correspondait à la sous-unité catalytique gp91^{phox}. Nommée Rboh (pour respiratory burst oxydase homologue), la NADPH oxydase est retrouvée chez un grand nombre d'espèces comme le riz, la tomate, la pomme de terre, le tabac ou *A. thaliana* (Torres & Dangl, 2005). Chez *A. thaliana*, 10 homologues Rboh (A à J) ont été identifiés dans le génome (Torres *et al.*, 1998 ; Sagi & Fluhr, 2006). La NADPH oxydase des plantes est composée de six domaines transmembranaires conservés, deux domaines de fixation respectifs au FAD et au NADPH (côté C-terminal) et 2 motifs EF-hands (côté N-terminal) qui lient le Ca^{2+} (Torres & Dangl, 2005 ; Sagi & Fluhr, 2006 ; Keller *et al.*, 1998). L'activité de la protéine est régulée directement par la fixation du Ca^{2+} mais aussi par phosphorylation au niveau du domaine N-terminal par une kinase de type CDPK (Kobayashi *et al.*, 2007).

D'un point de vue enzymatique, les NADPH oxydases de plante catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en $O_2^{\cdot-}$, les électrons étant issus de l'oxydation du NADPH. L' $O_2^{\cdot-}$ subit ensuite une dismutation catalysée par une superoxyde dismutase (SOD) apoplastique, formant ainsi l' H_2O_2 . De nombreux travaux montrent que, dans la plupart des cas, une production rapide et transitoire, appelée « burst oxydatif », est impliquée dans la signalisation cellulaire après élicitation. Sur suspensions cellulaires, le maximum de la production d' H_2O_2 est atteint après 10 à 30 min de traitement selon l'éliciteur (Simon-Plas *et*

al., 1997 ; Aziz *et al.*, 2003 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Van Loon *et al.*, 2008). Cette production de FAO est en lien étroit avec les autres événements cellulaires puisque des approches pharmacologiques montrent qu'elle est dépendante du Ca^{2+} , du NO, de la phosphorylation de protéines chez la vigne en réponse à BcPG1 et qu'elle module la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ chez le tabac en réponse à la cryptogéine (Vandelle *et al.*, 2006 ; Lecourieux *et al.*, 2002).

Plusieurs travaux montrent que l'expression des gènes *Rboh* est activée lors des réponses de défense mises en place par la plante, suite à l'attaque de pathogènes. En effet, les gènes *RbohD* et *RbohF* sont indispensables à l'accumulation de FAO et à la résistance lors d'interactions incompatibles avec *Hyaloperonospora arabidopsidis* ou la souche avirulente de *P. syringae* pv. *tomato* chez *A. thaliana* (Torres *et al.*, 2002). Chez d'autres espèces végétales comme le tabac, *RbohD* semble être une source majeure de FAO. Par exemple, dans les cellules de tabac la cryptogéine déclenche très rapidement une production de FAO catalysée par NtRbohD, cette production étant concomitante avec une accumulation des transcrits correspondant (Simon-Plas *et al.*, 2002).

2.1.2.4 La phosphorylation et déphosphorylation de protéines

En réponse à des éliciteurs chez différentes espèces, l'analyse du phosphoprotéome a mis en évidence l'implication d'événements de phosphorylation et de déphosphorylation de protéines qui interviennent précocement dans la cascade de signalisation (Nuhse *et al.*, 2007 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000). Par exemple, en réponse à la cryptogéine chez le tabac, des approches pharmacologiques ont permis de montrer que de nombreux événements de signalisation (alcalinisation du milieu extracellulaire, influx de Ca^{2+} , production de FAO), étaient régulés à la fois par des protéines kinases et des protéines phosphatases (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000).

Parmi les protéines kinases impliquées dans les cascades de signalisation associées aux défenses figurent les MAPK (Colcombet & Hirt, 2008 ; Pitzschke *et al.*, 2009). L'identification des MAPK chez différentes espèces a permis d'élaborer un arbre phylogénétique selon la structure de leurs domaines protéiques (MAPK group, 2002). Ces MAPK présentent toutes un motif conservé (TxY) qui est un site de phosphorylation de protéines kinases agissant en amont de la voie. En effet, elles participent à une cascade de phosphorylation retrouvée aussi bien chez les insectes, les mammifères que chez les plantes (Nürnberg *et al.*, 2004). Cette cascade implique généralement trois types de protéines kinases : les MAPK kinase kinases (MAPKKK), les MAPK kinases (MAPKK) et

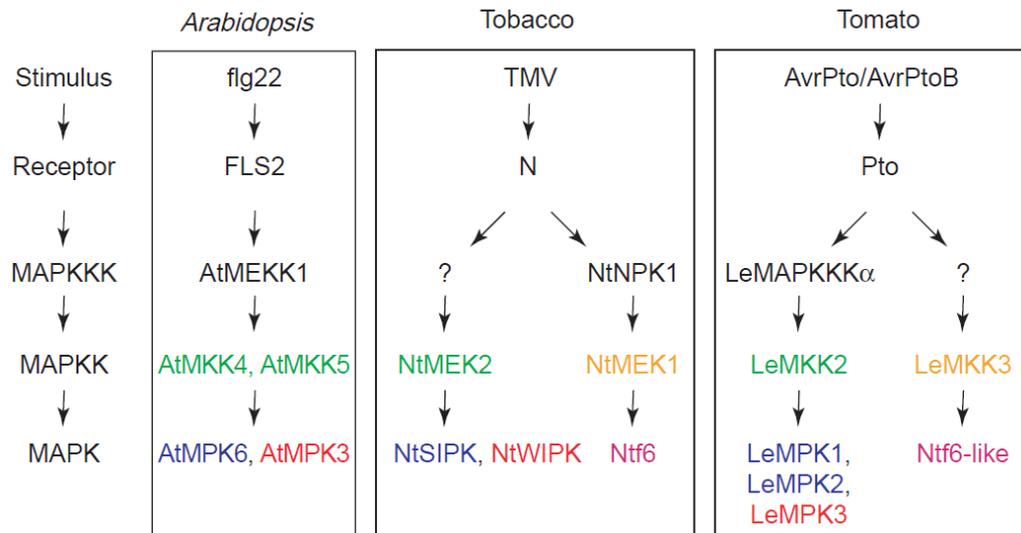


Figure 4. Cascades de MAPK identifiées chez *A. thaliana*, le tabac et la tomate impliquées dans la transduction du signal conduisant aux réponses de défense. La perception de la flagelline de bactérie par le récepteur FLS2 d'*A. thaliana* active une MAPKKK (AtMEKK1) activant par phosphorylation 2 MAPKKs, AtMKK4 et AtMKK5, qui phosphorylent à leur tour 2 MAPKs AtMPK3 et AtMPK6. Chez le tabac et la tomate, 2 voies parallèles ont été définies. Elles sont activées respectivement par l'interaction virus de la mosaïque du tabac (TMV)-récepteur N et AvrPto/AvrPtoB-récepteur Pto. Chez le tabac, la première voie implique séquentiellement NtNPK1, NtMEK1 et Ntf6. La deuxième est la cascade d'activation d'une MAPKKK inconnue, NtMEK2 et NtSIPK et NtWIPK. Concernant la tomate, une première voie est représentée par LeMAPKKK α , LeMKK2 et LeMPK1/2/3. Enfin, l'autre implique une MAPKKK inconnue, LeMKK3 et un homologue de Ntf6. La couleur identique représente une similarité entre les protéines. D'après Pedley & Martin, 2005.

les MAPK (Figure 4). En réponse à un stimulus, une MAPKKK active par phosphorylation une MAPKK, qui à son tour phosphoryle une MAPK qui devient active et transmet le signal (Rodriguez *et al.*, 2010). Cette cascade participe à l'activation de réponses de défense incluant l'expression de gènes codant des protéines de défense comme les PR (pathogenesis-related) et des protéines du métabolisme secondaire, ainsi que l'induction de la RH (Pedley & Martin, 2005). Par exemple, MPK4, MPK3 et MPK6 (MAPK d'*A. thaliana*) régulent l'expression du gène PAD3 dont l'enzyme est impliquée dans la synthèse des phytoalexines, des composés antimicrobiens (Qiu *et al.*, 2008 ; Ren *et al.*, 2008).

La cascade des MAPK est assez bien détaillée chez *A. thaliana* (Nürnberger & Scheel, 2001). En particulier, au moins 2 MAPK (MPK3 et MPK6) sont identifiées comme étant impliquées dans la signalisation du peptide flg22 et dans la régulation de la synthèse des phytoalexines en réponse à *B. cinerea* (Asai *et al.*, 2002 ; Ren *et al.*, 2008). En effet, après élicitation par la flagelline, leur activation provient de l'activation d'une première MAPKKK (MEKK1) qui à son tour phosphoryle MKK4 et MKK5 (MAPKK), responsables de l'activation de ces 2 MAPK. Des études ont aussi permis de mettre en évidence l'activation de deux MAPK chez le tabac en réponse au virus de la mosaïque du tabac (TMV), WIPK (wound-induced protein kinase) et SIPK (salicylic acid-induced protein kinase ; Zhang & Klessig, 1998). De la même manière, le traitement de suspensions cellulaires de tabac par la cryptogéine révèle la phosphorylation de ces 2 MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Dahan *et al.*, 2009). Enfin, chez la vigne, la phosphorylation des orthologues de deux MAPK a été observée en réponse à plusieurs éliciteurs dont BcPG1, les OG et la laminarine (Poinssot *et al.*, 2003 ; Vandelle *et al.*, 2006 ; Aziz *et al.*, 2003). Chez le tabac comme chez la vigne, le rôle de ces MAPK dans les réponses de défense n'a pas été appréhendé. Des arguments pharmacologiques suggèrent toutefois que SIPK et WIPK pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression de gènes de défense et de la HR déclenchées par la cryptogéine chez le tabac (Zhang & Klessig, 2001).

2.1.2.5 La synthèse de phytohormones

Les phytohormones sont des molécules indispensables à la régulation de processus biologiques comme la croissance, le développement, la reproduction, la survie mais aussi les mécanismes de défense des plantes. De nombreuses études ont permis d'identifier le rôle indispensable que jouent l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène dans les réponses de défense aux stress biotiques (Bari & Jones, 2009). Plus récemment,

l'implication d'autres phytohormones, initialement étudiées dans le développement et la croissance, tels que les auxines, l'acide gibbérellique, les cytokinines, les brassinostéroïdes ou l'acide abscissique (ABA), a été soulignée. Ces dernières semblent jouer un rôle clé dans les mécanismes de défense qui restent encore à éclaircir (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007 ; Pieterse *et al.*, 2009 ; Truman *et al.*, 2010).

Depuis une dizaine d'années, il est clairement établi que le système de défense des plantes est régulé par des voies de signalisation interconnectées dont la balance hormonale déterminera la spécificité de la réponse en fonction du microorganisme appliqué (Thomma *et al.*, 2001). C'est l'utilisation de mutants disponibles chez *A. thaliana* qui a permis d'établir ce lien entre la nature du stress et la (ou les) voie(s) dominant(es) dans la mise en place de la résistance des plantes. Ainsi, la résistance de type « gène pour gène », qui requiert souvent la RH, est associée à la voie de signalisation dépendante du SA. Elle est induite la plupart du temps par l'attaque de pathogènes biotrophes (Glazebrook, 2005). A l'inverse, les pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts, enclenchent plutôt les voies dépendantes du JA et de l'éthylène pour conduire à la résistance de la plante. De plus, seule la voie dépendante du JA est activée par le phénomène de blessure éventuellement exercée par des insectes herbivores (Wasternack *et al.*, 2006). Un grand nombre de mutants ou plantes transgéniques relatifs à chaque voie de défense ont ainsi été caractérisés. Les plantes transgéniques *nahG*, incapables d'accumuler le SA puisqu'elles expriment une hydroxylase bactérienne qui convertit le SA en catéchol, montrent une perte de résistance aux biotrophes tels que l'oomycète *H. arabidopsidis* (Thomma *et al.*, 1998). En accord avec ces données, le mutant *npr-1* (*nonexpressor of PR genes 1*), dont la voie de signalisation dépendante du SA est bloquée, présente le même phénotype. Par contre, le blocage de la voie du SA n'a aucun effet sur la réponse aux nécrotrophes tels que *Alternaria brassicicola* et *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1998). Concernant la voie dépendante du JA, Thomma *et al.* (1998) ont montré que la résistance du mutant *coi1* (*coronatine insensitive 1*) était diminuée en réponse aux nécrotrophes mais pas aux biotrophes. De la même manière, l'absence de la voie dépendante de l'éthylène, représentée par exemple par le mutant *ein2* (*ethylene insensitive 2*), provoque une diminution de la résistance aux nécrotrophes comme *B. cinerea* mais pas aux biotrophes tels que la souche virulente de *P. syringae* pv. *tomato* (Thomma *et al.*, 1999 ; Bent *et al.*, 1992). Ainsi, il est pour le moment accepté que les voies de résistance aux biotrophes et aux nécrotrophes, c'est-à-dire la voie dépendante du SA et la voie dépendante du JA/éthylène, exercent une action antagoniste l'une sur l'autre et que l'induction de l'une atténue l'autre (Kunkel & Brooks, 2002 ; Gutjahr & Paszkowski, 2009 ; De Vos *et al.*, 2005).

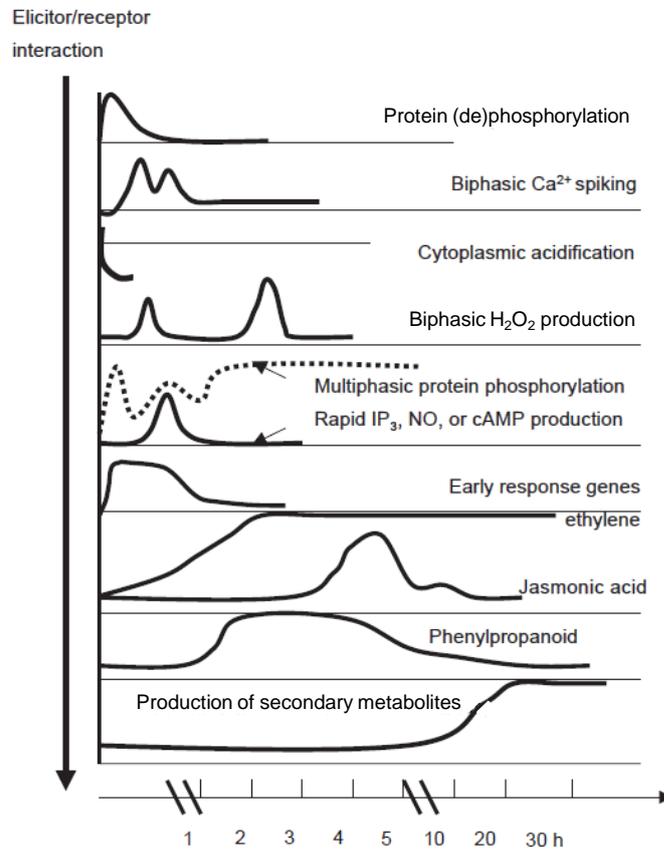


Figure 5. Schéma illustrant les événements séquentiellement déclenchés par les éliciteurs chez les plantes. La plupart des événements cellulaires activés par un éliciteur sont : la perception d'un éliciteur par un récepteur, des événements de (dé)phosphorylation de protéines cibles situées au niveau de la membrane plasmique, des flux d'ions à travers la membrane plasmique incluant le Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , NO^3^- , une acidification cytoplasmique, une cascade de (dé)phosphorylation de protéines cytosoliques, production d' H_2O_2 et de monoxyde d'azote (NO), l'expression de gènes de défense précoces, l'activation des voies dépendantes de l'éthylène et de l'acide jasmonique, l'expression de gènes de défense tardifs et l'accumulation de métabolites secondaires dépendante de la voie des phénylpropanoïdes. D'après Zhao *et al.*, 2005.

Ces trois voies de signalisation concourent à la régulation de l'expression de gènes de défense propres à chacune (Pieterse *et al.*, 2009). Ainsi, le gène marqueur de la voie dépendante du SA est le gène *PR-1* dont l'expression est activée par NPR1 (Lu, 2009). Les voies dépendantes du JA et de l'éthylène *in fine* conduisent toutes deux à l'expression du gène *PDF1.2* (plant defensin1.2) codant une défensine (Kazan & Manners, 2008 ; Guo & Ecker, 2004). Cependant, dans certains cas comme dans celui de la résistance induite systémique, les voies du JA et de l'éthylène requièrent la présence de NPR1 sans pour autant induire les gènes *PR* (pour revue, Van Loon *et al.*, 2006). De plus, l'activation du gène *VSP2* (vegetative storage protein2) est observée seulement dans le cas de la voie JA (Pieterse *et al.*, 2009).

2.1.3 Le développement des réponses de défense

La cascade de signalisation, établie après perception de l'agent pathogène, va engendrer une reprogrammation de l'expression de gènes, plus particulièrement des gènes de défense, afin de mettre en place des réponses de défense adaptées (Figure 5).

Les produits de ces gènes sont impliqués dans les processus de signalisation cellulaire, les voies de biosynthèse de composés antimicrobiens et de protéines PR, participent au renforcement de paroi mais aussi à la mise en place de la RH. Tous ces mécanismes enclenchés conduiront à la résistance de la plante.

2.1.3.1 La synthèse de composés antimicrobiens

Les métabolites secondaires, non essentiels aux processus métaboliques de base, sont des produits de faible masse moléculaire de nature chimique variée (terpénoïdes, dérivés d'acide aliphatique, phénoliques/phénylpropanoïdes, composés riches en soufre et/ou azote ; Dixon, 2001). Appartenant à diverses classes chimiques, les phytoalexines sont des composés antimicrobiens synthétisés par la plante en réponses à une infection ou à une élicitation (Hammerschmidt, 1999). La phytoalexine majoritaire d'*A. thaliana* est la camalexine. Elle appartient à la classe des composés riches en soufre et le précurseur de sa synthèse est le tryptophane (Rauhut & Glawischnig, 2009). Le rôle de la camalexine dans la résistance a été décrit grâce à l'utilisation de mutants d'*A. thaliana* déficients en camalexine (*pad*, phytoalexin deficient ; Glazebrook & Ausubel, 1994 ; Glazebrook *et al.*, 1997). Le gène *PAD3* code la dernière enzyme impliquée dans la biosynthèse de camalexine, un cytochrome P450 dont le mutant correspondant présente un taux indétectable de camalexine

(Nafisi *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 1999). Contrairement aux autres mutants (*pad1*, *pad2* et *pad4*), *pad3* reste résistant aux souches virulentes et avirulentes de *P. syringae* (Glazebrook & Ausubel, 1994). Par contre, ce mutant est sensible à d'autres pathogènes comme *A. brassicicola* et *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999 ; Ferrari *et al.*, 2003). De plus, la résistance induite par les OG à *B. cinerea* requiert PAD3 chez *A. thaliana* (Ferrari *et al.*, 2007).

Chez la vigne, la phytoalexine majoritaire est le trans-resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène) appartenant à la famille des stilbènes. Ces phytoalexines stilbéniques sont synthétisées par la voie phénylalanine/polymalonate où la phénylalanine est transformée en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia lyase (PAL ; Coutos-Thevenot *et al.*, 2001). Après formation d'une intermédiaire, la stilbène synthase (STS) catalyse la condensation du coumaroyl-coenzyme A avec trois molécules de malonyl-coenzyme A pour donner le resvératrol. Celui-ci peut subir différentes réactions pour former d'autres composés comme l' α/ϵ -viniférine, le picéide ou le ptérostilbène.

Les glucosinolates représentent une autre classe de métabolites secondaires riches en soufre, caractéristiques des Brassicacées. Ils jouent un rôle crucial dans la défense contre les herbivores en ayant un pouvoir toxique et de dissuasion (Rask *et al.*, 2000 ; Halkier & Gershenzon, 2006). Des études récentes montrent qu'ils sont aussi produits après une attaque de pathogènes et ont probablement une fonction antimicrobienne (Clay *et al.*, 2009). Récemment, Schlaeppli *et al.* (2010) ont montré que la voie de biosynthèse des glucosinolates est stimulée en réponse à *P. brassicae* et que les produits de l'hydrolyse des glucosinolates accompagnés de la camalexine sont importants pour établir une résistance contre ce pathogène.

2.1.3.2 La synthèse de protéines PR

Les protéines PR ont été découvertes pour la première fois dans le cas d'une infection de tabac par le TMV (Van Loon *et al.*, 2006). Depuis, leur rôle dans les réponses de défense à tous les types de pathogènes a été rapporté chez un grand nombre d'espèces végétales comme le tabac, le persil, l'orge ou *A. thaliana* (Van Loon *et al.*, 2006). Elles ont été classées en 17 familles sur la base de leurs propriétés biochimiques et biologiques. En effet, la plupart d'entre elles possèdent des propriétés antimicrobiennes *in vitro* à travers une activité hydrolytique de la paroi cellulaire de pathogène et/ou une toxicité vis-à-vis du pathogène. Par exemple, les β -1,3-glucanases (PR-2) et chitinases (PR-3, -4, -8 et -11) exercent leur fonction

en dégradant la paroi des champignons. La famille des PR-7 regroupe des endoprotéases. Les PR-12 (défensines), PR-13 (thionines) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14) ont à la fois des propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Les protéines des familles PR-1 et PR-5 (thaumatin-like protein) semblent agir plutôt contre les oomycètes et la famille des PR-10 (ribonuclease-like protein) serait plutôt impliquée dans la défense contre les virus. Les inhibiteurs de protéases (PR-6) aussi bien que les chitinases auraient pour cible les nématodes et insectes herbivores. PR-15 (oxalate oxidases) et PR-16 (oxalate oxidase-like protein) possèdent une activité superoxyde dismutase qui génère de l' H_2O_2 . Cependant, certaines semblent plutôt impliquées dans l'établissement de la résistance comme les PR-9 qui sont des peroxydases participant vraisemblablement au renforcement de la paroi cellulaire de la plante (Van Loon *et al.*, 2006).

La synthèse de la plupart des protéines PR est induite par les voies dépendantes du SA, JA et/ou de l'éthylène. Ainsi, ces protéines PR peuvent servir de marqueur de l'implication d'une des trois phytohormones. Par exemple, bien que son activité biologique reste inconnue, la protéine PR-1 est utilisée comme marqueur de la voie de défense SA-dépendante et de la résistance systémique acquise (RSA).

2.1.3.3 Le renforcement de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire, constituée de cellulose et de pectine, représente une première ligne de défense de la plante contre les agresseurs. Cependant, pour accéder aux nutriments de la plante, la plupart des pathogènes possèdent une batterie d'enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire, tels que des pectinases, cellulases et polygalacturonases. Dans l'interaction incompatible, la perception des produits de dégradation (DAMPs) permet à la plante de répondre par un dispositif de défense localisé notamment au niveau de l'apoplaste en inhibant les enzymes de dégradation du pathogène, grâce par exemple aux PGIP (polygalacturonase inhibiting protein), mais aussi par le renforcement de sa paroi cellulaire (De Lorenzo & Ferrari, 2002 ; Huckelhoven, 2007). Le renforcement de la paroi cellulaire résulte d'une réorganisation structurale et chimique grâce au dépôt de molécules nouvellement synthétisées comme la lignine et la callose, l'accumulation de composés phénoliques et le recrutement de protéines au niveau de la paroi cellulaire. Les FAO sont fortement impliquées dans ce renforcement pariétal, en particulier en favorisant des réactions de pontage entre des protéines pariétales riches en résidus proline et tyrosine et en promouvant la polymérisation des alcools cinnamoyls conduisant à la lignification des parois cellulaires (Huckelhoven, 2007). Cette

lignification confère à la paroi une meilleure résistance à la pression mécanique exercée par exemple pendant la pénétration de l'appressorium du champignon (Bechinger *et al.*, 1999). Le dépôt de callose, polymère de β -1,3 glucane, est souvent observé à proximité du point d'attaque du pathogène, notamment des haustoria. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la callose dans la défense de plusieurs espèces de plantes à différents pathogènes, traitées ou non par des inducteurs de résistance (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Trouvelot *et al.*, 2008 ; Ahn *et al.*, 2007 ; Zimmerli *et al.*, 2000).

2.1.3.4 La réponse hypersensible

La RH est une réponse de défense caractéristique qui est considérée par certains auteurs comme l'étape finale du processus de mise en place de la résistance (Mur *et al.*, 2008). Elle apparaît dans de nombreuses interactions plante-pathogène et est souvent associée à la résistance de type race-spécifique mais peut également être déclenchée par des éliciteurs généraux (Jones & Dangl, 2006 ; Heath, 2000). La RH est définie comme une mort cellulaire localisée au niveau du site d'infection du pathogène, qui entraîne l'apparition de lésions nécrotiques. Plutôt observée dans les réponses de défense aux biotrophes, cette résistance locale limite le développement du pathogène en réduisant l'accès aux nutriments (Dangl *et al.*, 1996 ; Greenberg & Yao, 2004). A l'inverse, Govrin & Levine (2000) ont montré que la RH n'empêchait pas mais facilitait le développement du champignon nécrotrophe *B. cinerea*, qui se nourrit exclusivement de tissus morts.

De nombreux auteurs ont tout d'abord qualifié la RH de mort cellulaire programmée (PCD) similaire à l'apoptose chez les animaux (Greenberg & Yao, 2004). En effet, plusieurs processus cellulaires de la RH sont communs à l'apoptose tels que la rétraction du cytoplasme, la condensation de la chromatine, le relargage du cytochrome c de la mitochondrie ou l'implication de protéases à cystéine (Mur *et al.*, 2008). Cependant, de nombreux travaux montrent désormais que la RH est considérée comme une forme bien distincte de PCD (Mur *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes qui gouvernent la RH ne soient pas encore complètement élucidés, une comparaison avec les événements de signalisation de mort cellulaire observés chez les animaux peut être établie (Lam *et al.*, 2001). Ainsi, chez les plantes, la transduction du signal de la PCD débute par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et $[Ca^{2+}]_{nucléaire}$ et le noyau, observée par exemple durant la mort cellulaire déclenchée par la cryptogéine chez le tabac (Ma & Berkowitz, 2007 ; Lecourieux *et al.*, 2006). Le lien entre la RH et le transport de calcium dans la cellule a été observé chez le mutant *dnd1*

(defense, no death) d'*A. thaliana* qui est incapable d'induire une RH en réponse à des pathogènes avirulents, puisque le gène muté code CNGC2 (cyclic nucleotide-gated channel), un canal non sélectif perméable aux cations (Clough *et al.*, 2000). Plusieurs études ont montré que la variation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ précédait une production de FAO puisque, par exemple, un inhibiteur de canaux calciques, le lanthane, engendre une inhibition de la production de FAO et l'établissement de la RH après infection par une souche avirulente de *P. syringae* (Grant *et al.*, 2000). La génération d'anion superoxyde et l'accumulation d' H_2O_2 ont été rapportées durant les premières étapes de l'établissement de la RH après infection par des pathogènes avirulents (bactérie, champignon, virus ; Lamb & Dixon, 1997). Les FAO, associées au NO, jouent un rôle important dans l'orchestration de la RH (Levine *et al.*, 1994 ; Zaninotto *et al.*, 2006). En effet, une régulation fine de la balance FAO/NO est nécessaire pour initier la mort cellulaire, sachant que le NO seul est incapable d'induire la RH (Delledonne *et al.*, 2001 ; De Pinto *et al.*, 2002). De plus, le peroxy-nitrite $ONOO^-$, produit de la réaction entre le NO et O_2^- , est capable d'induire l'apoptose ou la nécrose chez les animaux mais n'a aucun effet chez les plantes (Bonfoco *et al.*, 1995). Ces données ne sont toutefois pas généralisables puisque d'une part, ni le NO, ni l' H_2O_2 ne semblent jouer un rôle central dans la RH ou la mort cellulaire déclenchée par certains micro-organismes ou éliciteurs (Binet *et al.*, 2001), d'autre part le peroxy-nitrite semble être un événement essentiel au développement de la RH en réponse à *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Alamillo & Garcia-Olmedo, 2001).

De plus, les FAO jouent un rôle important dans l'établissement de la RH *via* la peroxydation des lipides qui perturbe des membranes (Mur *et al.*, 2008). En effet, le radical $\cdot OH$ est capable d'arracher un électron aux phospholipides pour former des radicaux libres de lipides qui sont intégrés dans une réaction en chaîne aboutissant à la formation de lipides peroxydés (LOOH). En plus de la voie dépendante des FAO, une voie enzymatique dépendante des lipoxgénases (LOX) est sollicitée dans la formation de LOOH. Afin de distinguer le processus de peroxydation des lipides (FAO ou LOX-dépendant), une technique HPLC a été développée (straight and chiral phase high-performance liquid chromatography ; Montillet *et al.*, 2004). En effet, seuls les dérivés d'acides gras insaturés C16:3 et C18:3, respectivement les 7 ou 11-LOOH et les 9 ou 13-LOOH sont observés dans la peroxydation LOX-dépendante (Mur *et al.*, 2008). De plus, cette spécificité de peroxydation des lipides est dépendante des conditions environnementales lors de l'établissement de la RH en réponse à un pathogène. Par exemple, en réponse à *P. syringae* pv. *syringae* chez le tabac, les lipides FAO-dépendants prédominent sur les lipides dérivés d'activité LOX à la lumière alors que seule l'accumulation de 9-LOOH LOX-dépendant est observée à l'obscurité

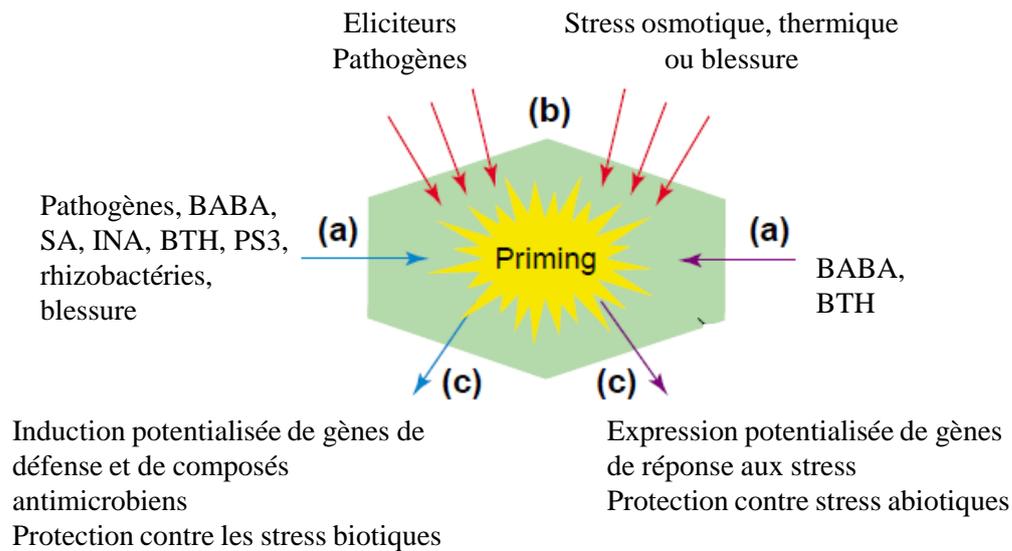


Figure 6. Principe de protection des plantes contre différents stress par potentialisation des réponses de défense. L'application préalable d'agents de potentialisation permet à la plante de développer une réponse de défense accrue après un stress de type biotique ou abiotique, conduisant à la résistance. (a) Traitement ou inoculation préalable de la plante par des agents de potentialisation tels que BABA : acide β -aminobutyrique, BTH : benzothiadiazole, INA : acide dichloroisonicotinique, SA : acide salicylique, PS3 : laminarine sulfatée, pathogènes, rhizobactéries, blessure. (b) Exposition à un stress biotique ou abiotique. (c) Réponses de défense potentialisées conduisant à la protection de la plante contre le stress appliqué. Adaptée de Conrath *et al.* (2002).

(Montillet *et al.*, 2005). Enfin, la peroxydation des lipides dépendante d'activité LOX semble être un des processus caractéristiques de l'établissement de la RH.

2.2 La potentialisation des réactions de défense des plantes

Au delà de la reconnaissance de l'agent pathogène, la résistance de la plante dépend aussi de la rapidité et de l'intensité de la mise en place des mécanismes de défense. L'accélération et le renforcement des réponses de défense basales confèrent alors à la plante une résistance accrue aux stress biotiques. L'état physiologique dans lequel les plantes sont capables de mobiliser les réponses de défense plus rapidement et/ou plus intensément est appelé « potentialisation » ou « priming », par analogie avec un phénomène existant chez les monocytes et macrophages. Lors de ce processus, l'application d'un premier stress permet aux cellules de répondre plus rapidement et plus intensément à un second stress, qu'il soit de nature identique ou non au premier stress appliqué. Par exemple, la reconnaissance d'un lipopolysaccharide (LPS) bactérien par les monocytes et macrophages conduit à la production de cytokines dont l'interféron γ . Cette protéine va jouer un rôle important dans la signalisation de défense puisqu'elle va conférer aux cellules la capacité accrue à répondre à de faibles doses de LPS lors d'une seconde exposition (Hayes *et al.*, 1991).

Chez les plantes, dans le processus de potentialisation l'état de pré-activation conféré par un premier stress ne peut être mis en évidence qu'après l'application du second stress et se manifeste par exemple par la transcription plus rapide et/ou plus intense de gènes de défense ou par la résistance induite (Figure 6 ; Conrath *et al.*, 2002). La potentialisation des réactions de défense peut être induite par des pathogènes (Sticher *et al.*, 1997), par des organismes bénéfiques tels que les rhizobactéries (Pieterse *et al.*, 1996) ou les mycorrhizes (Pozo *et al.*, 2002), par les herbivores ou la blessure (Ton *et al.*, 2007 ; Chassot *et al.*, 2008), par un spectre de composés naturels ou synthétiques comme les LPS (Newman *et al.*, 2002), le SA (Mauch-Mani & Métraux, 1998), l'acide β -aminobutyrique (BABA ; Zimmerli *et al.*, 2000) ou la laminarine sulfatée PS3 (Trouvelot *et al.*, 2008).

Bien que les mécanismes et les bases génétiques de la potentialisation restent majoritairement inconnus, il a été proposé que la sensibilisation de la plante par un potentialisateur puisse être associée à une accumulation de protéines sous forme inactives. Puis, sous un stress biotique ou abiotique, ces protéines seraient activées, amplifiant ainsi la

transduction du signal conduisant à une induction des réponses de défense plus rapides et/ou plus intense.

2.2.1 Le phénomène de potentialisation

2.2.1.1 Dans la résistance systémique acquise (RSA) induite par les pathogènes, le SA et des composés synthétiques

La RSA est une forme de résistance mise en place après l'attaque de pathogènes avirulents et qui se propage dans la plante entière par l'intermédiaire du système vasculaire (Sticher *et al.*, 1997). Cette protection, qui peut durer plusieurs semaines, va permettre à la plante de se prémunir contre l'attaque ultérieure d'un large spectre de pathogènes. De nombreux travaux ont montré que l'établissement de la RSA impliquait la voie dépendante du SA, ce dernier s'accumulant au niveau du point d'infection mais également dans les tissus non infectés (Durrant & Dong, 2004). De plus, l'expression de gènes codant des protéines PR, marqueurs de la voie du SA, est observée lors de la RSA (Durrant & Dong, 2004).

Le phénomène de potentialisation a été décrit grâce à l'utilisation d'une concentration faible en SA dans des suspensions cellulaires de persil traitées par l'éliciteur *Pmg* issu de la paroi de *P. sojae* (Thulke & Conrath, 1998). En réponse à cet éliciteur, les cellules prétraitées par le SA présentent une accumulation des transcrits de gènes de défense tels que *PAL* et *PR-10* plus rapide que les cellules non prétraitées. De la même manière, dans des suspensions cellulaires de persil élicitées par *Pmg*, le prétraitement par le composé synthétique inducteur de RSA, l'ester méthylé de l'acide benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothiate (BTH), se traduit par une expression plus précoce du gène *PAL* et une augmentation de la production de phytoalexines (Katz *et al.*, 1998). Depuis, la potentialisation dans la RSA a été observée chez différentes espèces végétales. Par exemple, le traitement préalable de plantes d'*A. thaliana* par le BTH potentialise l'expression du gène *PAL* en réponse à l'infection par *P. syringae* pv. *tomato* (Conrath *et al.*, 2001). Chez *A. thaliana*, il a été montré que l'accumulation de transcrits et des enzymes inactives MPK3 et MPK6 est induite par le BTH (Beckers *et al.*, 2009). Après exposition à différents stress, l'activité de ces enzymes est fortement induite dans les plantes prétraitées par le BTH. Ceci démontre que la potentialisation peut passer par une accumulation de protéines inactives induite par le potentialisateur, qui seront activées seulement après l'exposition à un stress.

2.2.1.2 Dans la résistance systémique induite (RSI) par les microorganismes non pathogènes : les rhizobactéries et les mycorrhizes

Parmi les bactéries de la rhizosphère, certaines rhizobactéries, appelées PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria), sont capables de stimuler la croissance de la plante et d'améliorer sa résistance vis-à-vis de nombreux stress (Van Loon *et al.*, 1998). En effet, elles confèrent une RSI à la plante lors d'attaque par des pathogènes. Pieterse *et al.* (1996) ont montré que la RSI empruntait une voie de signalisation différente de la RSA, puisque la résistance d'*A. thaliana* au pathogène *P. syringae* pv. *tomato* via la colonisation des racines par la bactérie non pathogène *P. fluorescens* n'est pas associée à l'activation de l'expression de gènes *PR*, marqueurs de la voie dépendante du SA. L'utilisation de mutants des voies dépendantes du JA, d'éthylène et de NPR1 (respectivement *jar1*, *etr1* et *npr1*) a montré que la RSI suit la voie de signalisation dépendante du JA et de l'éthylène et requiert NPR1 pour activer les réponses de défense (Pieterse *et al.*, 1998). Depuis, d'autres études ont confirmé que les voies du JA et de l'éthylène étaient considérées comme les voies régulatrices de l'établissement de la RSI (Van der Ent *et al.*, 2009). L'établissement de la RSI requiert le phénomène de potentialisation. En effet, l'analyse du transcriptome d'*A. thaliana* colonisée par *P. fluorescens* montrent un changement considérable de l'expression de gènes considérable au niveau des racines (dont la majorité est relative à la défense et à la régulation de la transcription) alors qu'aucune modification notable du génome n'est observée dans les autres organes (Verhagen *et al.*, 2004). Par contre, durant la RSI établie vis-à-vis du pathogène *P. syringae* pv. *tomato*, une augmentation de l'expression de 81 gènes, dont la plupart sont relatifs aux voies du JA et de l'éthylène, est observée dans les feuilles des plantes préalablement exposées à *P. fluorescens*, montrant que les plantes potentialisées sont capables de mobiliser les réponses de défense plus rapidement et/ou plus intensément suite à l'attaque de pathogènes.

La RSI est également observée dans le cas de plantes colonisées par des mycorrhizes (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007). Par exemple, l'association de mycorrhizes tels que *Glomus mosseae* aux racines de tomate confère une résistance systémique au pathogène *P. parasitica* associée à l'accumulation significative de protéines *PR*, non observée dans les plantes non mycorrhizées (Pozo *et al.*, 2002). La potentialisation dans la RSI est également mise en évidence par des dépôts de callose et de pectine observés au niveau du point d'attaque du pathogène seulement dans les plantes colonisées par les mycorrhizes (Cordier *et al.*, 1998).

2.2.1.3 Par les LPS et les exopolysaccharides (EPS) de bactéries

Certains composés, issus de la membrane externe des bactéries Gram-négatives comme les LPS ou sécrétés pendant la croissance bactérienne comme les EPS, ont été classés parmi les potentialisateurs des réponses de défense chez les plantes. Par exemple, les LPS qui n'ont qu'une faible activité directe sur l'induction de gènes de défense chez les plantes, confèrent au poivron (*Capsicum annuum*) une résistance vis-à-vis de la bactérie *Xanthomonas axonopodis* et *campestris* via la potentialisation d'une production accrue de conjugués phénoliques et de l'expression de gènes codant les protéines PR, en particulier la β -1,3-glucanase (Newman *et al.*, 2002). Ortmann *et al.* (2006) ont montré que les EPS d'*Enterobacter agglomerans* exerçaient à la fois un rôle d'éliciteur et de potentialisateur selon les espèces végétales. Ils induisent directement la production de FAO sur suspensions cellulaires de tabac et de persil mais exercent aussi l'action de potentialisateur en augmentant fortement le burst oxydatif en réponse à un éliciteur, la chitine.

2.2.1.4 Par les herbivores et la blessure

Les plantes exposées à l'attaque d'insectes herbivores déploient des mécanismes de défense mobilisant une signalisation systémique basée sur la voie dépendante du JA qui va altérer le développement de l'herbivore (Schilmiller & Howe, 2005). Des études récentes ont montré que la production de composés organiques volatils (VOC ; alcools, esters, composés terpénoïques) était impliquée dans la potentialisation des défenses basée sur la communication entre plantes voisines (Engelberth *et al.*, 2004 ; Pare & Tumlinson, 1999 ; Ferry *et al.*, 2004). En effet, l'exposition d'une plante de maïs saine aux VOC produits par une plante blessée par le ver du cotonnier conduit à la potentialisation de l'expression de gènes de défense qui est corrélée à une diminution du développement de la larve et à une augmentation de l'attraction de son parasite, la guêpe *Cotesia marginiventris* (Ton *et al.*, 2007). Il a également été montré que la consommation ultérieure de feuilles d'*A. thaliana* par la larve de la piéride de la rave (*Pieris rapae*) confère à la plante une résistance locale à *P. syringae* pv. *tomato* et *X. campestris* (De Vos *et al.*, 2006). Cependant, la blessure seule ne suffit pas à induire une résistance systémique au virus TCV (*Turnip crinkle virus*) mais les régurgitas de l'herbivore semblent être indispensables pour empêcher le développement du pathogène.

Un autre mode de potentialisation observé chez *A. thaliana* et la tomate est la blessure mécanique. En effet, chez *A. thaliana*, une blessure induite par un pincement sur la feuille limite le développement de *B. cinerea* qui est accompagné d'une potentialisation des réponses

de défense impliquant la production de camalexine et de glutathion (Chassot *et al.*, 2008). De plus, chez la tomate, le raccourcissement de la longueur des racines par coupure conduit à la résistance à quatre pathogènes (*B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* et *P. syringae* pv. *tomato* ; Francia *et al.*, 2007).

2.2.1.5 Par la laminarine sulfatée PS3

Comme la laminarine, son composé sulfaté PS3 induit une résistance chez différentes espèces telles que la vigne et le tabac (Aziz *et al.*, 2003 ; Trouvelot *et al.*, 2008 ; Menard *et al.*, 2005). Il a plutôt été rapporté que PS3 présentait des propriétés élicitrices directes puisqu'il induit l'expression de gènes *PR* chez *A. thaliana* et le tabac mais aussi une accumulation de protéines PR, la production d'H₂O₂, de phytoalexines et de SA chez le tabac (Menard *et al.*, 2004). Cependant, chez la vigne, il joue aussi le rôle de potentialisateur dans la résistance à l'oomycète *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008). En effet, la résistance induite est associée à une potentialisation de l'expression de gènes de défense tels que *STS* (stilbène synthase), *PAL*, *LOX9* et à une production d'H₂O₂ plus rapide et plus intense au point d'infection par le pathogène corrélée à une mort cellulaire localisée. De plus, des études pharmacologiques ont montré que le dépôt de callose et la voie dépendante du JA semblent contribuer à la résistance induite par PS3 (Trouvelot *et al.*, 2008).

2.2.2 La potentialisation induite par le BABA

Le BABA est un acide aminé non protéique et non métabolisé par les plantes. L'induction de la résistance des plantes par le BABA a été mise en évidence lors d'un criblage d'acides aminés induisant une résistance du pois contre l'oomycète *Aphanomyces euteiches* (Papavizas & Davey, 1963). Cependant, son effet sur la résistance n'est pas limité au pois mais est observé dans beaucoup de pathosystèmes (Jakab *et al.*, 2001) tels qu'*A. thaliana* et *B. cinerea* (Zimmerli *et al.*, 2001), *P. syringae* pv. *tomato* ou *H. arabidopsidis* (Zimmerli *et al.*, 2000) ; la vigne et *P. viticola* (Cohen *et al.*, 1999 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005) ou la tomate et *P. infestans* (Cohen *et al.*, 1994). Cohen *et al.* (1994) ont conclu que le mode d'action du BABA sur la résistance des plantes aux pathogènes passait par une potentialisation des réactions de défense, après avoir écarté l'hypothèse d'une activité antimicrobienne directe du BABA (Cohen *et al.*, 1999 ; Zimmerli *et al.*, 2000).

Des expériences de radiomarquage ont montré que le BABA était transporté dans la plante entière et qu'il exerçait un effet systémique (Cohen *et al.*, 1999). Cependant, des expériences réalisées sur salade (*Lactuca sativa*) montrent clairement que seulement 1 à 3 % du BABA radiomarqué se retrouve dans la plante entière trois jours après arrosage (Cohen *et al.*, 2010). De plus, le BABA est majoritairement transporté vers les organes supérieurs puisque le plus fort pourcentage de radioactivité est retrouvé dans les feuilles supérieures à la feuille traitée et est corrélé à une meilleure résistance à l'oomycète *Bremia lactucae*. Par contre, l'efficacité du traitement est dépendante du mode d'application puisque pour un même niveau de résistance, l'arrosage nécessite seulement 700 μ M de BABA alors que la pulvérisation demande 2,5 mM de BABA (Cohen *et al.*, 2010).

Chez *A. thaliana*, la résistance aux pathogènes induite par le BABA s'observe par la potentialisation des réactions de défense tels que l'accumulation des transcrits de gènes de défense ou le dépôt de callose au site d'infection (Zimmerli *et al.*, 2000 ; Zimmerli *et al.*, 2001 ; Ton *et al.*, 2005 ; Flors *et al.*, 2008 ; Ton & Mauch-Mani, 2004). La résistance induite par le BABA emprunte des voies de signalisation différentes en fonction du pathogène et de l'espèce végétale. Ces voies ont été appréhendées *via* l'utilisation de divers mutants.

L'étude de l'expression des gènes dépendants de la voie du SA montre que la résistance induite par le BABA chez *A. thaliana* est associée à la potentialisation du gène *PR-1* en réponse à *B. cinerea* (Zimmerli *et al.*, 2001). De la même manière, l'expression des gènes *PR-1* et *PR-5* suite à un stress salin et à la sécheresse est plus forte dans les plantes traitées par le BABA, bien que la résistance induite soit toujours observée dans la plante transgénique *nahG* et le mutant *npr1* (Jakab *et al.*, 2005). De plus, en réponse à *P. syringae*, la potentialisation de l'expression du gène *PR-6* est observée dans les plantes traitées par le BABA (Zimmerli *et al.*, 2000). Chez la pomme de terre, les plantes transgéniques incapables d'accumuler le SA perdent la résistance induite par le BABA à *P. infestans* (Eschen-Lippold *et al.*, 2010).

Concernant la voie dépendante du JA, la résistance induite par le BABA chez *A. thaliana* contre *A. brassicicola* est concomitante à une accumulation du JA dans les feuilles (Flors *et al.*, 2008). Chez la vigne en réponse à *P. viticola*, l'expression des gènes marqueurs de la voie du JA, *LOX-9* et *PR-4* est potentialisée par le BABA (Hamiduzzaman *et al.*, 2005).

Bien que l'ABA soit considéré comme jouant un rôle dans la tolérance au stress hydrique, Ton & Mauch-Mani (2004) ont montré que, chez *A. thaliana*, la voie dépendante de l'ABA était nécessaire à la résistance induite par le BABA contre les nécrotrophes *A. brassicicola* et *Plectosphaerella cucumerina*. La potentialisation de l'expression des gènes

dépendants de la voie ABA, tels que *RAB18* et *RD29A*, est associée à la tolérance induite par le BABA à la sécheresse (Ton *et al.*, 2005). A l'inverse, les mutants de la voie de l'ABA, *aba1* et *aba4*, perdent la tolérance induite par le BABA au stress salin et à la sécheresse (Jakab *et al.*, 2005). Enfin, Zimmerli *et al.* (2008) montrent que la thermotolérance induite par le BABA est associée à une accumulation des gènes codant des facteurs de transcription relatifs à la voie de l'ABA.

Néanmoins, aucune de ces trois voies (SA, JA ou ABA) n'est utilisée dans la résistance induite par le BABA chez *L. sativa* contre *B. lactucae* (Cohen *et al.*, 2010).

Chez *A. thaliana*, la résistance induite par le BABA implique également une potentialisation de réponses de défense tels que le dépôt de callose en réponse à *A. brassicicola* et *P. cucumerina* (Ton & Mauch-Mani, 2004). Flors *et al.* (2008) montrent en plus que le mutant *pmr4*, déficient en callose synthase, présente une perte de résistance induite par le BABA à *A. brassicicola* mais maintient une résistance basale à *P. syringae*. Enfin, des approches pharmacologiques montrent que la résistance induite par le BABA passe par la potentialisation du dépôt de callose dans les pathosystèmes vigne-*P. viticola* ou *A. thaliana*-*H. arabidopsidis* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2000 ; Ton *et al.*, 2005).

2.3 Le glutathion, une molécule ubiquitaire dans les processus cellulaires

Le glutathion est un tripeptide non protéique présent chez tous les eucaryotes et restreint aux cyanobactéries et protéobactéries chez les procaryotes. Cette molécule ubiquitaire joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques grâce à la présence d'un groupement thiol qui, *via* son oxydation ou réduction, concourt à son activité biologique.

Bien que le glutathion ait été initialement décrit comme molécule antioxydante majeure, d'autres rôles ont été découverts dans divers processus cellulaires. Chez les animaux, plus particulièrement chez l'homme, le glutathion est impliqué, en plus de la détoxification de molécules au niveau du foie, dans la modulation de l'inflammation, de l'immunité et son administration est utilisée dans le traitement de certaines maladies comme le diabète, la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Alpert, 2005). Chez les bactéries, la réponse cellulaire au stress environnemental comme le stress osmotique, oxydatif, des variations de pH du

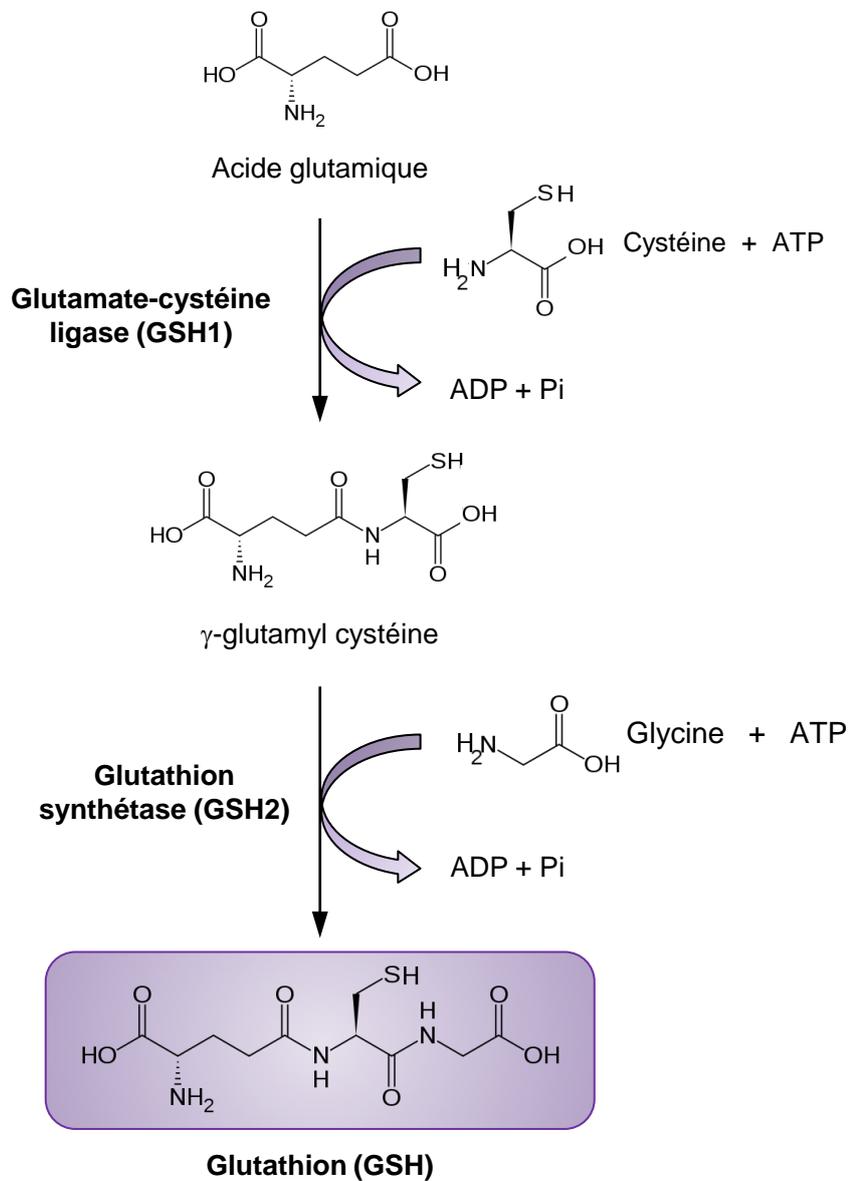


Figure 7. Biosynthèse du glutathion. Elle se déroule en 2 étapes ATP-dépendantes. Tout d'abord, la glutamate-cystéine ligase (GSH1) catalyse la formation de la γ -glutamyl cystéine à partir du glutamate et de la cystéine. Puis, la glutathion synthétase (GSH2) catalyse l'ajout de la glycine du côté C-terminal de la γ -glutamyl cystéine pour former le tripeptide glutathion.

milieu ou le passage du métabolisme de type aérobie en anaérobie est fortement lié à la teneur globale en glutathion (Masip *et al.*, 2006). Chez les plantes, le glutathion est globalement impliqué dans les mêmes processus cellulaires, détaillés dans les paragraphes suivants.

2.3.1 La structure du glutathion et de ses homologues

La séquence du glutathion est la γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine (Figure 7). Elle présente une liaison pseudopeptidique puisque le résidu glutamate est lié au résidu cystéine par son groupement carboxyle en position γ .

Des molécules homologues au glutathion et de même fonction sont retrouvées chez certaines plantes, comme l'homoglutathion (γ -Glu-Cys- β -Ala) chez la plupart des légumineuses, l'hydroxyméthylglutathion (Gly remplacée par Ser) chez les graminées ou le γ -Glu-Cys-Glu chez le maïs (Klapheck, 1988 ; Meuwly *et al.*, 1993).

2.3.2 La biosynthèse, régulation et dégradation du glutathion

2.3.2.1 La biosynthèse du glutathion

La formation du glutathion n'emprunte pas la voie classique de la synthèse protéique. Chez les animaux comme chez les végétaux, sa biosynthèse est régie par deux étapes enzymatiques ATP-dépendantes (Figure 7, Meister & Lester (1995)). Premièrement, la glutamate-cystéine ligase (GSH1) catalyse la formation de la liaison peptidique entre le groupement γ -carboxyle du glutamate et la cystéine. Puis, la glutathion synthétase (GSH2) forme le glutathion par addition de la glycine sur la γ -glutamyl-cystéine (γ -EC).

2.3.2.2 La régulation de sa biosynthèse

Bien que le glutamate et la cystéine régulent la biosynthèse du glutathion de part leur disponibilité, la régulation de la biosynthèse se fait préférentiellement par feedback négatif au niveau de la première étape grâce à une inhibition compétitive du glutathion vis-à-vis de GSH1 (Meister & Lester, 1995). De plus, il a été montré chez *A. thaliana* que GSH1 était régulée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Par exemple, l'infection de plantes d'*A. thaliana* par *P. brassicae* conduit à une accumulation des transcrits du gène *GSH1* corrélée à une synthèse de glutathion (Parisy *et al.*, 2007). Par contre, bien que

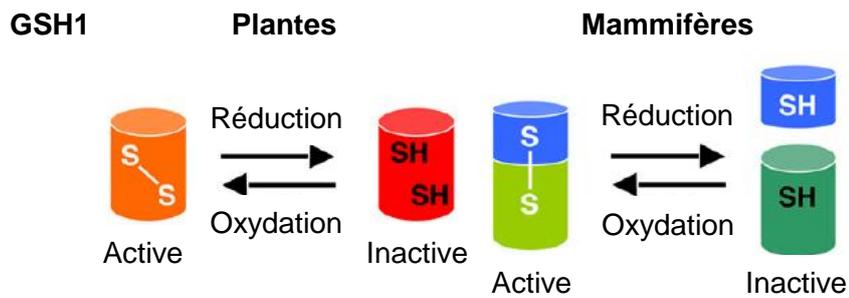


Figure 8. Régulation de l'activité enzymatique de la γ -glutamylcystéine ligase (GSH1) chez les plantes et les mammifères. Chez les mammifères, l'activité de GSH1 est régulée par la formation de ponts disulfures intermoléculaires entre l'unité régulatrice et l'unité catalytique. GSH1 est alors active sous forme dimérique oxydée et inactive sous forme réduite. Chez les plantes, la formation de ponts disulfures intramoléculaires est responsable de l'activité enzymatique de GSH1. La forme réduite est inactive. Modifié d'après Hicks *et al.*, 2007.

l'accumulation d'ARNm des gènes *GSH1* et *GSH2* reste inchangée, May *et al.* (1998) ont observé une augmentation de l'activité enzymatique de GSH1 et une synthèse accrue de glutathion dans des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* exposées au cadmium ou à l'aminotriazole.

De nombreux travaux sur la structure protéique de GSH1 ont apporté des données capitales sur la régulation post-traductionnelle de cette enzyme (Jez *et al.*, 2004 ; Hothorn *et al.*, 2006 ; Hicks *et al.*, 2007). Chez les animaux, la formation de plusieurs ponts disulfures intermoléculaires entre une unité régulatrice et catalytique permet l'association réversible des deux sous-unités formant GSH1, augmentant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 8 ; Tu & Anders, 1998). Cependant, la séquence protéique n'est pas conservée entre les règnes puisque trois groupes ont été définis regroupant respectivement, animaux et champignons (groupe 1), la plupart des γ -protéobactéries (groupe 2) puis plantes, α -protéobactéries et certaines γ -protéobactéries (groupe 3). Bien que la structure protéique de GSH1 chez les plantes soit monomérique, la régulation de son activité enzymatique est également dépendante de la formation de ponts disulfures mais de nature intramoléculaires (Figure 8). Le modèle monomérique actif de GSH1 chez les plantes a été proposé par Hicks *et al.* (2007) en montrant que, chez *A. thaliana*, la protéine GSH1 restait sous forme monomérique lors de sa régulation par l'oxydation réversible des thiols de deux résidus cystéines formant un seul pont disulfure. Cependant, d'autres études, notamment cristallographiques, ont plutôt montré le passage d'une forme dimérique à une forme monomérique de GSH1 *via* la réduction de deux ponts disulfures intramoléculaires (nommés CC1 et CC2) sous conditions réductrices chez *Brassica juncea* et *Nicotiana tabacum* (Hothorn *et al.*, 2006 ; Gromes *et al.*, 2008). De plus, une comparaison fonctionnelle de GSH1 entre espèces montre qu'un seul pont disulfure (CC2) dont les résidus cystéines sont conservés chez les plantes et les protéobactéries est responsable de l'état redox de la protéine (Gromes *et al.*, 2008).

2.3.2.3 La dégradation du glutathion

Puisque la liaison peptidique entre le glutamate et la cystéine implique le groupe γ -carboxyle du glutamate, aucune dégradation du glutathion n'est possible par les protéases. Cependant, d'autres enzymes permettent de cliver le glutathion. Chez les plantes, toutes les étapes de la dégradation du glutathion ne sont pas encore élucidées. En revanche, chez les animaux, le catabolisme du glutathion est bien défini et empreinte le cycle γ -glutamyle

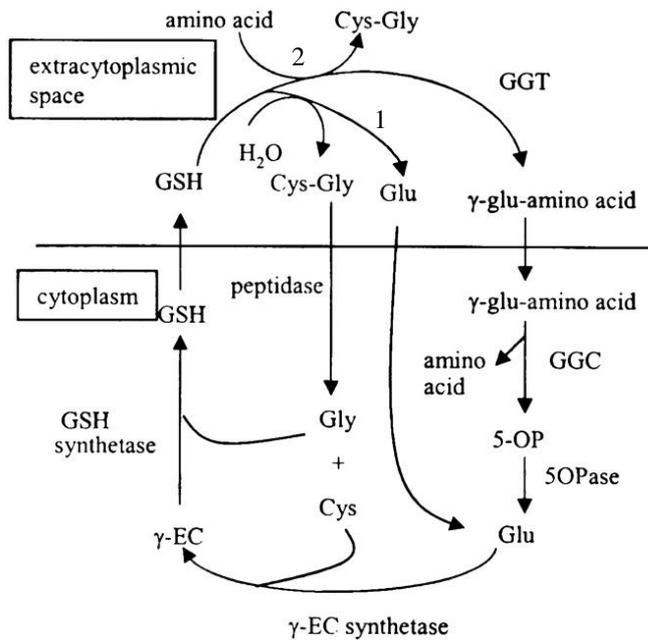


Figure 9. Dégradation du glutathion empreintant le cycle γ -glutamyle chez les animaux. Le glutathion (GSH) est dégradé dans l'espace extracellulaire par la γ -glutamyltranspeptidase (GGT) qui libère le dipeptide Cys-Gly et transfère le glutamate (Glu) sur une molécule d'eau (1) ou un autre acide aminé (2). Le dipeptide Cys-Gly est transporté dans le cytosol et est hydrolysé par une peptidase libérant la cystéine (Cys) et la glycine (Gly). Le glutamate formé en (1) est transporté dans le cytosol. L'acide aminé γ -glutamyle est lui aussi transporté dans le cytosol et est converti par une γ -glutamylcyclotransférase (GGC) en acide aminé libre et en 5-oxoproline (5-OP) qui est ensuite hydrolysé par une 5-oxoprolinase (5OPase) en glutamate. γ -EC : γ -glutamyl-cystéine. D'après Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008.

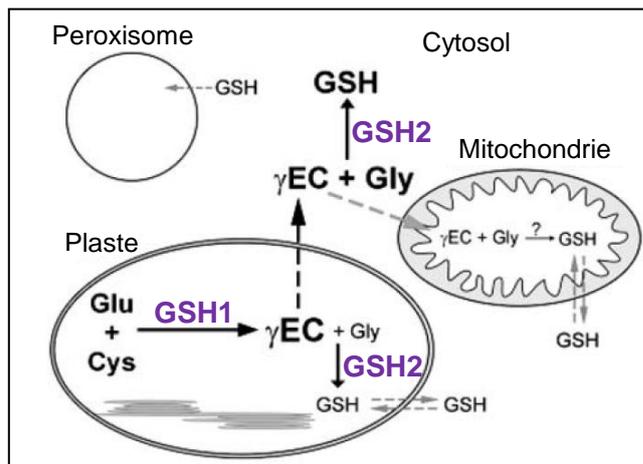


Figure 10. Localisation subcellulaire des enzymes GSH1 et GSH2 impliquées dans la biosynthèse du glutathion. GSH : glutathion, GSH1 : glutamate-cystéine ligase, GSH2 : glutathion synthétase, γ -EC : γ -glutamylcystéine. D'après Mullineaux & Rausch, 2005 et Watcher *et al.*, 2005.

(Meister, 1973). Il implique une γ -glutamyltranspeptidase (GGT) localisée dans l'espace extracellulaire qui libère le dipeptide Cys-Gly hydrolysé ensuite dans le cytosol par une dipeptidase (Figure 9). Concernant le glutamate libéré suite à l'action de la GGT, il est soit transféré sur une molécule d' H_2O , soit transféré sur un autre acide aminé pour former un dipeptide γ -Glu-amino acide. Après internalisation dans le cytosol, ce dernier subira l'action séquentielle d'une γ -glutamylcyclotransférase (GGC) puis d'une 5-oxoprolinase (5OPase) afin de libérer le glutamate. Chez les plantes, peu d'études ont été menées sur la GGC bien qu'une localisation cytoplasmique soit proposée (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008). Par contre, des activités GGT ont été reportées dans l'apoplaste et dans la vacuole chez *A. thaliana* (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a ; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b).

2.3.3 La compartimentation cellulaire du glutathion et sa distribution *in planta*

Des expériences de complémentation fonctionnelle chez le mutant *gsh1* d'*E. coli* incapable de synthétiser le glutathion et le mutant *gsh2* de *Saccharomyces cerevisiae* sensible au méthylglyoxal, composé toxique dont la dégradation utilise le glutathion, ont montré que les enzymes GSH1 et GSH2 étaient codées respectivement par un gène unique chez *A. thaliana* (May & Leaver, 1994 ; Ullmann *et al.*, 1996). Des expériences de transformation transitoire avec des fusions au gène rapporteur de la GFP (green fluorescent protein) ont permis de déterminer la localisation subcellulaire des protéines GSH1 et GSH2 (Wachter *et al.*, 2005). Chez *A. thaliana*, GSH1 est localisée exclusivement dans les plastes alors que GSH2 est présente majoritairement dans le cytosol bien qu'elle le soit également dans les plastes (Figure 10). Ainsi, la synthèse du glutathion se déroule à la fois dans le cytosol et dans les plastes, compartimentation caractéristique des plantes qui nécessite un export de γ -EC des plastes vers le cytosol (Pasternak *et al.*, 2008). En plus d'un import du glutathion dans la mitochondrie, une synthèse mitochondriale est suggérée puisque des expériences d'activité enzymatique de GSH2 sur des organelles purifiées de nodules de légumineuses montrent qu'elle est localisée à la fois dans le cytosol et la mitochondrie (Moran *et al.*, 2000). Toutefois, la synthèse du glutathion limitée seulement au cytosol est suffisante pour un développement normal de la plante puisque la complémentation du mutant *gsh2* avec GSH2 adressée exclusivement au cytosol rétablit la synthèse du glutathion et n'affecte par la croissance de la plante (Pasternak *et al.*, 2008).

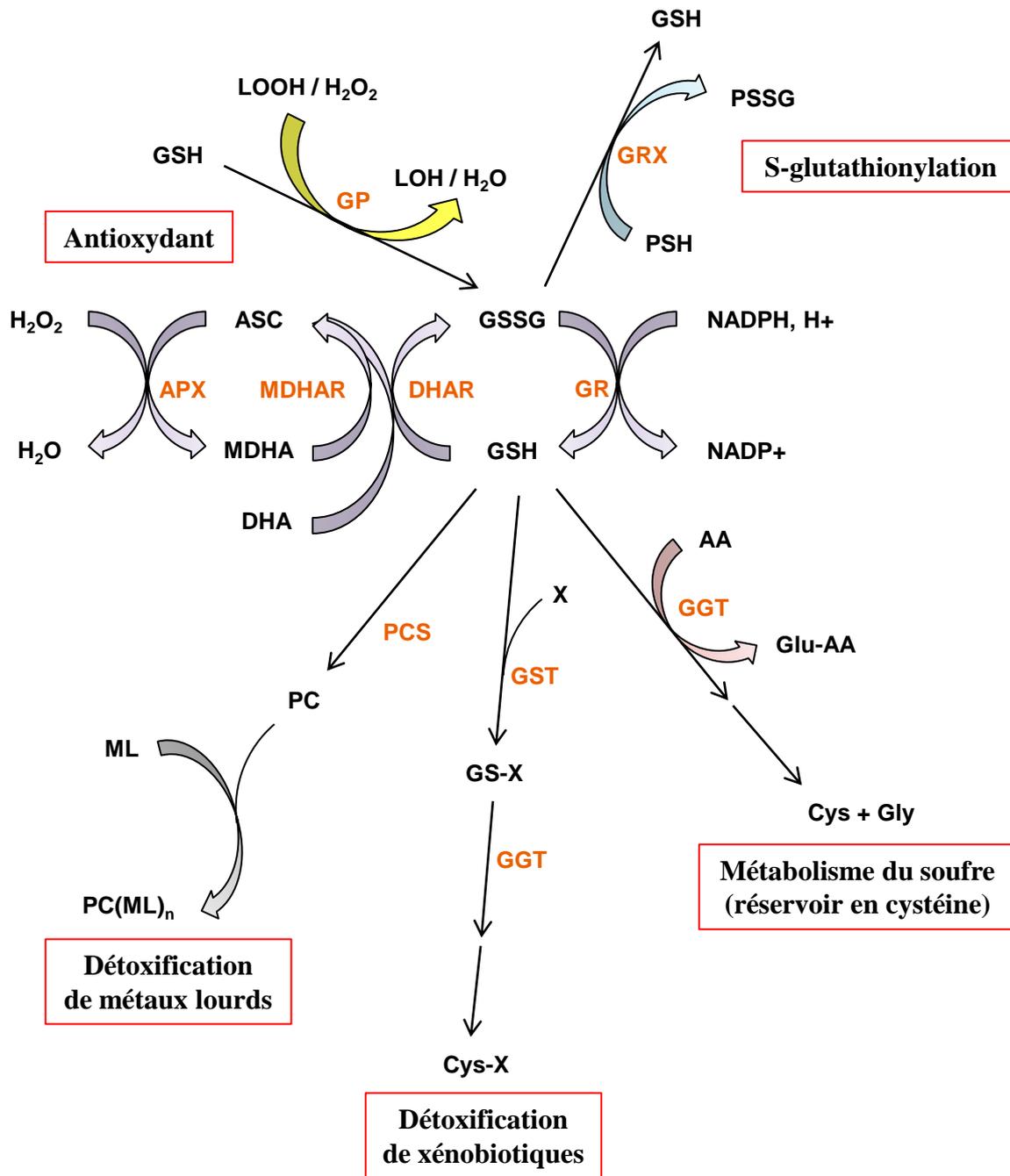


Figure 11. Rôle du glutathion dans divers processus cellulaires chez les plantes. Le glutathion présente un rôle antioxydant en participant à la réduction des composés issus de la peroxydation des lipides (LOOH) ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à la glutathion peroxydase ou par le cycle ascorbate/glutathion. Il est aussi impliqué dans la modification post-traductionnelle par S-glutathionylation de certaines protéines. Il est à l'origine de la synthèse des phytochélatines, molécules permettant la détoxification des métaux lourds par chélation. Il est aussi impliqué dans la conjugaison aux xénobiotiques par des GST permettant leur détoxification. Enfin, il participe au métabolisme du soufre en étant la source de résidu cystéinyl. De manière générale, tous ces mécanismes sont retrouvés de près ou de loin dans le développement des plantes et dans les mécanismes de défense. AA : acide aminé, APX : ascorbate peroxydase, ASC : ascorbate, (M)DHA(R) : (mono)déshydroascorbate (réductase), GGT : γ -glutamyltransférase, GP : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GRX : glutarédoxine, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion S-tranférérase, GS-X : xénobiotique conjugué au glutathion, LOOH : lipide peroxydé, LOH : lipide oxydé, ML : métal lourd, PC(S) : phytochélatine (synthase), PSSG : protéine S-glutathionylée, PSH : protéine non glutathionylée, X : xénobiotique.

La concentration du glutathion dans les cellules est la résultante d'un équilibre finement régulé entre synthèse, dégradation et transport. Chez les plantes, il a été rapporté que le cytosol et le noyau contenaient tous deux environ de 3 mM de glutathion et que la concentration dans les chloroplastes variait entre 1 et 4,5 mM (Noctor & Foyer, 1998 ; Meyer *et al.*, 2001 ; Zechmann *et al.*, 2008). De plus, des expériences d'immunocytochimie chez *A. thaliana* ont permis de montrer que le compartiment présentant la plus forte teneur en glutathion était la mitochondrie (2,5 à 3 fois plus que dans le cytosol, Zechmann *et al.* (2008). Ces résultats sont confortés par une concentration semblable en glutathion dans la mitochondrie des animaux (10-14 mM ; Mari *et al.*, 2009).

En revanche, peu de données ont été publiées sur l'identité des transporteurs du glutathion au niveau cellulaire, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Ballatori *et al.* (2009) et Zhang *et al.* (2004) ont pu cependant caractériser chez le riz un transporteur potentiel de GSH, OsGT1, probablement localisé au niveau de la membrane plasmique qui peut transporter également des molécules conjuguées au glutathion. De plus, une protéine homologue du transporteur résistant à la chloroquine (CRT) chez *Plasmodium falciparum*, nommé CLT (CRT-like transporter), a été caractérisée chez *A. thaliana* comme jouant un rôle important dans le transport à travers la membrane plastidique de composés thiols, notamment le glutathion et son précurseur, le γ -EC (Maughan *et al.*, 2010).

Le glutathion est également reconnu comme étant la forme majeure de transport du soufre dans la plante. Il circule dans le xylème et le phloème et est distribué dans tous les tissus puisqu'une augmentation de sa synthèse par une surexpression du gène *GSH1* chez le peuplier est suivie d'une augmentation de sa concentration dans les vaisseaux conducteurs et dans tous les tissus de la plante (Herschbach *et al.*, 2000).

2.3.4 Les rôles physiologiques du glutathion chez les plantes

L'implication du glutathion dans le développement et dans la réponse aux stress est clairement établie chez la levure, les bactéries, les mammifères et les plantes. Bien que de nombreux mécanismes restent encore à découvrir, les données actuellement disponibles permettent de mieux comprendre le rôle du glutathion dans la régulation de différents processus cellulaires, notamment chez les plantes. D'un point de vue biochimique, le glutathion exerce ses fonctions biologiques dans divers processus cellulaires en interagissant avec de nombreuses molécules présentes dans la cellule (Figure 11). En effet, le glutathion est

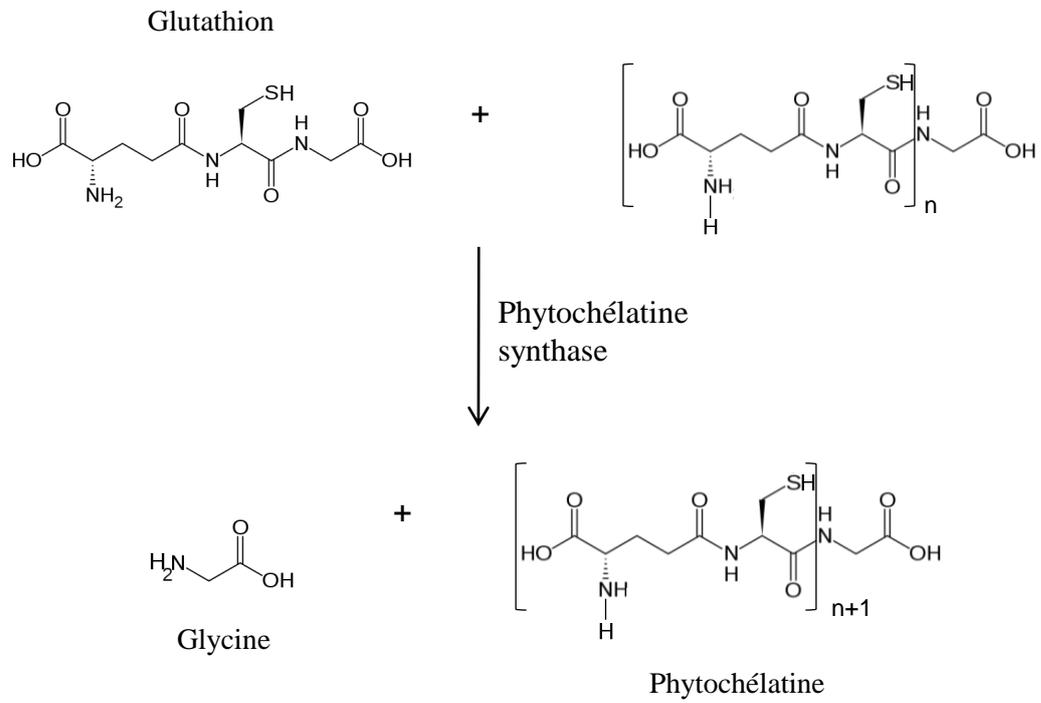


Figure 12. Synthèse des phytochélatines $[\text{Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$ à partir du glutathion.

impliqué dans la détoxification des xénobiotiques et la tolérance aux métaux lourds puisque la fixation de ces composés toxiques respectivement sur le glutathion ou les phytochélatines, molécules dérivées du glutathion, permet leur élimination. De part sa composition, le glutathion régule le métabolisme du soufre dans la cellule puisqu'il est une source principale de cystéine. De plus, l'oxydation de son groupement thiol permet une détoxification par réduction des composés peroxydés comme les FAO ou les lipides peroxydés formés dans des conditions oxydantes, évitant ainsi des dommages cellulaires. Sa conjugaison avec les protéines, appelée S-glutathionylation, permet de protéger certaines enzymes d'une inactivation irréversible par oxydation de leur groupements thiols. Enfin, il participe à la régulation de l'état redox de la cellule par le maintien d'un fort ratio réduit/oxydé et en appartenant au cycle glutathion-ascorbate.

Tous ces processus cellulaires impliquant le glutathion sont détaillés dans les paragraphes suivants.

2.3.4.1 L'implication du glutathion dans la détoxification des métaux lourds et des xénobiotiques

Puisque les métaux lourds sont fortement toxiques, les plantes et d'autres organismes ont mis en place un système de chélation puis de séquestration des métaux lourds. Avec les métallothionéines, les phytochélatines font partie des molécules les mieux caractérisées dans le processus de détoxification de métaux lourds chez les plantes (Cobbett & Goldsbrough, 2002). En effet, ces polypeptides riches en cystéine présentent une forte affinité pour les métaux. Ils forment un complexe avec le métal qui est transporté dans la vacuole pour sa séquestration au niveau des racines, ou est transporté par le xylème dans les parties aériennes de la plante (Pilon-Smits, 2005). Contrairement aux métallothionéines qui sont codées par un gène, la synthèse des phytochélatines emprunte une voie enzymatique localisée au niveau du cytosol, qui utilise le glutathion comme précurseur (Cobbett, 2000). La structure de base est de type $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ dont le nombre de résidus $\gamma\text{-Glu-Cys}$ est compris généralement entre 2 et 5. Une molécule de phytochélatine est formée par addition de $\gamma\text{-EC}$ sur une molécule de glutathion ou sur une autre molécule de phytochélatine par la phytochélatine synthase (PCS ; Figure 12). Dans ce sens, des travaux ont montré qu'un mutant d'*A. thaliana* présentant un faible taux de glutathion était déficient en synthèse de phytochélatines et sensible aux métaux lourds comme le cadmium (Howden *et al.*, 1995). Ce mutant nommé *cad2* (cadmium sensitive mutant 2) a été caractérisé comme étant déficient en GSH1,

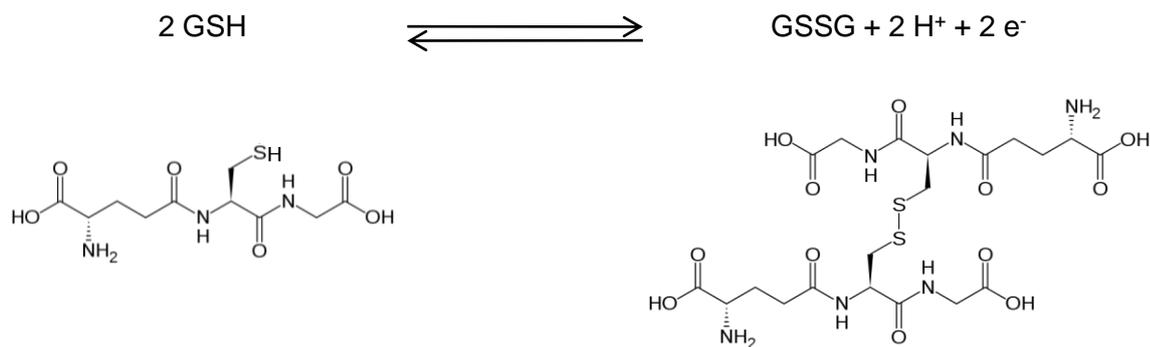
expliquant ainsi son phénotype (Cobbett *et al.*, 1998). Xiang *et al.* (2001) ont conforté le rôle indispensable du glutathion dans la protection des plantes vis-à-vis de la toxicité du cadmium en démontrant que des plantes transgéniques exprimant l'ADNc de *GSH1* en antisens présentaient une sensibilité accrue au métal toxique elle-même est corrélée à une faible teneur en glutathion et en phytochélatines. Finalement, des expériences menées par Guo *et al.* (2008) ont rapporté une tolérance et une plus forte accumulation de cadmium et d'arsenic dans des plantes d'*A. thaliana* surexprimant à la fois *GSH1* et la *PCS*.

Concernant les xénobiotiques comme les herbicides et pesticides, le glutathion joue un rôle direct dans leur détoxification. Sa conjugaison avec ces composés toxiques électrophiles est catalysée par une glutathion S-transférase pour former des composés solubles non toxiques qui seront stockés au niveau de la vacuole et de la paroi (Dixon *et al.*, 1998 ; Edwards *et al.*, 2000). Les composés conjugués au glutathion sont ensuite dégradés par une γ -glutamyltranspeptidase ou une carboxypeptidase localisées dans la vacuole (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008 ; Wolf *et al.*, 1996 ; Leustek *et al.*, 2000).

2.3.4.2 Rôle dans le développement et le cycle cellulaire

Au travers d'expériences utilisant des mutants déficients en glutathion, le glutathion apparaît comme étant une molécule indispensable dans le développement des plantes, plus particulièrement dans le cycle cellulaire. En effet, des mutants d'insertion ADN-T au niveau du gène *GSH1* chez *A. thaliana* présentent un phénotype embryo-léthal dû à une maturation altérée des graines (Cairns *et al.*, 2006). De plus, le phénotype du mutant EMS (éthylméthylsulfonate) *rml1* (*root meristemless 1*) d'*A. thaliana* caractérisé par un arrêt du développement des racines a été associé à une mutation au niveau du gène *GSH1* et un taux de glutathion de l'ordre de 1 % par rapport au sauvage (Vernoux *et al.*, 2000). D'après les auteurs, le glutathion jouerait un rôle clé dans l'initiation et le maintien de la division cellulaire durant le développement post-embryonnaire des racines *via* son implication dans la transition de phase G1/S du cycle cellulaire (Vernoux *et al.*, 2000). A ce titre, Markovic *et al.* (2007) ont permis de définir la distribution du glutathion entre le cytosol et le noyau en fonction de la phase de cycle cellulaire des fibroblastes. Le glutathion est plutôt concentré au niveau du noyau lors des premières phases de croissance (S + G2/M) puis est redistribué entre le cytosol et le noyau quand les cellules deviennent confluentes (phase G0/G1).

De plus, le glutathion et l'homoglutathion jouent un rôle important dans le développement des légumineuses *via* la symbiose, notamment entre *Medicago truncatula* et la



Potentiel redox du glutathion :
$$E_{\text{GSH}} = E^{\circ}_{\text{GSH}} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]}$$

Degré d'oxydation du glutathion :
$$\text{OxD}_{\text{GSH}} = \frac{2 [\text{GSSG}]}{2 [\text{GSSG}] + [\text{GSH}]}$$

Figure 13. Expression du potentiel redox du glutathion et du degré d'oxydation du glutathion.

Le potentiel rédox du glutathion E_{GSH} est dépendant de la concentration totale en glutathion et du degré d'oxydation du glutathion. E°_{GSH} : potentiel redox standard du glutathion à pH 7 et à 25°C ; R : constante des gaz parfaits ; T : température ; F : constante de Faraday ; n : nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction ; [GSH] : concentration en glutathion réduit ; [GSSG] : concentration en glutathion oxydé.

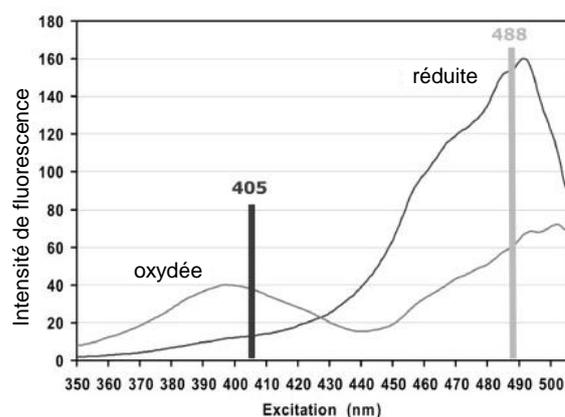


Figure 14. Spectre d'excitation de la fluorescence de la roGFP2 sous forme oxydée ou réduite. La fluorescence de la forme oxydée de la roGFP2 est mesurée à $\lambda_{\text{excitation}} = 405 \text{ nm}$. Le pic de fluorescence de la forme réduite apparaît à $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$. D'après Meyer, 2008.

famille bactérienne des Rhizobiacées. En effet, la déficience en glutathion et homoglutathion inhibent la formation des nodules au niveau des racines dans de plantes traitées par un inhibiteur spécifique de la synthèse du glutathion, la buthionine sulfoximine, ou des plantes transgéniques exprimant l'ADNc en antisens de *GSH2* ou *glutathion synthétase* (Frendo *et al.*, 2005).

2.3.4.3 Rôle dans l'équilibre redox cellulaire

Pour s'adapter à des conditions environnementales oxydantes, les organismes ont mis en place un système de régulation de l'état redox au niveau cellulaire. Cette balance entre l'état réduit et oxydé dans la cellule implique des systèmes enzymatiques appropriés et des molécules donneurs d'électrons généralement de faible poids moléculaires.

Parmi ces molécules, le glutathion *via* son groupement thiol peut subir des réactions réversibles d'oxydation et de réduction. Le glutathion est synthétisé sous forme réduite et sa forme oxydée est constituée de deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure intermoléculaire (Figure 13). Plusieurs travaux ont montré que le glutathion se trouvait majoritairement sous forme réduite dans les cellules (Meister & Anderson, 1983). La régénération du glutathion réduit à partir de sa forme oxydée est catalysée par une glutathion réductase utilisant le NADPH comme cofacteur.

La balance entre la forme réduite et la forme oxydée du glutathion est un bon indicateur du stress oxydatif dans la cellule. Le potentiel redox du glutathion est calculé à partir de l'équation de Nernst qui prend en compte le degré d'oxydation du glutathion et sa concentration totale (Meyer & Hell, 2005). Le développement d'une protéine GFP sensible à l'état redox (roGFP) permet aujourd'hui d'analyser et de visualiser en temps réel l'état redox dans différents compartiments cellulaires tels que le cytosol ou la mitochondrie (Hanson *et al.*, 2004). L'introduction de résidus cystéines à des positions appropriées permet de former des ponts disulfures dans la protéine qui seront à l'origine d'un déplacement du spectre d'excitation de celle-ci en fonction de l'environnement redox dans lequel elle se trouve (Figure 14). L'intensité de la fluorescence émise par la forme oxydée ou réduite de la protéine est déterminée à deux longueurs d'onde d'excitation spécifiques respectivement de $\lambda=405$ et 488 nm. L'exemple présenté (Figure 14) correspond à la roGFP2 qui est considérée comme étant un biosenseur quantitatif de l'état redox du glutathion (Meyer *et al.*, 2007 ; Schwarzländer *et al.*, 2008).

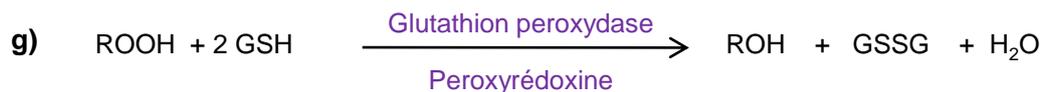
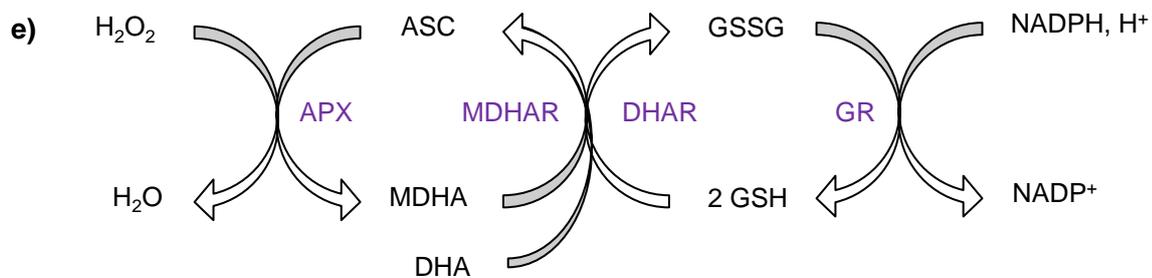
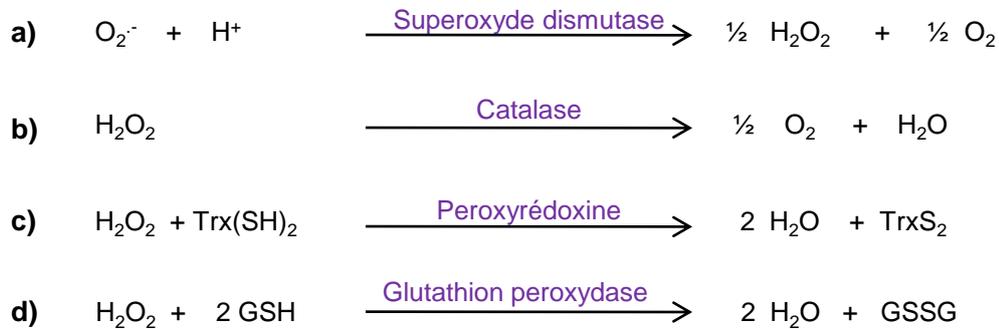


Figure 15. Réactions enzymatiques de réduction de composés oxydés. a) Dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. b), c) et d) Détoxification de l' H_2O_2 par la catalase, la peroxyrédoxine et la glutathion peroxydase. e) Cycle glutathion/ascorbate. f) et g) Réduction de composés peroxydés par la glutathion peroxydase. APX : ascorbate peroxydase, ASC : ascorbate, (M)DHA(R) : (mono)déshydroascorbate (réductase), GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, ROOH : lipide peroxydé, Trx : thiorédoxine.

2.3.4.4 *La protection contre le stress oxydant*

Les FAO regroupent principalement l' $O_2^{\cdot-}$, l' $\cdot OH$, l'oxygène singulet (1O_2) et l' H_2O_2 . Ces molécules sont issues du métabolisme basal qui implique des processus cellulaires localisés au niveau des chloroplastes, peroxyosomes et mitochondries mais sont aussi produites lors de la réponse à différents stress (Apel & Hirt, 2004). Plus précisément, l'oxygène singulet est produit chez les plantes après réaction de peroxydation des lipides ou lors de la photosynthèse au niveau du centre réactionnel du photosystème II. En plus de la respiration et de la photosynthèse, la photorespiration est considérée comme l'une des sources majeures de production d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 . Quant au radical $\cdot OH$, il est généré par la réaction de Fenton en présence d'ions métalliques ou par la réaction de Haber-Weiss impliquant l' H_2O_2 et l' $O_2^{\cdot-}$. Les principales enzymes responsables de la production de FAO appartiennent à la famille des peroxydases et des oxydases jouant un rôle dans les mécanismes énumérés précédemment.

Le temps de demi-vie des FAO est généralement très court, de l'ordre de la microseconde, voire nanoseconde pour le radical $\cdot OH$. En effet, les FAO réagissent très fortement et rapidement avec les molécules présentes dans leur environnement tels que les lipides, glucides, ADN et protéines (Moller *et al.*, 2007). L'oxydation de ces molécules provoque des dommages cellulaires *via* notamment des perturbations de la fluidité membranaire, la production d'acide formique, des mutations de bases et un changement de conformation et/ou de l'activité des protéines (Moller *et al.*, 2007).

En plus de la régulation de la production des FAO, des systèmes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques sont présents dans la cellule et permettent d'éviter leurs effets délétères (Foyer & Noctor, 2009). Le maintien du ratio élevé entre la forme réduite et la forme oxydée de molécules antioxydantes comme le glutathion et l'ascorbate permet de contrôler l'état redox de la cellule lors d'un stress oxydant. Par exemple, un faible taux d'ascorbate ou une quantité de glutathion altérée, respectivement chez *A. thaliana* ou le tabac, prédispose à une hypersensibilité aux stress abiotiques (Conklin *et al.*, 1996 ; Creissen *et al.*, 1999). Concernant les systèmes enzymatiques de détoxification, ils sont impliqués dans chaque compartiment cellulaire (Figure 15 ; Rahman *et al.*, 2005). D'un point de vue biochimique, la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 est catalysée par une superoxyde dismutase (Figure 15 a). L' H_2O_2 produit peut être détoxifié par formation d'une molécule d'eau à l'aide de différentes enzymes comme la catalase peroxisomiale, la peroxyrédoxine, la glutathion peroxydase ou par une ascorbate peroxydase (Figure 15 b,c,d,e). Le glutathion, quant à lui, apparaît comme donneur d'électron en réduisant, grâce à la glutathion peroxydase, des

molécules peroxydées comme le peroxydinitrite ou les lipides issus de la peroxydation (Figure 15 f,g). Enfin, le GSH peut interagir avec le NO pour former du nitrosogluthation (GSNO). Ce dernier peut ensuite être pris en charge par une GSNO réductase, libérant ainsi de l'ammoniac et du GSSG (Rusterucci *et al.*, 2007). Le GSNO est considéré comme donneur de NO pour le processus de S-nitrosylation des protéines (Besson-Bard *et al.*, 2008).

La régénération de la forme réduite de l'ascorbate nécessite le glutathion comme donneur d'électron indirect au travers du cycle enzymatique d'Asada-Halliwell (Figure 15 e ; Foyer & Halliwell, 1976). Puis, le glutathion est à nouveau réduit par une glutathion réductase utilisant le NADPH comme cofacteur.

Le repliement, la stabilité et l'activité enzymatique de protéines nécessitent la présence de plusieurs résidus cystéines en formant des ponts disulfures intra/intermoléculaires ou appartenant au site catalytique de l'enzyme. Cependant, les groupements thiols sont sujets à diverses réactions d'oxydation qui modifient les propriétés de la protéine par altération de sa structure. En particulier, en conditions oxydantes, la formation successive d'acides sulphénique (R-SOH), sulphinique (R-SO₂H) et sulfonique (R-SO₃H) des résidus cystéines au sein d'une protéine conduit à une modification oxydative irréversible de celle-ci (Dalle-Donne *et al.*, 2008). Le glutathion peut former un pont disulfure mixte avec le groupement thiol de résidus cystéines, évitant la réaction de ces derniers avec des entités oxydantes ou nitrosatives. Ce processus appelé S-glutathionylation est une modification post-traductionnelle réversible des protéines observée dans les cellules subissant un stress oxydatif chez les bactéries, les animaux ou les végétaux (Masip *et al.*, 2006 ; Cotgreave & Gerdes, 1998 ; Rouhier *et al.*, 2008). Un nombre important de protéines issues de toutes catégories fonctionnelles pouvant subir la réaction de glutathionylation a été identifié et répertorié par Ghezzi *et al.* (2005). Parmi ces protéines, la plupart des enzymes glycolytiques sont régulées par le glutathion, et leur oxydation conduit généralement à leur inactivation. Chez *A. thaliana*, des expériences de radiomarquage à la [³⁵S]cystéine ont montré qu'un traitement oxydant provoquait une forte augmentation du pool de protéines glutathionylées (Dixon *et al.*, 2005). En plus de la protection des fonctions thiols contre l'oxydation, le mécanisme de glutathionylation intervient aussi, chez *E. coli*, dans la régulation de l'activité de certaines enzymes comme la méthionine synthase ou la 3'phosphoadénylsulfate réductase (Masip *et al.*, 2006). Comme chez les animaux, de nombreuses protéines végétales sont régulées par ce mécanisme (Dalle-Donne *et al.*, 2007 ; Michelet *et al.*, 2006). Par exemple, les enzymes impliquées dans le métabolisme primaire telles que la thiorédoxine f, la glycéraldéhyde-3-phosphate

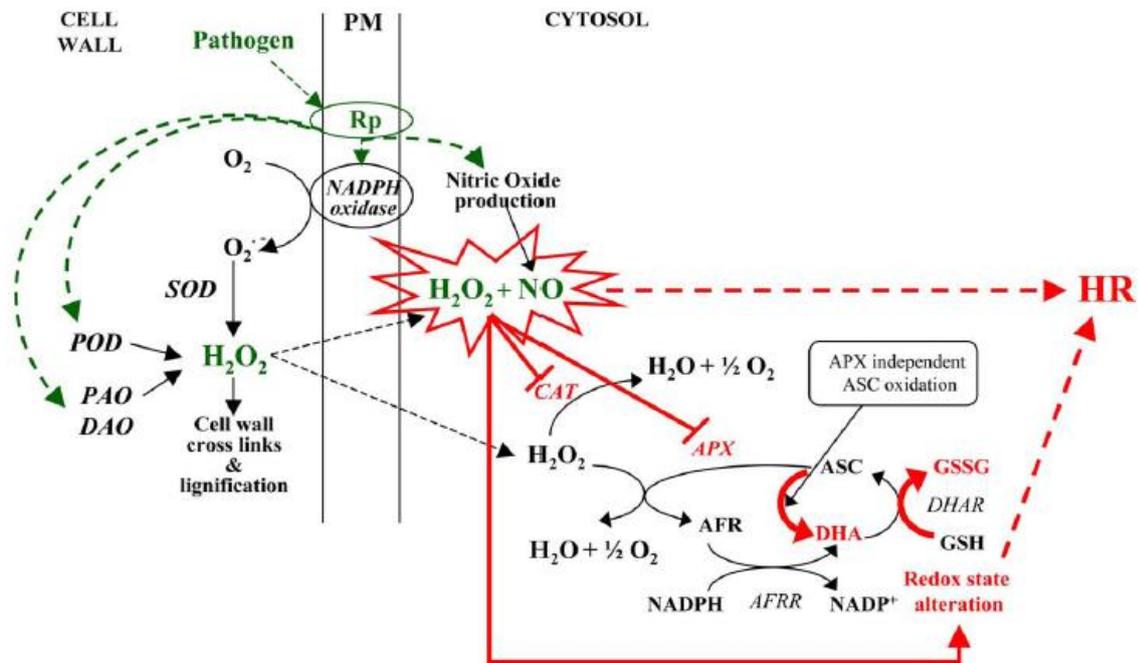


Figure 16. Régulation du système antioxydant dans la mise en place de la réaction hypersensible (RH). La reconnaissance de pathogène provoque la production d' H_2O_2 et monoxyde d'azote (NO), molécules signales impliquées dans l'activation de réponses de défense. Ces molécules agissent sur le système antioxydant en inhibant les enzymes responsables de la dégradation des formes actives de l'oxygène (CAT et APX). La dérégulation du cycle ASC/GSH conduit à une modification de l'état redox cellulaire. Tous ces signaux participent alors à la mise en place de la HR, mort cellulaire localisée, pour confiner le pathogène à son site d'infection. AFR(R) : ascorbate radicalaire réductase, ASC : ascorbate, APX : ascorbate peroxydase, CAT : catalase, DAO : diamine oxydase, DHA(R) : déshydroascorbate (réductase), GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, PAO : polyamine oxydase, PM : membrane plasmique, POD : peroxydase, Rp : récepteur protéique, SOD : superoxyde dismutase. D'après De Gara *et al.*, 2003.

déshydrogénase, la triose phosphate isomérase, la glycine décarboxylase ou encore la tyrosine phosphatase sont inactivées par glutathionylation (Rouhier *et al.*, 2008 ; Michelet *et al.*, 2005 ; Palmieri *et al.*, 2010).

Le mécanisme inverse, la déglutathionylation, est généralement catalysé par deux familles majeures d'oxydoréductases : les glutarédoxines et les thiorédoxines, qui réduisent le pont disulfure établi entre le glutathion et la protéine (Rouhier *et al.*, 2008). La régénération de la glutarédoxine est basée sur l'oxydation d'une nouvelle molécule de glutathion sous forme réduite, qui sera à son tour réduite par la glutathion réductase.

2.3.4.5 L'implication dans la réponse adaptative aux stress biotiques ou abiotiques

Chez les bactéries, plus particulièrement *E. coli*, des expériences utilisant des souches déficientes en glutathion ont mis en évidence le rôle du glutathion dans l'adaptation environnementale de la cellule. En effet, le mutant *gshA* est incapable de croître, par exemple, dans des conditions hyperosmotiques ou d'acidité élevée (Masip *et al.*, 2006). Le lien entre la réponse aux stress abiotiques et le glutathion est confirmé chez différentes espèces de plantes puisque des variations de la concentration en glutathion sont observées chez la tomate, le riz, le tabac ou *A. thaliana* après exposition au froid, à la sécheresse, aux métaux lourds ou à l'excès de lumière et que le mutant d'*A. thaliana cad2* est sensible au cadmium (Mullineaux & Rausch, 2005 ; Cobbett *et al.*, 1998 ; Howden *et al.*, 1995). Concernant les stress biotiques, de nombreuses expériences ont montré que des mutants d'*A. thaliana* déficients en glutathion (*pad2*, *cad2* et *rax1*) présentaient un phénotype de sensibilité plus ou moins marqué aux pathogènes en fonction du taux de glutathion présent dans la plante (Parisy *et al.*, 2007).

L'explication de ces phénotypes provient en partie d'une dérégulation de l'expression des gènes de défense. En effet, les mutants *cad2* et *rax1* d'*A. thaliana* présentent au niveau basal une expression altérée de gènes liés à la défense (Ball *et al.*, 2004). D'autres études ont pu caractériser le mode d'action indirect du glutathion sur la régulation de la transcription. En effet, l'expression du gène *PR-1*, dépendante de la voie du SA chez les plantes, est régulée par l'intermédiaire de l'état redox de NPR-1. Plus précisément, sous conditions réductrices, NPR-1 localisé dans le cytosol sous forme oligomérique est réduit avant d'être transloqué au noyau sous forme monomérique (Mou *et al.*, 2003). Son interaction avec des facteurs de transcription comme TGA1/2 permet l'activation de l'expression du gène de défense *PR-1* (Despres *et al.*, 2003). En amont de la transcription, la transduction du signal en réponse à un stress nécessite aussi l'implication du glutathion. Plusieurs études ont en effet montré que

l'action des FAO dans l'élicitation peut être modulée par le glutathion *via* son rôle d'antioxydant (May & Leaver, 1993). Enfin, le glutathion participe à la mise en place de la RH lors d'une infection par un pathogène (Figure 16). Dans ce contexte, d'après De Gara *et al.* (2003), la production d'H₂O₂ et de NO suite à une attaque de pathogènes dérègle le cycle glutathion/ascorbate. Ainsi, la forme oxydée du glutathion prédomine et conduit à une modification de l'état redox de la cellule qui participe à la mise en place de la RH.

2.3.5 Les mutants *gsh1* d'*A. thaliana* : *pad2*, *cad2*, *rax1* et *rml1*

En plus d'approches biochimiques, l'utilisation de mutants déficients en glutathion permet de compléter les informations relatives à la compréhension du rôle du glutathion dans les différents processus cellulaires. Tout d'abord, des mutants déficients en glutathion chez les bactéries et la levure *Schizosaccharomyces pombe* ont été isolés et caractérisés (Apontoweil & Berends, 1975). Puis, le rôle de *GSH1* d'*A. thaliana* a été caractérisé par complémentation du mutant *gshA* d'*E. coli*, naturellement sensible aux xénobiotiques (May & Leaver, 1994).

De nombreuses études se sont focalisées sur les mutants du gène codant GSH1 chez *A. thaliana* (At4g23100). Ainsi, 4 mutants chimiques EMS sont désormais identifiés : *cad2*, *rml1*, *rax1* et *pad2* (Cobbett *et al.*, 1998 ; Vernoux *et al.*, 2000 ; Ball *et al.*, 2004 ; Parisy *et al.*, 2007). Toutes les mutations sont localisées sur la partie codante du gène (Figure 17 A). Les mutations *cad2* et *rax1* sont localisées sur l'exon 6, *rml1* et *pad2* respectivement sur les exons 7 et 8. La substitution d'une base G en A pour les mutants *rax1*, *rml1* et *pad2* ainsi que la substitution d'une base C en G suivie d'une délétion de 6 nucléotides chez *cad2* engendrent toutes des mutations au niveau de la séquence protéique (Figure 17 B). Chez *cad2*, la protéine présente une substitution de la Val²³⁹ en Leu et une délétion de la Pro²³⁷ et de la Lys²³⁸. Concernant les trois autres mutants, la substitution d'un seul acide aminé est observée : Arg²²⁸ en Lys pour *rax1*, Asp²⁵⁸ en Asn pour *rml1* et Ser²⁹⁸ en Asn pour *pad2*. Grâce à l'étude de la structure cristallographique de la protéine GSH1 chez *B. juncea*, Hothorn *et al.* (2006) ont pu relier la mutation des acides aminés avec le faible taux de glutathion chez les mutants *cad2*, *rax1* et *rml1*. Ainsi, les acides aminés mutés chez *cad2* et *rax1* sont positionnés près du site de fixation de la cystéine, substrat de l'enzyme. Dans le cas de *rax1*, la mutation empêche la fixation de ce substrat. Quant à *rml1*, le résidu Asn muté semble impliqué dans la reconnaissance de l'ATP. Pour ces 3 mutants, la mutation jouerait donc sur l'activité de

l'enzyme au niveau de la fixation d'un substrat et du cofacteur. Cependant, aucune donnée n'est répertoriée concernant la mutation *pad2*.

La faible quantité en glutathion dans ces 4 mutants est associée à un grand nombre de phénotypes plus ou moins marqués.

Le premier mutant déficient en glutathion identifié par Howden *et al.* (1995) chez *A. thaliana* est *cad2*. La croissance des plantules *cad2* âgées de 8 jours est fortement altérée en présence de cadmium dès 3 μM (CdSO_4). En corrélation avec ce phénotype, *cad2* accumule seulement 10 % de phytochélatines par rapport aux plantes sauvages lors du stress cadmié. Ceci s'explique principalement par la faible quantité de leur précurseur, le glutathion, de l'ordre de 20 à 30 % de la teneur du sauvage (Howden *et al.*, 1995). L'identification du gène muté, *GSH1*, et des approches biochimiques ont permis de déterminer que cette déficience en glutathion était due à une faible activité de GSH1, qui conduit à l'accumulation de cystéine et à une faible teneur en γ -glutamylcystéine à l'état basal (Cobbett *et al.*, 1998). Depuis, d'autres études ont montré que la croissance de plantules *cad2* était sensible à d'autres stress comme l' H_2O_2 ou d'autres éléments comme le sélénium, le mercure ou l'arsenic (Hugouvieux *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2006). Parisy *et al.* (2007) ont montré que *cad2* était sensible à l'oomycète *P. brassicae* alors que la mutation n'altère pas les réponses de défense aux souches avirulentes de *H. arabidopsidis* et à *P. syringae* (May *et al.*, 1996). Cependant, une accumulation de camalexine quasi normale (environ 80 % par rapport au sauvage) à 48 h post inoculation (hpi) par *P. syringae* lui permet d'être résistant à cette bactérie. Concernant le processus de développement de la plante, *cad2* montre un phénotype particulier par rapport au sauvage (Bashandy *et al.*, 2010). En effet, l'élongation racinaire de *cad2* est réduite de 20 % et l'initiation des racines secondaires est réduite de 50 % par rapport au sauvage. De plus, le transport polarisé d'hormones, en l'occurrence les auxines, est fortement réduit chez *cad2* (8 % par rapport au sauvage).

Ball *et al.* (2004) ont caractérisé le mutant *rax1* (*regulator of APX2*) qui exprime fortement le gène *APX2* (*ascorbate peroxidase2*) à l'état basal alors que celui-ci est normalement exprimé uniquement lors d'une exposition à une forte lumière. *rax1* contient environ 30 % de glutathion alors que les taux de cystéine et de γ -glutamylcystéine sont semblables à ceux retrouvés chez le sauvage. Une dérégulation de l'expression de gènes, particulièrement des gènes de défense, est observée chez ce mutant. Par contre, une faible sensibilité est observée vis-à-vis de *P. brassicae* et le taux de camalexine après infection par *P. syringae* est voisin de celui rapporté chez le sauvage (Parisy *et al.*, 2007).

Pathogènes	Col-0	<i>pad2</i>	Références
Champignons			
<i>Alternaria brassicicola</i>	R	s	Van Wees <i>et al.</i> , 2003
<i>Botrytis cinerea</i>	s	S	Ferrari <i>et al.</i> , 2003
<i>Erysiphe orontii</i>	R	R	Reuber <i>et al.</i> , 1998
<i>Leptosphaeria maculans</i>	R	R	Bohman <i>et al.</i> , 2004
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	s	S	Parisy <i>et al.</i> , 2007
Oomycètes			
<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	R à S faible	R à S modéré	Glazebrook <i>et al.</i> , 1997
<i>Phytophthora brassicae</i>	R	s	Roetschi <i>et al.</i> , 2001
Bactéries			
<i>P. syringae</i> pv <i>maculicola</i> ES4326	s	S	Glazebrook & Ausubel, 1994
<i>P. s.</i> pv <i>maculicola</i> ES4326 <i>avrRpm1</i>	R	R	Glazebrook & Ausubel, 1994
<i>P. s.</i> pv <i>maculicola</i> ES4326 <i>avrRpt2</i>	R	R	Glazebrook & Ausubel, 1994
<i>P. s.</i> pv <i>tomato</i> DC3000	s	S	Glazebrook & Ausubel, 1994
<i>P. s.</i> pv <i>tomato</i> DC3000 <i>avrRpt2</i>	R	R	Glazebrook & Ausubel, 1994

Tableau II. Etat de résistance ou de sensibilité du mutant *pad2* d'*A. thaliana* envers différents pathogènes. R : résistance ; s : sensibilité ; S : sensibilité accrue. D'après Parisy *et al.*, 2007.

Le mutant *rml1* contient environ 1 à 3 % de glutathion par rapport au sauvage, ainsi qu'une accumulation de cystéine de 300 % (Vernoux *et al.*, 2000). Aucune étude n'a été menée sur sa sensibilité aux stress.

Le mutant *pad2* d'*A. thaliana* a été isolé par approche génétique lors d'un criblage de mutants EMS présentant un faible taux de camalexine après inoculation par *P. syringae* pv. *maculicola* (Glazebrook & Ausubel, 1994). Parmi trois mutants obtenus, *pad2* présentait seulement 10 % de camalexine par rapport au sauvage et s'est révélé sensible à *P. syringae* (Glazebrook *et al.*, 1996). Plusieurs études ont ensuite montré que *pad2* présentait une sensibilité accrue à différents types de pathogènes tels que les nécrotrophes *B. cinerea*, *A. brassicicola*, ou les biotrophes *P. brassicae*, *H. arabidopsidis* (Tableau II) mais également à certains insectes comme *Spodoptera littoralis* (Schlaeppli *et al.*, 2008).

Cette sensibilité est accompagnée par des réponses de défense altérées comme la faible accumulation de camalexine ou la diminution de l'expression de certains gènes de défense. En effet, *pad2* contient entre 10 et 40 % de camalexine par rapport au sauvage après infection par différents types de pathogènes. Concernant les gènes de défense, Roetschi *et al.* (2001) ont montré que l'expression du gène *PR-1*, marqueur de la voie dépendante du SA, est fortement altérée chez *pad2* après inoculation par *P. brassicae*. Ceci montre que la voie de défense dépendante du SA est dérégulée chez *pad2*. En accord avec cette hypothèse, la teneur en SA lors de l'infection s'est révélée de l'ordre de 20 % par rapport à celle mesurée chez les plantes sauvages (Roetschi *et al.*, 2001). De plus, les mêmes observations ont été reportées par Ferrari *et al.* (2003), où l'accumulation de transcrits *PR-1* est plus faible chez *pad2* en réponse à *B. cinerea*. Cependant, les voies dépendantes de l'ET et du JA ne semblent pas affectées chez *pad2* après inoculation par *P. brassicae*, *B. cinerea* et *A. brassicicola*, puisque l'expression du gène marqueur *PDF1.2* est semblable à celle observée chez le sauvage (Parisy *et al.*, 2007 ; Ferrari *et al.*, 2003 ; Van Wees *et al.*, 2003). Comme les phytoalexines, les glucosinolates, composés toxiques accumulés lors d'attaque de pathogènes ou d'insectes herbivores, sont accumulés en plus faible quantité chez *pad2* (60 %) en réponse à l'insecte généraliste *S. littoralis* (Schlaeppli *et al.*, 2008). La synthèse réduite des glucosinolates est corrélée à une sensibilité de *pad2* à l'insecte puisque le poids des larves est 2.5 fois plus élevé que chez le sauvage. Dans ce sens, après inoculation par *P. brassicae*, seulement 50 % des glucosinolates ont été détectés chez *pad2* par rapport au sauvage (Schlaeppli *et al.*, 2010). En plus du phénotype sensible aux pathogènes, *pad2* montre un transport d'auxines fortement réduit comme chez *cad2* (8 % par rapport au sauvage ; Bashandy *et al.*, 2010).

Ainsi, tous ces phénotypes sont en corrélation avec une faible teneur en glutathion (de l'ordre de 20 % du sauvage) et une très forte accumulation en cystéine (500 % par rapport au sauvage ; Parisy *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont présenté les caractéristiques biochimiques des mutants *gsh1* d'*A. thaliana* mais aucune d'entre elles n'a établi de lien entre la signalisation cellulaire, le taux de glutathion et la sensibilité des mutants.

3 LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

D'une manière générale, les événements cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus de mise en place de la résistance des plantes aux pathogènes sont pour l'heure assez bien décrits. Cependant, l'interconnexion entre ces événements dans différents pathosystèmes, autrement dit les mécanismes de défense, n'est pas toujours bien élucidée.

Ainsi, deux axes de recherche ont été définis pour comprendre plus précisément la résistance induite chez la vigne et les mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes chez *A. thaliana*.

Dans un premier chapitre, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la résistance induite par le BABA chez la vigne. Le but de cette étude était d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du phénomène de potentialisation utilisé par le BABA pour conduire à la résistance de cette plante. Pour cela, des suspensions cellulaires de vigne ont été utilisées pour caractériser les événements précoces de signalisation et l'expression de certains gènes de défense induits par le BABA seul, c'est-à-dire en absence de stress biotique. Puis l'effet du prétraitement par le BABA a été étudié sur ces mêmes événements cellulaires en réponse à une élicitation par les OG. Enfin, l'utilisation de plantes inoculées par *P. viticola* préalablement traitées ou non par le BABA a permis d'identifier certains mécanismes impliqués dans la résistance induite de la vigne.

Dans un deuxième chapitre, nous avons cherché à comprendre l'origine de la sensibilité accrue du mutant *pad2* à divers agresseurs. La mutation est localisée au niveau du gène *GSH1* qui code la première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion. De ce fait, ce mutant présente un faible taux de glutathion. Tout d'abord, nous avons cherché à déterminer l'origine de ce faible taux de glutathion. Nous avons ensuite comparé les événements cellulaires et génomiques induits par un stress biotique chez le sauvage et *pad2* pour identifier des gènes et des événements de signalisation clés qui permettent à la plante

sauvage de résister. L'ensemble des résultats obtenus suggère que le glutathion joue un rôle déterminant dans la mise en place d'une réponse cellulaire adaptée au stress perçu.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1 MATERIELS

1.1 Matériels biologiques relatifs à la vigne

1.1.1 Suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv. Gamay) sont cultivées dans le milieu Nitsch-Nitsch (1969, Annexe I) additionné de saccharose (20 g.L⁻¹), d'hydrolysate de caséine (1 g.L⁻¹), d'acide naphthalène-1 acétique (0,1 mg.L⁻¹) et de kinétine (0,2 mg.L⁻¹). Elles sont maintenues sous agitation permanente (120 rpm) en salle climatisée (24°C) et en lumière continue (25 µE.m⁻².s⁻¹). Les suspensions cellulaires sont repiquées en fin de phase exponentielle de croissance tous les 7 jours par addition de 30 mL dans 100 mL de milieu de culture. Pour la mesure des activités biologiques, les suspensions cellulaires saturées à 60-80 % sont diluées au demi par addition de milieu de culture 24 h avant l'utilisation.

Les suspensions cellulaires de vigne transformées par le gène codant l'apoaecorine adressée dans le cytosol sont cultivées dans les conditions précédemment décrites (Vandelle *et al.*, 2006), dans le milieu Nitsch-Nitsch additionné de paromomycine 100 mg.L⁻¹.

1.1.2 Plantes

Les plantes de vigne cv. Marselan (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *Vitis vinifera* cv. Grenache Noir) sont issues de boutures herbacées cultivées en pot individuel sur un substrat terreau/sable/perlite (4/1/1 ; v/v/v) et placées en serre dans les conditions suivantes : 24°C jour, 20°C nuit, hygrométrie 40 % et éclairage naturel complété d'un apport artificiel durant la période hivernale. Les plantes sont arrosées quotidiennement et reçoivent un apport nutritif hebdomadaire (engrais hydrosoluble Plantprod N-P-K 20.20.20 et oligo-éléments). Un apport en chélate de fer (Sequestrène, Syngenta; 1 g.L⁻¹, à raison de 1 mL par plante) est réalisé si nécessaire pour éviter les symptômes de chlorose. Une fumigation de

soufre est réalisée chaque semaine afin de limiter les infections par l'oïdium. Dans ces conditions, des plantes comportant 6 à 8 feuilles étalées, obtenues environ 1 mois après l'enracinement des boutures, sont utilisées pour les expériences.

1.1.3 Agent pathogène : *Plasmopara viticola*

L'inoculum de *P. viticola* utilisé provient d'une population prélevée en Bourgogne en 2002 par le Service Régional de Protection des végétaux de Beaune. Il est entretenu par repiquage chaque semaine sur des plantes de vigne sensibles (Marselan). Les sporanges sont collectés dans l'eau osmosée et leur concentration est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ajustée à 10^4 sporanges.mL⁻¹. Cette suspension est pulvérisée sur la face inférieure des feuilles d'une plante saine qui est ensuite placée à température ambiante, à l'obscurité et avec un taux d'humidité de 100 % pendant au moins 7 h. Les symptômes caractéristiques « tache d'huile » sont visibles sur la face supérieure des feuilles 6-7 jours après l'inoculation par le mildiou. La sporulation est ensuite déclenchée en soumettant la plante à l'obscurité pendant 12 h minimum avec un taux d'hygrométrie supérieur à 90 %.

1.2 Matériels biologiques relatifs à *A. thaliana*

1.2.1 Suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires d'*A. thaliana* écotype Columbia (Col0) sauvage et mutantes *pad2*, initiées au laboratoire à partir de cals provenant de graines (§1.2.2), sont cultivées dans le milieu Gamborg B5 (Gamborg 1968, Annexe I) additionné de saccharose (30 g.L⁻¹) et d'acide naphthalène-1 acétique (0,2 mg.L⁻¹). Elles sont maintenues sous agitation permanente (120 rpm) en salle climatisée (24°C) et en lumière continue (25 µE.m⁻².s⁻¹). En fin de phase exponentielle de croissance, les suspensions cellulaires sont repiquées par ajout de 25 mL dans 100 mL de milieu de culture. A saturation, elles sont diluées au demi par addition de milieu de culture 24 h avant la mesure des activités biologiques.

1.2.2 Plantes

Le mutant *pad2* a été obtenu par traitement chimique à l'EMS dans le fond génétique Col0. Les graines de tous les mutants utilisés ont été fournies par le laboratoire du Pr. Félix Mauch (Université de Fribourg, Suisse) ou par le Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Les plantes Col0 et *pad2* ont été transformées par “floral dip” avec la construction GXR1-roGFP2 selon Clough & Bent (1998).

Les plantes issues de graines semées sur motte de tourbe (Jiffy-7) sont cultivées dans une chambre de culture climatisée dans les conditions suivantes : 10 h de jour à 20°C avec une intensité lumineuse de 175 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et une humidité relative de 70 %, 14 h de nuit à 18°C avec une humidité relative de 95 %. Après 15 jours, 4 ou 8 semaines de croissance, les plantes sont utilisées pour les expériences.

1.2.3 Agents pathogènes

1.2.3.1 *Hyaloperonospora arabidopsidis*

La souche NOCO de *H. arabidopsidis*, fournie par l'équipe du Dr. B. Mauch-Mani (Université de Neuchâtel, Suisse), est entretenue chaque semaine sur des plantes d'*A. thaliana* écotype Col0 de 2 semaines. Les conidies sont collectées en plaçant les feuilles sporulantes dans une solution de MgSO_4 10 mM et la concentration est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ajustée à $5\cdot 10^4$ sporanges. mL^{-1} . Cette suspension est pulvérisée sur des plantes saines qui sont placées 24 h à l'obscurité avec un taux d'humidité de 100 %. La sporulation est déclenchée 6 jours après inoculation en maintenant une humidité de 100 % pendant 24 h.

1.2.3.2 *Phytophthora brassicae* souche D

Entretien : *P. brassicae* souche D, fourni par le Pr. F. Mauch (Université de Fribourg, Suisse), est cultivé en boîte de Pétri sur milieu solide V8 20 % (jus de légumes commercial), CaCO_3 3,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, agar 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5, dans une chambre de culture climatisée à l'obscurité à 19°C et repiqué toutes les semaines par dépôt de mycélium sur un milieu neuf.

Production de zoospores : 15 disques de milieu V8 solide (7 mm de diamètre) contenant le mycélium de 10 à 12 jours de croissance sont placés dans 10 mL de milieu stérile V8 10 %, CaCO_3 3,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5, clarifié (filtré sur papier Whatman) à 19°C à l'obscurité.

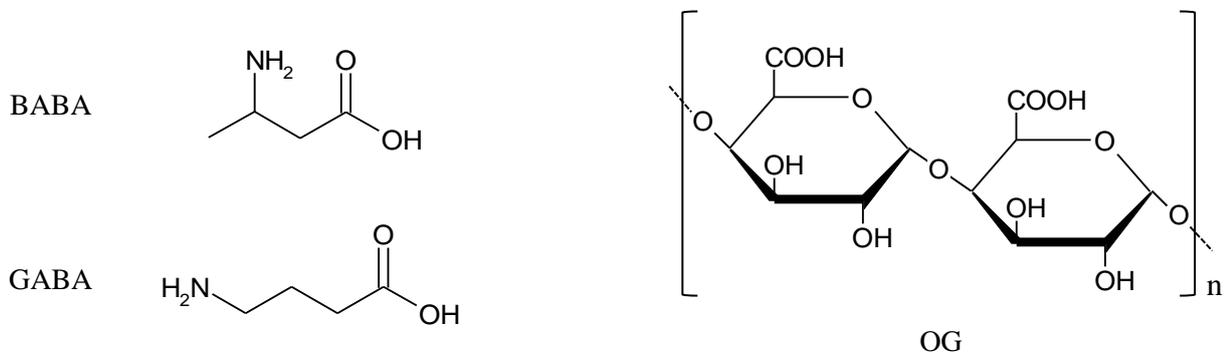


Figure 18. Structure chimique de l'acide β -aminobutyrique (BABA), son analogue l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et des oligogalacturonates (OG ; degré de polymérisation n entre 9 et 20).

Après 4 jours de croissance du mycélium en milieu liquide, le milieu V8 est remplacé par 10 mL d'une solution de Schmitthenner (KH_2PO_4 0,6 mM, K_2HPO_4 0,4 mM, $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mM, $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 7,7 μM , $\text{FeSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ 1,8 μM , $\text{MnCl}_2,\text{H}_2\text{O}$ 0,2 μM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2,4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM) afin d'induire la production de sporangiophores en 4 jours (Roetschi, 2001). La libération des zoospores est réalisée en remplaçant la solution de Schmitthenner par 10 mL d'eau ultrapure à 4°C puis laissée pendant 3 h minimum à l'obscurité et à 4°C. La mobilité des zoospores est vérifiée au microscope et la concentration en zoospores dans l'eau est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ajustée à 10^5 zoospores.mL⁻¹. La suspension de zoospores doit être manipulée avec précaution afin d'éviter l'enkystement des zoospores induit par le stress mécanique.

1.3 Eliciteurs et potentialisateurs

Les solutions mères d'acide β -aminobutyrique (BABA) et d'acide γ -aminobutyrique (GABA) sont préparées à 500 mM dans l'eau ultrapure (Sigma-Aldrich). Les oligogalacturonates (OG ; oligomères d'acide α -1,4-D-galacturonique) sont fournis sous forme lyophilisée par la société Goëmar SA (Roscoff, France) et la solution mère est préparée extemporanément à 50 mg.mL⁻¹ dans l'eau ultrapure (Figure 18).

1.4 Composés pharmacologiques

La solution mère de l'acide niflumique est préparée à 20 mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; 25 % ; v/v) et KOH 1N (25 % ; v/v). Le diphenylène iodonium (DPI) est préparé à 10 mM dans le DMSO pur. L'acide niflumique est utilisé à une concentration finale de 200 μM et le DPI à 5 μM . Pour les témoins, les mêmes volumes de solvants sont utilisés. Dans les expériences, la concentration finale de DMSO ne dépasse pas respectivement 0,25 % et 0,05 %.

2 METHODES

2.1 Traitement des suspensions cellulaires

Avant l'expérience, les cellules de vigne ou d'*A. thaliana* diluées au demi 24 h auparavant (voir § 1.1.1 et 1.2.1) sont lavées 3 fois avec le tampon M10 (MES 10 mM, D-mannitol 175 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM) respectivement à pH 5,5 ou 6,2 et re-suspendues à raison de 0,1 g de poids frais de cellules (PFC)/mL pour équilibration 2 h à 24°C sous agitation permanente (120 rpm). Les cellules de vigne sont ensuite traitées par le BABA à 0,05 ; 0,5 ; 5 ou 50 mM ou les OG à 0,5 mg.mL⁻¹. Les cellules d'*A. thaliana* sont traitées avec les OG à 0,5 mg.mL⁻¹. Les suspensions cellulaires contrôles sont traitées par un volume équivalent d'eau.

Lors de l'utilisation d'inhibiteurs, les cellules sont traitées par la molécule inhibitrice 10 min avant le traitement.

Pour l'étude de la potentialisation des événements de signalisation sur suspensions cellulaires de vigne, les cellules sont prétraitées dans le milieu de culture par le BABA, le GABA à 500 µM ou l'eau 24 h avant l'élicitation par les OG (0,5 mg.mL⁻¹). Les cellules sont ensuite préparées dans le tampon M10 comme présenté ci-dessus puis équilibrées 2 h avant l'élicitation par les OG.

2.2 Traitement des feuilles détachées ou disques foliaires

Les feuilles de vigne de rang 2 (en partant du haut) sont traitées par absorption pétiole avec le solvant ou 5 µM de DPI pendant 24 h dans les conditions 24°C/18°C (jour/nuit) avec une photopériode de 11 h et un taux d'humidité de 45 ± 5 %. Les pétioles sont ensuite placés dans l'eau et les feuilles sont traitées par pulvérisation avec une solution de BABA à 30 mM sur les faces supérieure et inférieure jusqu'au point de ruissellement pendant 24 h.

Les disques foliaires d'*A. thaliana* (7 mm de diamètre) sont prélevés sur des plantes de 8 semaines, à raison de 6 disques par plante et 2 plantes par temps de cinétique, puis infiltrés sous vide pendant 2 min avec une solution de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contenant les OG à 2,5 mg.mL⁻¹.

						
Indice de sporulation	0	1	2	3	4	5
Pourcentage de sporulation	0	1-10	10-25	25-50	50-75	75-100%

Figure 19. Evaluation de la résistance des feuilles de vigne à *P. viticola* en déterminant le taux de sporulation du pathogène. La surface sporulante de chaque disque est évaluée à 7 jours post-inoculation.

2.3 Inoculation des plantes par des pathogènes et observation du développement des pathogènes

2.3.1 Vigne – *P. viticola*

2.3.1.1 Inoculation des feuilles de vigne par *P. viticola*

Après traitement par le BABA (§ 2.2), les feuilles sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de sporanges à 10^4 mL⁻¹ sur la face inférieure et sont placées dans les mêmes conditions que précédemment (§ 2.2) jusqu'aux temps de prélèvement des disques.

2.3.1.2 Observation microscopique de *P. viticola* par coloration histochimique au bleu d'aniline

Le développement de *P. viticola* dans les tissus foliaires est observé par coloration des parois fongiques au bleu d'aniline sur les mêmes disques que ceux soumis à la détection de la production d'H₂O₂ par le diamino-benzidine (DAB ; § 2.10.2). Une fois colorés par le DAB, les disques sont décolorés pendant une nuit dans du méthanol, clarifiés dans une solution d'hydrate de chloral à 2,5 mg.mL⁻¹ pendant une nuit minimum puis lavés avec du tampon phosphate 0,1 M pH 8 pendant une journée. Ils sont ensuite placés dans une solution de bleu d'aniline (tampon phosphate disodique 0,2 M, bleu d'aniline 0,05 % m/v, pH 8) pendant une nuit puis montés entre lame et lamelle dans la solution de bleu d'aniline. L'observation de la face inférieure des disques foliaires en microscopie à épifluorescence permet de visualiser le pathogène (Leica Leitz DM RB, filtre UVA, $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm, filtre d'arrêt LP : 425 nm).

2.3.1.3 Tests de résistance des feuilles à *P. viticola*

Après inoculation des feuilles par *P. viticola*, des disques foliaire de 1 cm de diamètre sont placés dans une boîte sur du papier Whatman dans les conditions 24°C/18°C (jour/nuit) avec une photopériode de 11 h et un taux maximal d'humidité. Le taux de sporulation est déterminé 7 jours après inoculation en évaluant la surface sporulante de chaque disque. Six classes de 0 à 5 sont établies selon le pourcentage de surface sporulante ; 0 : aucune sporulation visible, 1 : 1 à 10 %, 2 : 10 à 25 %, 3 : 25 à 50 %, 4 : 50 à 75 % et 5 : 75 à 100 % (Figure 19).

2.3.1.4 Effet du BABA sur la viabilité *in vitro* et germination *in vivo* des zoospores de *P. viticola*

Une suspension de 1.10^5 sporanges.mL⁻¹ est incubée 1 h à température ambiante avec de l'eau ou une solution de BABA à une concentration finale de 30 mM. La viabilité des zoospores libérées est déterminée en observant leur mobilité par comptage du nombre de zoospores qui traversent un carré d'un volume de 0.1 µL d'une cellule de Malassez, pendant une minute. Elle est ainsi exprimée en nombre de zoospores mobiles.min⁻¹.µL⁻¹.

Les plantes entières sont traitées par pulvérisation des feuilles avec de l'eau ou une solution de BABA à 30 mM 2 h avant l'inoculation par une suspension de sporanges à 1.10^5 sporanges.mL⁻¹. Le développement du pathogène est suivi au microscope par coloration au bleu d'aniline (§ 2.3.1.2) en observant les zoospores enkystées et le développement des hyphes respectivement à 1 et 2 jours après inoculation.

2.3.2 *A. thaliana* – *H. arabidopsidis*

2.3.2.1 Inoculation des plantes d'*A. thaliana* par *H. arabidopsidis*

Pour chaque condition, 30 plantes de 15 jours regroupées dans un seul pot sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de conidies à 5.10^4 mL⁻¹ dans les conditions de 9 h de photopériode, 22°C jour, 18°C nuit, avec 100 % humidité pendant 24 h.

2.3.2.2 Observation du développement du pathogène

La sporulation du pathogène est observée 6 jours après inoculation en plaçant les plantes dans des conditions d'humidité proche de 100 %. Les conidies sont récoltées dans de l'eau et leur nombre est déterminé avec une cellule de Malassez. Le développement du pathogène est estimé par le nombre de conidies par gramme de poids frais de feuille.

2.3.3 *A. thaliana* – *P. brassicae*

2.3.3.1 Inoculation des plantes d'*A. thaliana* par *P. brassicae*

Les plantes de 4 semaines sont inoculées en déposant un disque d'agar de 7 mm de diamètre contenant le mycélium de 8 jours ou une goutte de 20 µL d'une suspension de

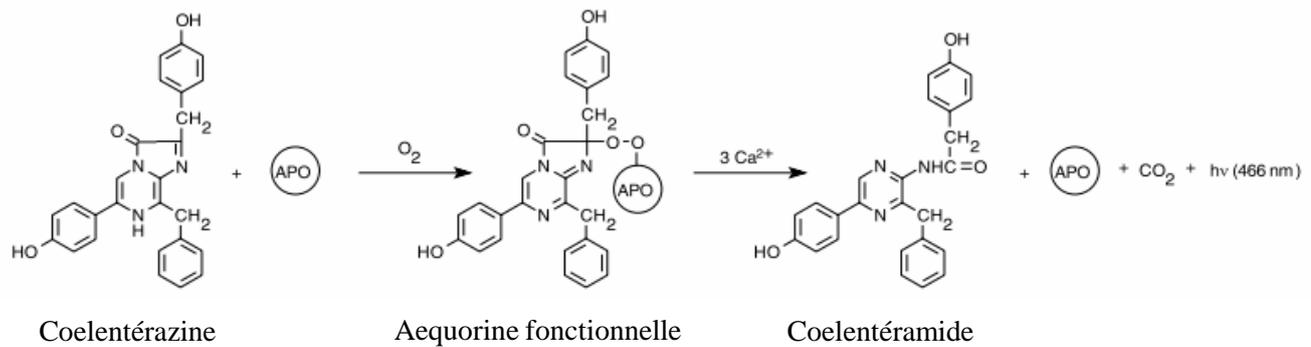


Figure 20. Reconstitution *in vivo* de l'aequorine fonctionnelle avec la coelentérazine.

L'aequorine fonctionnelle est reconstituée via la coelentérazine. L'interaction de 3 ions Ca^{2+} avec l'aequorine fonctionnelle induit un changement de conformation qui permet l'oxydation de la coelentérazine en coelentéramide. Le retour à l'état basal de cette molécule s'accompagne d'une émission de luminescence proportionnelle à la concentration en Ca^{2+} libre. Ainsi, en adressant l'aequorine dans un compartiment cellulaire particulier, on peut suivre par mesure de luminescence les variations de la concentration en Ca^{2+} libre dans ce même compartiment. APO : apoaequorine.

zoospores à 10^5 mL^{-1} sur 5 à 6 feuilles adultes par plante puis placées dans la chambre de culture à 19°C avec une humidité maximale et à l'obscurité pendant 14 h minimum.

2.3.3.2 *Observation du développement du pathogène*

La résistance de Col0 et l'hypersensibilité de *pad2* à *P. brassicae* sont vérifiées à la fin de l'expérience en évaluant le développement du pathogène 7 jours après inoculation. La surface foliaire infectée est alors estimée visuellement par observation des symptômes « water-soaked » des feuilles.

2.3.3.3 *Observation de la réaction hypersensible*

La réponse hypersensible (RH) a été suivie au laboratoire du Pr. F. Mauch (Université de Fribourg, Suisse) par observation microscopique après coloration au bleu trypan. Brièvement, les feuilles d'*A. thaliana* infectées par *P. brassicae* sont collectées à 1 et 7 jours après inoculation puis placées dans une solution de bleu trypan (10 g de phénol, 10 mL de glycérol, 10 mL d'acide lactique, 10 mL d'eau et 0,02 g de bleu trypan ; dilution au 1/2 avec de l'éthanol à 100 % pour utilisation) que l'on fait bouillir pendant 1 min puis elles sont laissées une nuit à température ambiante. Les feuilles sont ensuite décolorées avec une solution d'hydrate de chloral à $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ avant d'être observées au microscope (Leitz DM RB, Leica).

2.4 Variations de la concentration en calcium cytosolique libre sur suspensions cellulaires de vigne exprimant l'aequorine cytosolique

Les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ sont mesurées par la luminescence émise par l'aequorine fonctionnelle dans des suspensions cellulaires de vigne transformées par le gène codant l'apoequorine. La protéine fonctionnelle aequorine est reconstituée *in vivo* en pré-incubant les cellules pendant 3 h à l'obscurité dans le milieu M10 avec le cofacteur coelentérazine $3 \mu\text{M}$ (Calbiochem ; § 2.1; Figure 20). Après reconstitution, 250 μL de la suspension cellulaire sont prélevés et transférés dans un tube contenant les molécules à tester. La luminescence est enregistrée chaque seconde à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB 9507, Berthold) et exprimée en unité relative de luminescence (url). Ces valeurs sont converties en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ grâce à l'équation établie par Allen *et al.* (1977). Cette équation prend en compte la

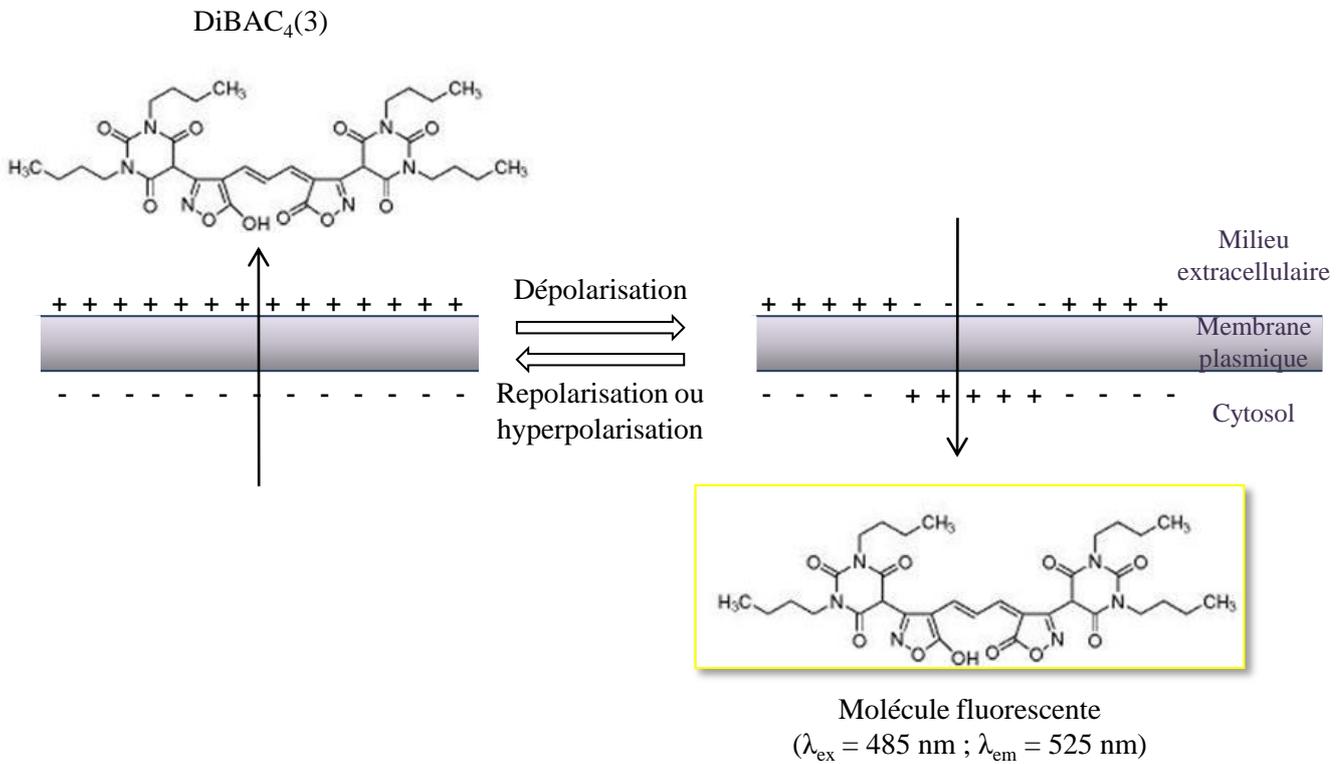


Figure 21. Mesure du potentiel électrochimique de la membrane plasmique à l'aide d'une sonde fluorescente DiBAC₄(3).

Lors d'une dépolarisation membranaire, le DiBAC₄(3) traverse la membrane plasmique grâce à sa forme anionique et se fixe aux protéines et aux lipides de la membrane plasmique. Cette association dans le cytosol conduit à une augmentation de sa fluorescence. A l'inverse, une repolarisation ou hyperpolarisation de la membrane plasmique conduit à la sortie de la sonde et donc à une diminution de sa fluorescence.

luminescence émise lors de l'expérience mais aussi la luminescence totale susceptible d'être émise par l'échantillon si toute l'aequorine reconstituée était fixée par le Ca^{2+} . Ainsi, à la fin de chaque expérience, les cellules sont lysées par ajout de 300 μL de tampon de lyse contenant du Ca^{2+} en excès (CaCl_2 10 mM, Nonidet P40 2 % v/v, éthanol 20 % v/v) et la luminescence émise est enregistrée jusqu'à un retour au niveau basal.

Selon l'équation établie par Allen *et al.* (1977), la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ est à chaque instant $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = [(L_0/L_{\text{max}})^{1/3} + 55 (L_0/L_{\text{max}})^{1/3} - 1] / [2.10^6 - 2.10^6 (L_0/L_{\text{max}})^{1/3}]$

L_0 correspond à chaque valeur d'url obtenue pendant l'expérience

L_{max} représente la totalité de la luminescence émise par 250 μL de cellules (pendant l'expérience et le déchargement de l'aequorine résiduelle dans les cellules), $L_{\text{max}} = \Sigma L_0 + \Sigma L_r$

L_r correspond à chaque valeur d'url obtenue pendant le déchargement de l'aequorine résiduelle dans les cellules.

2.5 Variations du potentiel électrochimique de la membrane plasmique sur suspensions cellulaires

Les variations du potentiel électrochimique de la membrane plasmique sont mesurées à l'aide d'une sonde fluorescence, le DiBAC₄(3) (Bis(1,3-dibarbituric acid)-triméthine oxonol, Sigma-Aldrich). En raison de sa charge anionique, la sonde traverse la membrane plasmique lorsque celle-ci est dépolarisée et s'associe aux protéines et lipides de la membrane, conduisant à une augmentation de la fluorescence (Figure 21 ; Willmott *et al.*, 2000). Grâce à sa charge négative élevée, le DiBAC₄(3) est exclu des mitochondries et constitue donc une sonde sélective pour le potentiel électrochimique de la membrane plasmique. Ce processus est réversible, une repolarisation de la membrane plasmique induisant un efflux net de la sonde. En pratique, les cellules de vigne ou d'*A. thaliana* sont équilibrées dans le tampon M10 (§ 2.1) additionné de DiBAC₄(3) à 10 μM pendant 1 h à l'obscurité. Puis 500 μL de suspensions cellulaires sont placés dans une plaque contenant 24 puits (Costar). Après traitement des cellules, la plaque est immédiatement placée dans le fluorimètre (Mithras LB 940, Berthold) avec $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm et $\lambda_{\text{émission}}$ 535 nm. La fluorescence émise est mesurée toute les minutes puis exprimée en unités relatives de fluorescence (urf). Les cellules sont maintenues en suspension par agitation constante à 24°C durant toute l'expérience.

2.6 Analyse des protéines par immunodétection par western blotting

Les extraits protéiques sont obtenus par broyage des cellules de vigne (0,2 g) ou des disques d'*A. thaliana* (60 mg) dans l'azote liquide et par ajout de 350 μ L de tampon d'extraction (HEPES-KOH 50 mM, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, β -glycéro-phosphate 50 mM, NaF 10 mM, leupeptine 5 mg/L, antipaine 5 mg/L, PMSF 1 mM et DTT 5 mM, pH 7,5). Pour l'étude des formes réduite et oxydée de GSH1, les protéines totales sont extraites avec le tampon précédemment décrit contenant ou non du DTT 5 mM. Après centrifugation (15 min, 20000 g, 4°C), une aliquote du surnageant est prélevée pour quantifier les protéines par spectrophotométrie selon la méthode de (Bradford, 1976) en utilisant comme standard la sérum-albumine bovine (SAB) puis 300 μ L de surnageant sont prélevés et traités par du tampon (Laemmli, 1970) à 95°C pendant 5 min. Dans le cas de GSH1, le surnageant est traité par du tampon Laemmli avec ou sans DTT (0,1 M) à 65°C pendant 5 min. Dix à 15 μ g de protéines sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 ou 12 % en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE) dans un tampon de migration (Tris 250 mM, glycine 1,92 M, SDS 0,5 % m/v). Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (BioRad) et du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,019 % m/v, méthanol 20 % v/v) pendant 35 min à 15 V. Le transfert des protéines sur la membrane est vérifié avec la coloration au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5 % m/v, acide acétique 1 % v/v) puis éliminée à l'eau osmosée. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C dans un tampon TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 % v/v) avec 1 % de SAB (m/v) afin de saturer les sites de fixation de la membrane. La membrane est ensuite incubée pendant 1h30 à température ambiante en présence de l'anticorps primaire dans le tampon TBST + SAB 1 %. Trois anticorps primaires ont été utilisés : Les MAPK totales sont détectées en utilisant un anticorps primaire (dilution au 1000^{ème}) dirigé contre les protéines humaines inactives ERK1/2 (Cell Signaling). La forme phosphorylée des MAPK est détectée en utilisant un anticorps primaire (dilution au 1000^{ème}) dirigé contre un peptide synthétique contenant Thr202/Tyr204 phosphorylées correspondant aux résidus Thr202/Tyr204 de ERK1/2 phosphorylées (Cell Signaling). Les formes réduite et oxydée de GSH1 sont détectées en utilisant un anticorps polyclonal primaire de lapin (dilution au 5000^{ème}), dirigé contre un peptide recombinant d'AtGSH1, fourni par le laboratoire du Pr. Joseph Jez (Saint Louis, Missouri, USA).

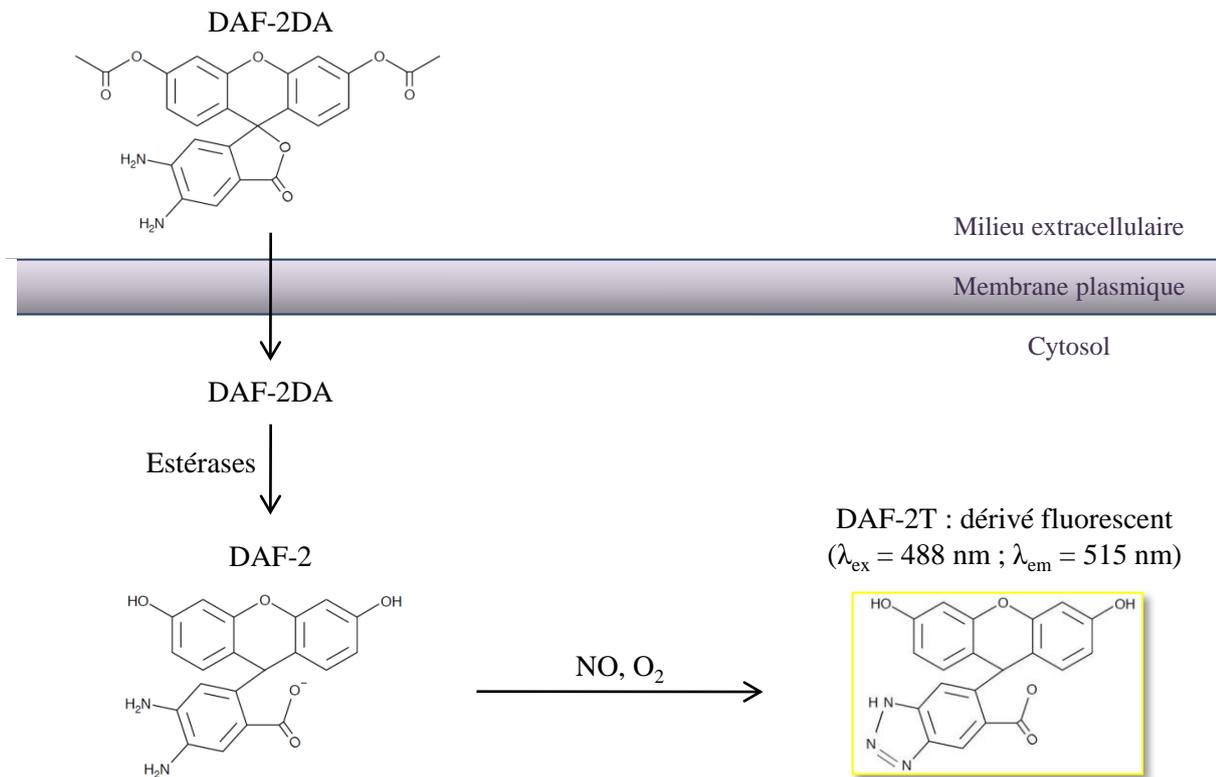


Figure 22. Mesure d'accumulation de NO intracellulaire avec la sonde fluorescente DAF-2DA.
 Le DAF-2DA traverse la membrane plasmique grâce à ses 2 groupements acétates qui sont clivés dans le cytosol par des estérases. Le DAF-2 libéré réagit avec le NO et ses dérivés en présence d'O₂ pour former un dérivé triazole fluorescent DAF-2T.

La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 10 min dans du TBST puis incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich) dilué au 60000^{ème} dans le tampon TBST + SAB 1 %. Après 3 lavages pendant 10 min avec le tampon TBST, la révélation du western blot est réalisée par chimioluminescence à l'aide du kit de détection LumiGlo (Cell Signaling).

En parallèle de l'immunodétection, la même quantité de protéines de chaque échantillon est soumise à migration dans les mêmes conditions puis le gel est coloré pendant au moins 20 min dans une solution de bleu de Coomassie (Coomassie R-250 0,25 % m/v, méthanol 40 % v/v, acide acétique 10 % v/v), puis décoloré au moins 2 h dans une solution de méthanol 15 % (v/v) et d'acide acétique 10 % (v/v). Le gel est ensuite séché sur papier Whatman à l'aide d'un sécheur à gel (GelDryer, Bio-Rad) pour conservation.

2.7 Mesure du NO intracellulaire

La production de NO est déterminée par fluorescence selon Lamotte *et al.* (2004) en utilisant le 4,5-diaminofluorescéine diacétate (DAF-2DA), sonde fluorescente qui pénètre dans la cellule grâce à ses 2 groupements acétates. Après clivage de ces 2 groupements par des estérases intracellulaires, le DAF-2 ainsi libéré réagit spécifiquement avec des produits d'oxydation du NO, principalement le N₂O₃, formant ainsi le DAF-2T, dérivé triazole fluorescent (Figure 22). L'augmentation de la fluorescence qui rend compte de l'accumulation de DAF-2T, et donc de la production de NO, est mesurée grâce à un spectrofluorimètre (Mithras, Berthold, avec $\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 535 \text{ nm}$) et exprimée en unité relative de fluorescence (urf).

Les cellules sont incubées avec 20 μM de DAF-2DA durant 1 h à l'obscurité, sous agitation à 24°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon M10 afin d'éliminer l'excès de sonde fluorescente non internalisée dans les cellules. Un mL de cellules est ensuite placé dans une plaque 24 puits (Costar), soumis au traitement, puis maintenu sous agitation en dehors de l'appareil à 24°C et à l'obscurité entre chaque mesure.

Les disques foliaires d'*A. thaliana* sont prélevés, à raison de 8 disques par condition, puis infiltrés sous vide pendant 2 min avec une solution de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contenant le DAF-2DA 20 μM et le traitement OG. Après 1 h d'incubation à l'obscurité, les disques sont rincés 3 fois avec la solution de Tris-HCl pour éliminer l'excès de sonde fluorescente puis placés dans une plaque de 96 puits (Costar) à raison d'un disque par puits

Séquence des amorces 5' - 3'					
Gènes	Identifiant (NCBI)	Annotation	Sens	Antisens	Tm (°C) d'hybridation
<i>EF1-α</i>	XM_002284888	Elongation Factor 1-α	GAA CTG GGT GCT TGA TAG GC	AAC CAA AAT ATC CGG AGT AAA AGA	60
<i>LOX</i>	XM_002280615	Lipoxygenase	CTG GGT GGC TTC TGC TCT C	GCA TGA ATC TGC GGC TTA TC	60
<i>PAL</i>	XM_002268220	Phenylalanine ammonia-lyase	AGT CTC CAT GGA CAA CAC CCG	TGC TCA GCA CTT TCG ACA TGG	60
<i>PR-2</i>	XM_002277133	β-1,3-glucanase	A TG CTG GGT GTC CCA AAC TCG	CAG AAC AAA CTG CGC AAA CCG T	60
<i>RbohD</i>	XM_002268568	Respiratory burst oxydase homologue D	ACC ATG CTT CAG TCC CTC CAT	AGC GAT CTT CTT GAA GAC TTG TCG CC	60
<i>STS</i>	XM_002263926	Stilbene synthase 1	TAC GCC AAG AGA TTA TCA CT	CTA AAG AGT CCA AAG CAT CT	60

Séquence des amorces 5' - 3'					
Gènes	Locus (TAIR)	Annotation	Sens	Antisens	Tm (°C) d'hybridation
<i>PAD3</i>	At3g26830	Cytochrome P450	TGC TCC CAA GAC AGA CAA TG	GTT TTG GAT CAC GAC CCA TC	50
<i>Peroxydase</i>	At1g14540	Anionic peroxidase	CAC TGG TTC AGA TGG ACA AA	AAC AAA CGA ATT ATC GCT GC	50
<i>PDF1.2</i>	At5g44420	Plant defensin protein	CAC CCT TAT CTT CGC TGC TCT TG	CAC TTG TGT GCT GGG AAG ACA TAG	56
<i>PLA2</i>	At2g26560	Phospholipase A2	AAG AAA AGA AGA TCC GAG AC	ATT CAA ACG TAC AAG TGA CC	50
<i>PR-1</i>	At2g14610	Pathogenesis-related protein 1	ACT ACA ACT ACG CTG CGA ACA C	TGG CTT CTC GTT CAC ATA ATT CCC	56
<i>UBQ10</i>	At4g05320	Polyubiquitin	GGC CTT GTA TAA TCC CTG ATG	GAG ATA ACA GGA ACG GAA ACA TAG	50

TAIR : The Arabidopsis Information Resource

Tableau III: Caractéristiques des gènes de défense étudiés chez la vigne et *A. thaliana*.

contenant 100 µL de solution de Tris-HCl avec le traitement. La plaque de 96 puits est placée dans l'appareil durant toute la durée de l'expérience.

2.8 Etude de l'expression des gènes

2.8.1 PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux sont extraits à partir de 0,1 g de cellules de vigne ou 12 disques foliaires d'*A. thaliana* à l'aide d'un kit d'extraction suivant les recommandations du fabricant (SV total RNA isolation system, Promega). Après transcription inverse sur 1 µg d'ARN dans un volume total de 20 µL (Superscript III reverse transcriptase, Invitrogen), 8 µL d'ADN complémentaires (ADNc) dilués au 1/80 dans l'eau ultrapure sont soumis à une PCR en temps réel dans un volume final de 20 µL avec le mix ABsolute SYBRGreen Rox (ThermoScientific) contenant le fluorophore, la polymérase, les dNTP et le tampon de réaction de l'enzyme. La réaction d'amplification des ADNc est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Sequence Detection System (ABI Prism) selon les conditions suivantes : après une étape de dénaturation de 15 min à 95°C, 40 cycles de 3 étapes de 15 s à 95°C (dénaturation), 30 s (température selon le couple d'amorces utilisé ; hybridation des amorces sur les ADNc), 45 s à 72°C (amplification du brin complémentaire), puis une étape finale (spécificité de la PCR) composée de 15 s à 95°C, 15 s à 72°C et 15 s à 95°C. Grâce à la fluorescence mesurée à l'aide du logiciel SDS (Applied Biosystem), le facteur d'activation de l'expression du gène cible (Tableau III) est calculée selon la méthode de Livak and Schmittgen (2001) comme étant égal à $2^{\Delta\Delta Ct}$; avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{échantillon traité}) - \Delta Ct(\text{échantillon eau})$ et $\Delta Ct = Ct(\text{gène cible}) - Ct(\text{gène de référence})$. Les gènes *Elongation Factor 1α (EF1- α)* et *Polyubiquitin (UBQ10)* sont utilisés comme gènes de référence respectivement chez la vigne et *A. thaliana* (Trouvelot *et al.*, 2008).

2.8.2 Etude transcriptomique

2.8.2.1 Préparation et hybridation des ARN sur les puces microarrays

Les ARN totaux sont extraits à partir de 12 disques foliaires issus de 3 plantes d'*A. thaliana* par condition à l'aide du kit d'extraction précédemment décrit (SV total RNA isolation system, Promega). La qualité des ARN totaux extraits est évaluée en vérifiant sur gel

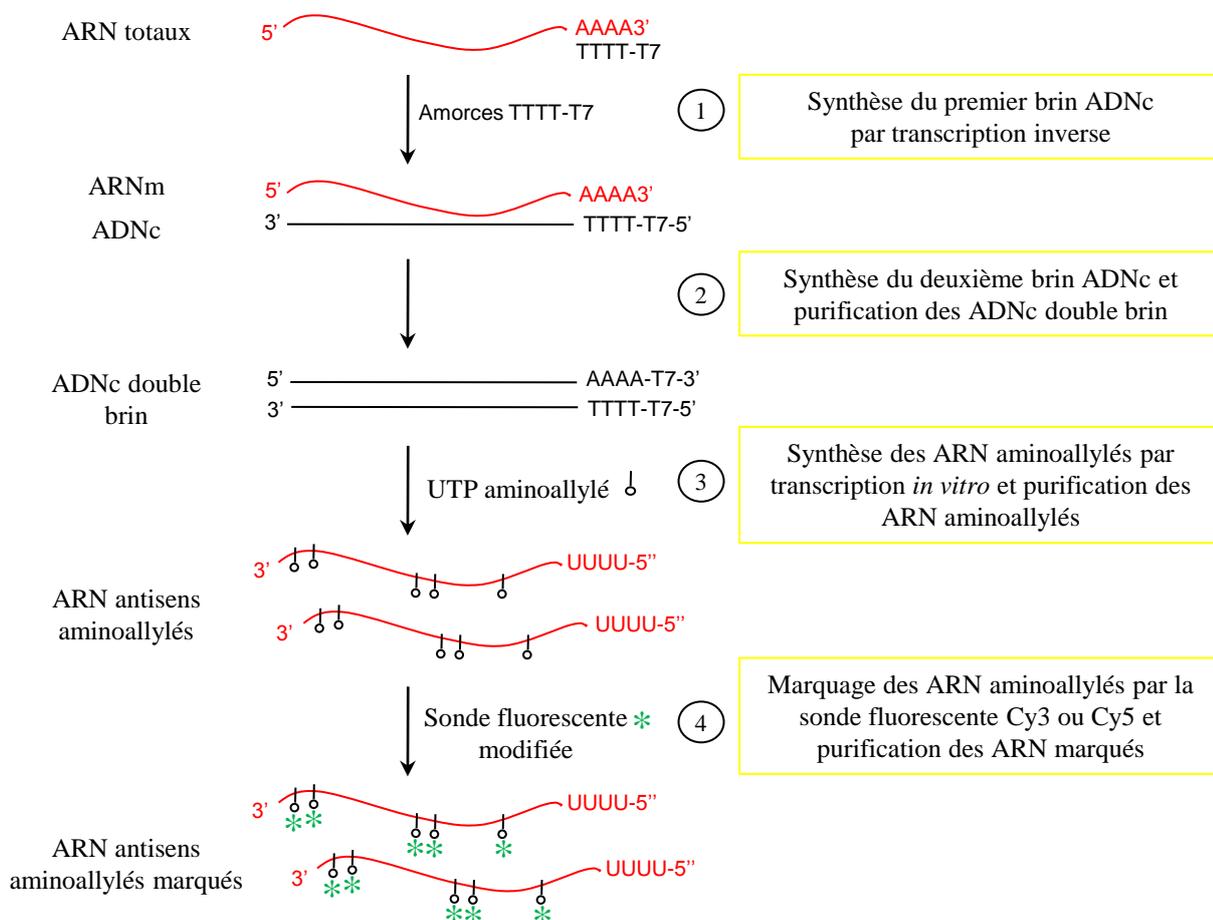


Figure 23. Amplification et marquage des ARN antisens à l'aide du kit Aminoallyl Message Amp II aRNA Amplification pour analyse transcriptomique par microarrays.

Une analyse transcriptomique par microarrays requiert une grande quantité d'ARN totaux (30-50 µg). Pour cela, une étape d'amplification est nécessaire à la préparation des ARN. Cette technique consiste en (1) la **synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse** des ARNm utilisant les amorces oligo(dT) contenant la séquence du promoteur T7. (2) La **synthèse du deuxième brin de l'ADNc** par une ADN polymérase conduit à la formation d'ADNc double brin. Cette étape fait intervenir également une RNase H qui dégrade les ARN. Après leur purification, les ADNc double brin subissent une réaction de (3) **transcription *in vitro*** par l'ARN polymérase T7 générant 100 à 1000 copies d'ARN antisens de chaque ARNm grâce à la technologie Ambion Megascript. La synthèse d'ARN antisens implique l'incorporation d'un nucléotide modifié, le 5-(3-aminoallyl)-UTP. Après purification, (4) le **marquage des ARN antisens aminoallylés** se réalise grâce au couplage entre le groupement aminoallyl porté par l'uracile et le groupement réactif N-hydroxysuccinimide portée par la sonde fluorescente cyanine 3 ou 5 (Cy3 ou Cy5 ; Figure 24).

d'agarose le ratio des ARN 28S/18S (ratio de 2) et en calculant par spectrophotométrie les ratios $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ (ratio > 1,7) et $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ (ratio proche de 2).

Le transcriptome a été analysé à l'Université d'Arizona sur puces Array Ready Oligo Set V3.0 (Qiagen-Operon) pour génome d'*A. thaliana* contenant 26000 oligonucléotides représentant 25240 gènes identifiés. Sont également présents des standards internes permettant d'évaluer le bruit de fond ainsi que d'éventuelles hybridations non spécifiques. La méthode de préparation et d'hybridation des échantillons sur les puces microarrays est présentée en détail sur le site <http://ag.arizona.edu/microarray/methods.html> (Microarray target preparation and hybridization). L'amplification des ARN totaux et leur marquage par les sondes fluorescentes cyanines 3 et 5 (Cy3 et Cy5 ; fluorescence verte et rouge) sont réalisés à l'aide du kit Aminoallyl message amp II a RNA amplification (Ambion ; Figure 23). Brièvement, les ARN totaux (1 µg) sont amplifiés en synthétisant l'ADN complémentaire (ADNc) double brin par transcription inverse. A partir des ADNc double brin purifiés, les ARNm antisens sont ensuite synthétisés par transcription *in vitro* où un nucléotide modifié, le 5-(3-aminoallyl)-UTP, est incorporé. L'ajout d'un groupement aminoallyl sur l'UTP permet un meilleur couplage de l'ARNm avec la sonde fluorescente (Figure 24). Les ARNm modifiés sont ensuite purifiés et couplés à la sonde Cy3 ou Cy5 (Cy3 et Cy5 monoreactive dye GE healthcare). Une étape de purification sur colonne RNeasy MinElute column (Qiagen) des ARNm marqués est nécessaire avant de mesurer l'incorporation des sondes dans les échantillons par spectrophotométrie (Abs_{Cy3} : 550 nm et Abs_{Cy5} : 650 nm). Pour chaque comparaison, les ARNm de 2 échantillons marqués respectivement avec la Cy3 et la Cy5 sont hybridés à 55°C sur une lame de microarrays durant 8 à 12 h. Après lavage avec un tampon SSC (citrate de sodium), les lames sont ensuite scannées pour mesurer l'intensité de fluorescence des 2 sondes et les images sont analysées à l'aide du logiciel GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments). Pour s'affranchir de tout biais relatif au marquage (sondes, oligonucléotides), des inversions de fluorochromes sont réalisées pour chaque analyse comparée (Tableau IV). Ainsi chaque échantillon sera marqué par les deux types de fluorochromes au travers des triplicats biologiques.

2.8.2.2 *Analyses statistiques des données*

Pour chaque puce, les données brutes représentent l'intensité des pixels obtenus à partir de la fluorescence de la Cy3 et de la Cy5 mesurée pour chaque spot. Avant de comparer les paramètres biologiques, il est nécessaire de traiter les données ainsi obtenues. Pour cela, le

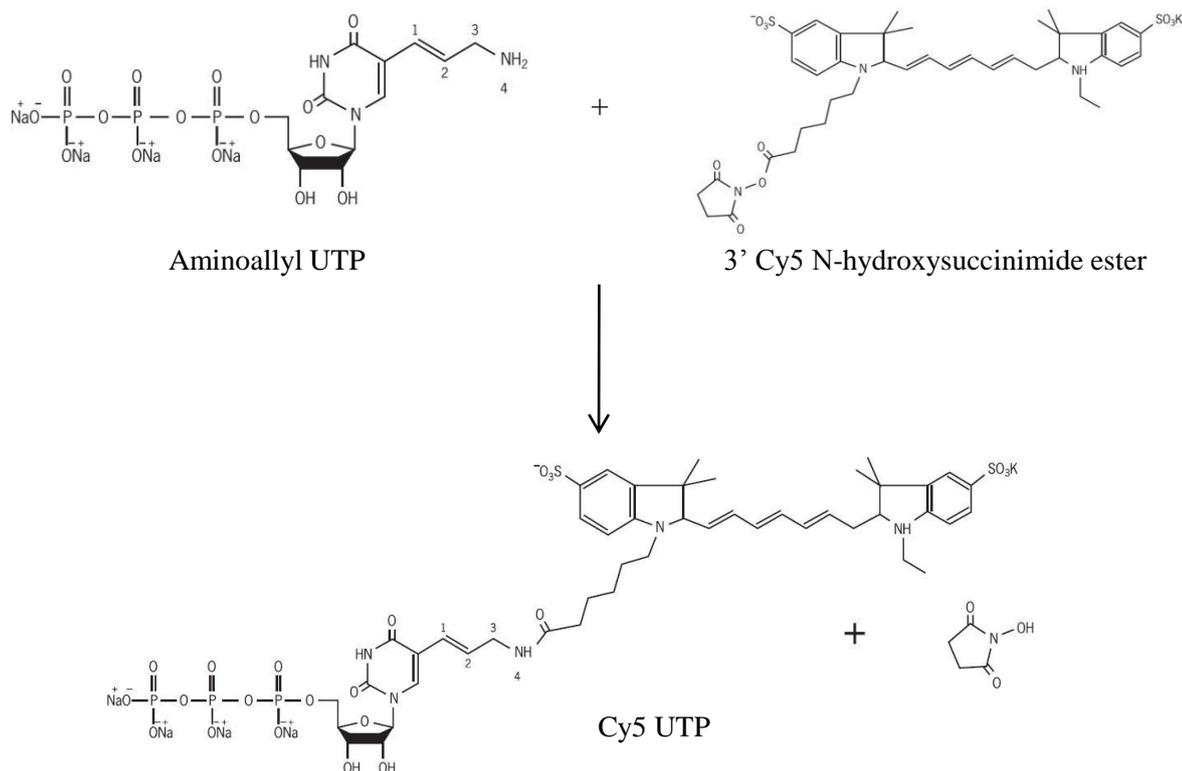


Figure 24. Réaction de marquage des ARN aminoallylés par couplage entre l'uracile et la sonde fluorescente cyanine 5 (Cy5).

La modification de l'UTP et de la sonde Cy5 par ajout respectif de groupement aminoallyl et N-hydroxysuccinimide permet une meilleure réactivité entre les deux molécules. Ainsi, le marquage des ARN se fait par réaction entre le groupement aminoallyl porté par l'UTP en position C5 de l'uracile et le groupement N-hydroxysuccinimide porté par la Cy5.

hybridation	Répétition biologique	Marquage	
		Cy3	Cy5
1	1	Col0 t=0	pad2 t=0
2		Col0 t=1h eau	Col0 t=1h OG
3		pad2 t=1h eau	pad2 t=1h OG
4	2	pad2 t=0	Col0 t=0
5		Col0 t=1h OG	Col0 t=1h eau
6		pad2 t=1h OG	pad2 t=1h eau
7	3	Col0 t=0	pad2 t=0
8		Col0 t=1h eau	pad2 t=1h eau
9		Col0 t=1h OG	pad2 t=1h OG

Tableau IV. Plan d'hybridation des échantillons sur les puces microarrays.

bruit de fond moyen, qui est déterminé grâce aux différents contrôles internes présents sur la puce, est soustrait à l'intensité de chaque spot. Puis, une étape de normalisation centrée des valeurs de fluorescence est effectuée en réalisant, pour chaque spot, le rapport fluorescence/somme des fluorescences de tous les spots de la puce. Ceci permet d'éliminer les biais relatifs à la différence d'émission des fluorochromes utilisés ainsi qu'à d'éventuelles erreurs de quantification et/ou de marquage des ARNm. Puis, pour chaque condition biologique, la moyenne des 3 répétitions biologiques est effectuée.

Afin d'étudier l'impact d'un stress sur l'expression de gènes de manière globale ou ciblée, plusieurs outils ont été choisis en utilisant les programmes TIGR MultiExperiment Viewer 3.0.2 et MapMan 3.1.0.

De manière globale, la comparaison du transcriptome entier entre toutes les conditions est réalisée grâce à une « matrice de distance » et à un tri hiérarchisé des paramètres biologiques (TIGR MultiExperiment Viewer).

Pour étudier précisément les gènes différentiellement exprimés entre 2 conditions, un test de Student apparié issu des 3 répétitions biologiques est réalisé, avec valeur $P \leq 0,01$. Le rapport traité/contrôle est établi afin de sélectionner les gènes dont le niveau de régulation est supérieur à un facteur 2 entre le traité et le contrôle, c'est-à-dire surexprimés (rapport ≥ 2) ou réprimés ($\leq 0,5$) en réponse au traitement. Pour simplifier la lecture, la répression est présentée en valeur négative selon la formule « $-1/\text{rapport}$ ». Ainsi, un rapport de 0,5 est traduit par une régulation de -2. Une classification des gènes obtenus est réalisée selon leur catégorie fonctionnelle (annotations TAIR8 des gènes avec MapMan).

2.9 Mort cellulaire sur suspensions cellulaires

La mort cellulaire est observée en utilisant un colorant vital, le rouge neutre qui permet de visualiser la vacuole en rouge dans les cellules dont l'intégrité membranaire est conservée. Les cellules dont la vacuole est incolore sont considérées comme mortes (Naton *et al.*, 1996). Après 24 h de traitement en conditions stériles, les cellules de vigne sont colorées au rouge neutre 0,01 % (m/v) dans le tampon M10 pH 7 puis lavées plusieurs fois. La mort cellulaire est évaluée par observation microscopique de 500 cellules par condition.

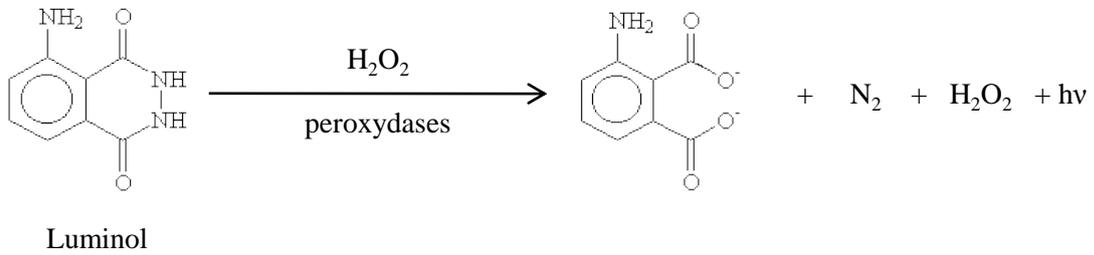


Figure 25. Chimioluminescence du luminol pour mesurer la production d'H₂O₂ sur suspension cellulaire en présence de peroxydases.

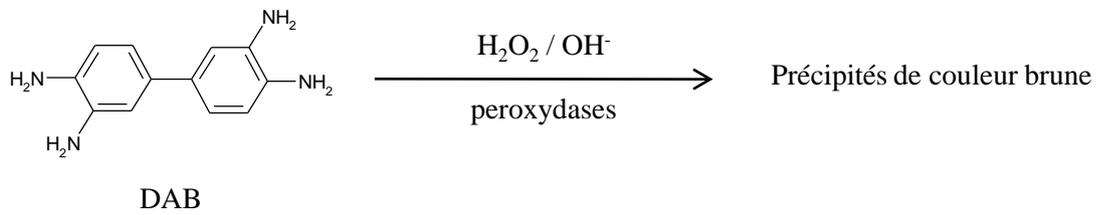


Figure 26. Détection de l'H₂O₂ sur tissus par réaction avec le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) en présence de peroxydases produisant des précipités bruns insolubles.

2.10 Production de FAO

2.10.1 Méthode par chimioluminescence sur suspensions cellulaires

La production d'H₂O₂ dans les suspensions cellulaires est mesurée par chimioluminescence du luminol. La réaction de ce composé avec H₂O₂ en présence de peroxydases s'accompagne d'une émission de luminescence (Figure 25 ; Thorpe & Kricka, 1986). Ainsi, 250 µL de suspensions cellulaires sont mélangés à 300 µL de tampon HEPES-KOH 50 mM, mannitol 175 mM, CaCl₂ 5 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, pH 8,5 et 50 µL de luminol 0,3 mM. La luminescence, mesurée sur une période de 10 s avec un luminomètre (Lumat LB9507, Berthold) est intégrée et exprimée en nmoles d'H₂O₂/g de PFC grâce à une gamme étalon établie par addition de concentrations croissantes en H₂O₂ dans les suspensions cellulaires.

2.10.2 Coloration au DAB sur tissus foliaires

La production d'H₂O₂ sur tissus foliaires est détectée selon la méthode de Thordal-Christensen *et al.* (1997) par réaction de l'H₂O₂ avec le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) en formant des précipités bruns insolubles en présence de peroxydases (Figure 26).

Les pétioles des feuilles de vigne inoculées par *P. viticola* sont placés dans une solution de DAB 1 mg.mL⁻¹ pendant 6 h. La coloration brune des nervures permet de vérifier l'absorption du DAB dans toute la feuille. Des disques foliaires de 7 mm de diamètre sont préparés et placés pendant une nuit dans du méthanol. Ils sont ensuite clarifiés dans une solution d'hydrate de chloral à 2,5 mg.mL⁻¹ pendant une nuit minimum puis lavés avec du tampon phosphate 0,1 M pH 8.

Les feuilles d'*A. thaliana* inoculées par *P. brassicae* sont infiltrées sous vide avec une solution de DAB 1 mg.mL⁻¹ puis placées sur du papier Whatman humide en boîte de Pétri pendant 4 h. Les tissus sont ensuite décolorés dans une solution d'acide lactique/glycérol/éthanol (1/1/3 ; v/v/v) à 85°C pendant 5 min.

Les disques ou les feuilles sont ensuite montés entre lame et lamelle dans du tampon phosphate 0,1 M pH 8 puis observés en microscopie à fond clair (Leica Leitz DM RB). La production d'H₂O₂ est visualisée par l'apparition de précipités colorés en brun.

2.11 Dosage de l'activité catalase totale et mesure de la demi-vie d'H₂O₂ sur suspensions cellulaires

La catalase dégrade l'H₂O₂ selon la réaction suivante :



Son activité est déterminée en suivant la disparition de H₂O₂ par mesure de l'absorbance d'H₂O₂ à 240 nm.

Les extraits protéiques sont obtenus par broyage dans l'azote liquide des cellules d'*A. thaliana* Col0 et *pad2* (0,2 g) et par ajout de 5 mL de tampon d'extraction (phosphate de potassium 100 mM, PMSF 1 mM, polyvinylpolypyrrolidone 1 %, pH 7). Après centrifugation (15 min, 20000 g, 4°C), une aliquote du surnageant est prélevé pour quantifier les protéines par spectrophotométrie selon la méthode de (Bradford, 1976).

L'absorbance d'une solution d'H₂O₂ à 10 mM préparée dans du tampon phosphate 50 mM pH 7 est préalablement mesurée par spectrophotométrie. Elle doit être comprise entre 0,52 et 0,55. Une solution d'H₂O₂ à 10 mM est incubée 5 min à 25°C dans une cuve, puis 10 µL d'extraits protéiques sont ajoutés, pour un volume final de 500 µL. L'absorbance est immédiatement mesurée. Puisqu'une diminution de l'absorbance de 0,05 traduit la dégradation de 3,45 µmol dans 3 mL de tampon, le temps au bout duquel l'absorbance diminue de 0,05 est déterminé pour chaque échantillon. Ainsi, l'activité spécifique de la catalase est calculée et exprimée en unité enzymatique/mg de protéines, sachant qu'une unité enzymatique décompose 1 µmole d'H₂O₂ par minute à 25°C et à pH 7.

Concernant la demi-vie d'H₂O₂, elle est mesurée en déterminant le temps au bout duquel l'absorbance à 240 nm diminue de moitié, reflétant la disparition d'H₂O₂.

2.12 Dosage de l'activité peroxydase totale sur suspensions cellulaires

L'activité peroxydase est déterminée en suivant l'oxydation du guaïacol par mesure de l'absorbance à 470 nm du guaïacol oxydé formé :



Les extraits protéiques sont obtenus par broyage dans l'azote liquide des cellules d'*A. thaliana* Col0 et *pad2* (0,2 g) et par ajout de 5 mL de tampon d'extraction (phosphate de potassium 100 mM, PMSF 1 mM, polyvinylpolypyrrolidone 1 %, pH 7). Après centrifugation (15 min, 20000 g, 4°C), une aliquote du surnageant est prélevée pour quantifier les protéines par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (1976). Dix µL d'extraits protéiques

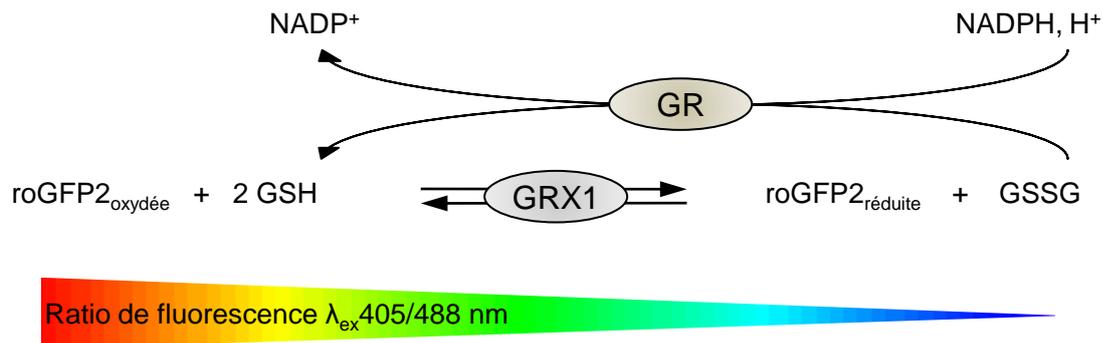


Figure 27. Principe de mesure de l'état rédox du glutathion par oxydation de la roGFP2 via une glutarédoxine. L'état réduit ou oxydé de la GFP sensible à l'état rédox (roGFP2) permet de visualiser en temps réel l'état redox du glutathion au niveau du cytosol. L'oxydation de la roGFP2 par le glutathion oxydé (GSSG) conduit à une augmentation du pic de fluorescence émise par la roGFP2 à $\lambda_{excitation} = 405$ nm au détriment de celui à $\lambda_{excitation} = 488$ nm. Ainsi, le ratio de fluorescence de la roGFP2 à $\lambda_{excitation} = 405$ nm / $\lambda_{excitation} = 488$ nm permet de déterminer le niveau d'oxydation de la roGFP2 dans son environnement. GSH : glutathion réduit, GRX1 : glutarédoxine, GR : glutathion réductase. Modifié d'après Meyer *et al.*, 2007.

dilués au 10^{ème} sont additionnés de 5 mM de guaiacol dans une cuve de spectrophotométrie. Le mélange est pré-incubé quelques minutes à 25°C à l'obscurité puis 5 mM d'H₂O₂ sont ajoutés, pour un volume final réactionnel de 1 mL. Après 15 s d'incubation, l'absorbance du guaiacol oxydé est mesurée à 470 nm grâce à un spectrophotomètre puis l'activité spécifique de la peroxydase est exprimée en unité/mg de protéines, sachant qu'une unité enzymatique décompose 1 µmole d'H₂O₂ par minute à 25°C et à pH 7.

2.13 Imagerie par microscopie confocale à balayage laser et analyse ratiométrique de la fluorescence de la roGFP2

L'état redox du glutathion dans le cytosol est déterminé grâce à l'oxydation d'une GFP sensible à l'état redox (roGFP2) couplée à une glutarédoxine (GRX1) adressée au cytosol (Figure 27). Cette expérience a été réalisée au laboratoire du Pr. Hell (Université d'Heidelberg, Allemagne) selon Schwarzländer *et al.* (2008).

En pratique, la fluorescence de la roGFP2 est analysée dans des feuilles de plantules Col0 et *pad2* exprimant la construction GRX1-roGFP2 âgées de 7 jours. Chaque feuille est placée dans une chambre de perfusion fermée contenant une solution nutritive Murashige et Skoog (MS, Murashige & Skoog, 1962) diluée au demi (débit de 4 mL.min⁻¹) et une solution d'H₂O₂ à 10 mM ou de DTT à 10 mM. La fluorescence de la roGFP2 est observée au microscope confocal (LSM510META, Carl Zeiss MicroImaging) équipé d'un laser avec $\lambda_{\text{excitation}} = 405$ et 488 nm, filtre de bande passante 505 à 530 nm. Après capture des images aux deux longueurs d'onde d'excitation, l'analyse ratiométrique est réalisée en déterminant le rapport des intensités de fluorescence à $\lambda_{\text{ex}} 405/488$ nm de chaque pixel.

CHAPITRE I

MODE D'ACTION DE L'ACIDE BETA-AMINOBUTYRIQUE CHEZ LA VIGNE, UN INDUCTEUR DE RESISTANCE

CHAPITRE I :

MODE D'ACTION DE L'ACIDE BETA-AMINOBUTYRIQUE CHEZ LA VIGNE, UN INDUCTEUR DE RESISTANCE

1 RESUME DE LA PUBLICATION 1

L'acide β -aminobutyrique (BABA), un acide aminé non protéique et non métabolisé par les plantes, est capable d'induire une résistance chez de nombreuses espèces végétales en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Cohen *et al.*, 1994 ; Jakab *et al.*, 2001). De nombreuses études ont montré que, dans la plupart des cas, la résistance induite par le BABA utilise le phénomène de potentialisation. Plus précisément, grâce à un traitement préalable, la plante est capable de mobiliser plus rapidement et/ou plus intensément ses réponses de défense suite à un stress. Cependant, la plupart des mécanismes sous-jacents à la résistance induite par le BABA restent encore inconnus.

Afin de comprendre plus en détail les mécanismes impliqués dans la résistance induite par le BABA chez la vigne, nous avons tout d'abord étudié les événements précoces de signalisation dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par le BABA. Contrairement aux oligogalacturonates (OG), un éliciteur bien connu, le BABA est incapable d'induire des variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, la production de FAO comme H_2O_2 , la production de NO, la phosphorylation de MAPK. De même, les gènes de défense activés par les OG tels que *RbohD*, *STS*, *PAL*, *LOX* et *PR-2* ne sont pas induits par le BABA.

Puis, nous avons montré qu'un prétraitement de 24 h par le BABA avant élicitation par les OG ne modifiait pas la cinétique des événements concernant la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, le NO et les MAPK. Par contre, pour la première fois, nous avons mis en évidence une potentialisation de la production d' H_2O_2 par le BABA sur cellules en réponse aux OG. Nous avons pu confirmer cela sur plantes entières en réponse à l'oomycète *P. viticola*. De plus, en réponse aux OG sur suspensions cellulaires, l'expression du gène *RbohD* codant une NADPH oxydase est plus fortement induite dans les cellules prétraitées par le BABA. *In planta*, un inhibiteur de

NADPH oxydase bien connu chez les mammifères, le diphénylène iodonium (DPI), abolit complètement la production d' H_2O_2 potentialisée, montrant qu'une NADPH oxydase est vraisemblablement impliquée dans ce phénomène. Cependant, l'utilisation du DPI ne réduit que partiellement la résistance induite par le BABA, suggérant que cette production potentialisée d' H_2O_2 contribue mais n'est pas le seul élément de la résistance induite de la vigne à *P. viticola*.

2 PUBLICATION 1 **β -AMINO BUTYRIC ACID PRIMES A NADPH OXIDASE-
DEPENDENT REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION DURING
GRAPEVINE TRIGGERED IMMUNITY**

Carole Dubreuil-Maurizi^{1,2,3}, Sophie Trouvelot^{1,2,3}, Patrick Frettinger^{1,2,3}, Alain Pugin^{1,2,3}, David Wendehenne^{1,2,3} and Benoît Poinssot^{1,2,3,*}

¹ Université de Bourgogne, ² INRA 1088, ³ CNRS 5184, Unité Mixte de Recherche Plante-Microbe-Environnement, 17 Rue Sully, F-21000 Dijon, France.

E-Mails: carole.dubreuil@dijon.inra.fr ; strouvel@dijon.inra.fr ; patrick.frettinger@dijon.inra.fr; pugin@dijon.inra.fr ; wendehen@dijon.inra.fr ;

* corresponding author : benoit.poinssot@dijon.inra.fr ; Tel. +33-380-693-458; Fax: +33-380-693-226

Molecular Plant-Microbe Interactions (2010) **23** (8) : 1012-1021.

ABSTRACT

The molecular mechanisms underlying the process of priming are poorly understood. In the present study, we investigated the early signaling events triggered by β -aminobutyric acid (BABA), a well known priming-mediated plant resistance inducer. Our results indicate that, in contrast to oligogalacturonides (OGs), BABA does not elicit typical defense-related early signaling events nor defense gene expression in grapevine. However, in OG-elicited cells pre-treated with BABA, production of ROS and expression of the respiratory burst oxidase homolog *RbohD* gene were primed. In response to the causal agent of downy mildew *Plasmopara viticola*, a stronger ROS production was specifically observed in BABA-treated leaves. This process was correlated with an increased resistance. The NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI) abolished this primed ROS production and reduced the BABA-induced resistance (BABA-IR). These results suggest that priming of a NADPH oxidase-dependent ROS production contributes to BABA-IR in the *Vitis-Plasmopara* pathosystem.

Keywords : Priming, BABA, early signaling events, *Rboh*, OGs, grapevine, *Plasmopara viticola*.

INTRODUCTION

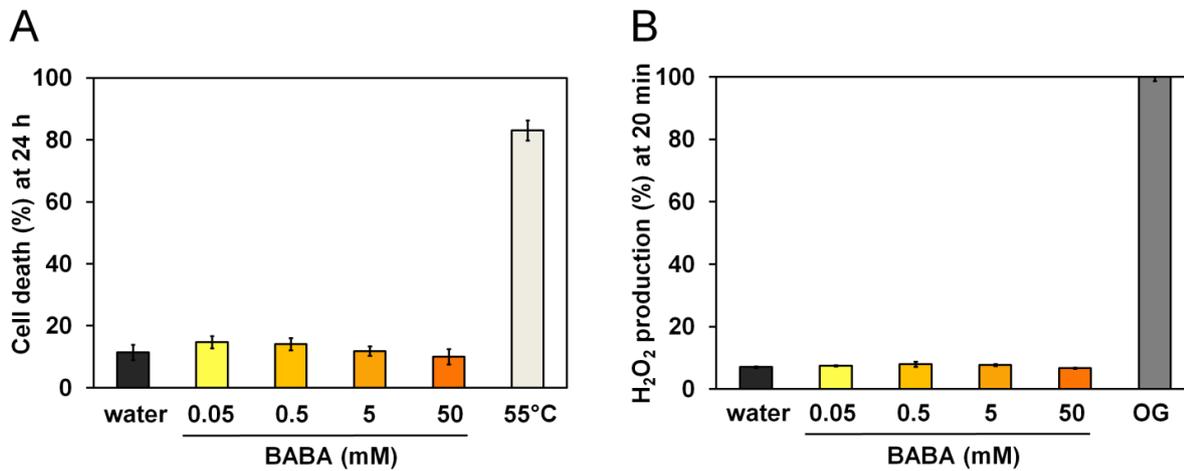
Besides constitutive barriers including cell wall and cuticle, plants develop inducible defense responses to cope with infection by pathogens. The induced defense mechanisms following the plant perception of pathogen-derived elicitors are generally sufficient to trigger plant resistance. General elicitors, also referred to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in innate immunity, are essential components of the pathogen lifestyle and include for instance flagellin, lipopolysaccharides, the elongation factor EF-Tu or products released by plant or pathogen cell wall degrading enzymes (Nurnberger *et al.*, 2004). These last endogenous elicitors are considered as damage-associated molecular patterns (DAMPs; Boller & Felix, 2009). All these compounds are perceived by pattern recognition receptors, as described in animals (Zipfel & Felix, 2005). The binding of elicitors to their corresponding receptors triggers cell signaling cascades which have been extensively studied in the past ten years (Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Gomez-Gomez & Boller, 2002). For example in grapevine, oligogalacturonides (OGs) released from the degradation of plant cell wall were shown to induce changes in free cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and production of reactive oxygen species (ROS ; Poinssot *et al.*, 2003). These events precede the expression of defense-related genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins and enzymes involved in the production of antimicrobial compounds such as phytoalexins (Hammerschmidt, 1999 ; van Loon *et al.*, 2006). ROS are involved in the cell wall strengthening and, at least in several pathosystems, contribute to the development of a localized cell death called hypersensitive response (HR; Torres *et al.*, 2006). In *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that *AtRboh* mutants impaired in the NADPH oxidase-dependent ROS production displayed reduced HR in response to *Pseudomonas syringae* (Torres *et al.*, 2002). Finally, all these biochemical and physiological changes prevent pathogen growth at the infection site.

Upon exposure to certain pathogenic or non-pathogenic organisms, plants show an enhanced capacity to mobilize defense responses against further attack by a broad spectrum of pathogens. This process, also referred to the priming phenomenon, is correlated with a faster and/or stronger activation of defense responses and leads to enhanced resistance (for review, Conrath *et al.*, 2006). Contrary to PAMP-triggered immunity (PTI) and systemic acquired resistance (SAR) which usually confer resistance through the direct elicitation of defense mechanisms, priming phenomenon shows increased defense responses only upon pathogen attack (van Hulten *et al.*, 2006). Thus, well-known biological phenomena such as mutually

beneficial interactions and induced systemic resistance (ISR) need priming for their establishment. For instance, interaction of plants with mycorrhizal fungi or rhizobacteria was shown to enhance their capacity to overcome biotic stresses by priming their defense responses (Pozo *et al.*, 2002 ; van Loon *et al.*, 1998).

The non-protein amino acid β -aminobutyric acid (BABA), a compound rarely found in nature, is known for years as a resistance inducer protecting a broad range of plant species to pathogens or cold, drought and salt stresses (Cohen *et al.*, 1999 ; Jakab *et al.*, 2001 ; Jakab *et al.*, 2005). However, elicitation or priming depend on both the molecule concentration applied and the plant species (Jakab *et al.*, 2001). For example in *A. thaliana*, a high concentration of BABA directly induces the salicylic acid (SA)-signaling marker *PR-1* gene expression, whereas a low concentration primes this expression in BABA-induced resistance (BABA-IR; van Hulst *et al.*, 2006). However, in grapevine, BABA-IR only uses the priming phenomenon against *Plasmopara viticola*, even at high BABA concentration (Hamiduzzaman *et al.*, 2005). Moreover, the signaling pathway which controls the BABA-IR depends on the pathogen species. In *A. thaliana*, BABA-IR against *P. syringae* and *Botrytis cinerea* depends on SA, whereas abscisic acid is required for the resistance to *Plectosphaerella cucumerina* and *Alternaria brassicicola* through the formation of callose-rich papillae (Zimmerli *et al.*, 2000 ; Ton & Mauch-Mani, 2004 ; Zimmerli *et al.*, 2001). Moreover, in the case of oomycetes such as *Hyaloperonospora arabidopsidis* and *P. viticola*, the BABA-IR coincides with a primed deposition of callose at the infection site in *A. thaliana* and grapevine, respectively (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2000). Until now, it has been shown that the BABA-IR is mostly based on the priming of defense responses rather than on the direct activation of these responses. For instance, a low BABA concentration does not directly induce but prime the expression of *PR-1* and jasmonic acid (JA)-marker gene *LOX* (lipoxygenase) genes after infection in *A. thaliana* and in grapevine, respectively (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Ton *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2000 ; Zimmerli *et al.*, 2001).

Even though many studies provide insights in the understanding of BABA-IR, the molecular mechanisms of priming remain still unknown. In the present study, we show that BABA must not be considered as a typical elicitor in grapevine cells as it does not induce early defense-related signaling events and defense gene expression, in contrast to OGs. However, we provide first evidence that it primes a *RbohD* gene expression that could be responsible for the elicited *RbohD*-dependent ROS production in grapevine cells. This priming of ROS production was also observed in BABA-treated leaves and correlated with the resistance to *P. viticola*. Moreover, *in planta* the NADPH oxidase inhibitor diphenylene



Supplementary Fig. 1. Dose-effect of BABA treatment on cell viability and H₂O₂ production in grapevine cell suspensions.

A, Cell viability was quantified by 0.01% neutral red staining as a vital dye 24 h after treatment with water or 0.05 to 50 mM BABA (500- μ l aliquots of cell suspension). The incubation of cells 3 min at 55° C served as a positive control of cell death. Values are means \pm SE of two independent experiments. **B**, H₂O₂ production measured using chemiluminescence of luminol after treatment with water, 0.5 g/l OGs or 0.05 to 50 mM BABA. Data are expressed in percentage of maximal H₂O₂ production at 20 min after OG treatment (12 ± 1 nmol / g FWC). Values are means \pm SE of triplicate assays of a representative experiment out of three independent ones.

iodonium (DPI) abolished this primed ROS production and reduced the BABA-IR to *P. viticola*.

RESULTS

BABA does not elicit any variation of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, nitric oxide production, ROS production, MAPK phosphorylation and defense-related gene expression in grapevine cells

Elicitors have been widely reported to induce signaling events involved in triggering defense responses. For example in tobacco cell suspensions, cryptogein, a protein secreted by *Phytophthora cryptogea*, triggers ions fluxes, activation of protein kinases such as MAPKs, ROS and nitric oxide (NO) production and defense-related gene expression within the first hours (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). The same events were shown to occur in grapevine cell suspensions elicited by OGs (Poinssot *et al.*, 2003). The elicitation by cryptogein in tobacco leaves induces resistance to *Phytophthora parasitica*, the causal agent of black shank disease (Ricci *et al.*, 1989). In the case of OGs, the induction of defense-related gene expression leads to resistance against *B. cinerea* in grapevine and *A. thaliana* (Aziz *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2007 ; Ferrari *et al.*, 2007 ; Galletti *et al.*, 2008).

As BABA triggers protection against a broad range of plant pathogens, we first checked whether BABA itself was able to trigger early defense responses and defense-related gene expression in grapevine cell suspensions. Therefore, we tested the ability of BABA to mediate changes in $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$, NO and ROS production, MAPK phosphorylation and defense-related gene expression (Fig. 1). Elicitor-induced responses were checked by using OGs. BABA was used at 500 μM because this concentration efficiently induced resistance in grapevine plants against *P. viticola* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005). At this concentration, no significant cell death was observed on grapevine cell suspensions until 24 h after treatment (Supplementary Fig. 1A).

Variations of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ after BABA or OG treatment were monitored using grapevine cells expressing the Ca^{2+} reporter apoaequorin addressed to the cytosol (Vandelle *et al.*, 2006). In control cells, the basal $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ was about 0.2 μM (Fig. 1A). OGs elicited a transient variation of $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$: the $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ began to increase at 1 min, peaked at 0.38 μM at 3 min and returned to the background level after 20 min. In BABA-treated cells, the $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ was similar to the

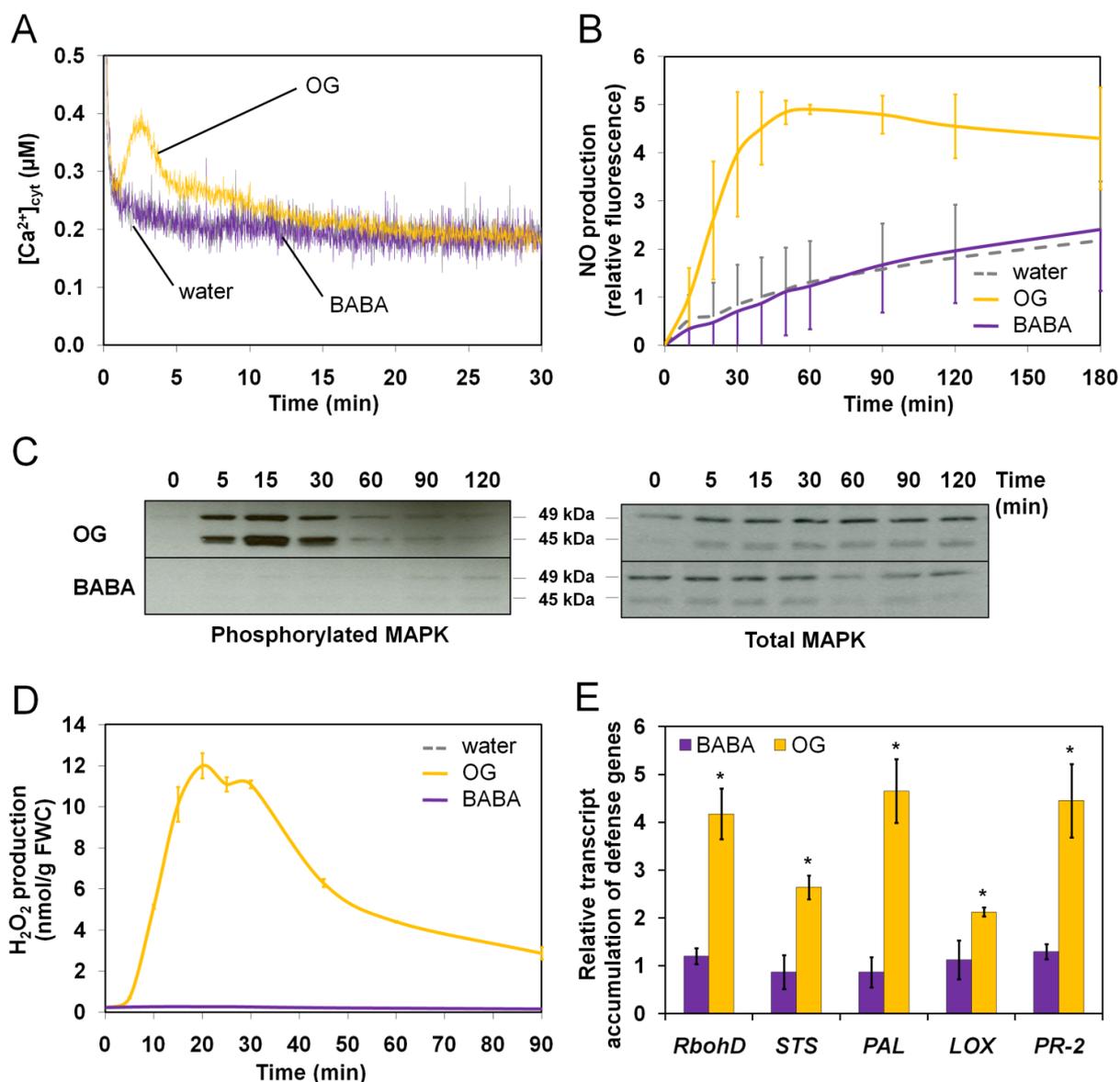


Fig 1. Effect of BABA on early signaling events and defense gene expression in grapevine cells.

Cells were treated with water, 0.5 g/l OGs or 500 μ M BABA. A, Variations of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in apoaequorin-transformed grapevine cells. Results are representative of three independent experiments. B, Intracellular NO production monitored using DAF-2DA. Values are means \pm standard error (SE) of three independent experiments. C, Regulation of MAPK phosphorylation. Phosphorylated and total MAPKs from protein extracts were analyzed by western blotting using an antibody raised against human phosphorylated (activated) ERK1/2 and an antibody raised against human total ERK1/2, respectively. Results are representative of three independent experiments. D, H_2O_2 production measured using chemiluminescence of luminol. Values are means \pm SE of triplicate assays of a representative experiment out of three independent ones. E, Expression of defense genes at 4 h after treatment. The transcript accumulation of genes encoding NADPH oxidase (*RbohD*), stilbene synthase (*STS*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), lipoxygenase (*LOX*) and β -1,3-glucanase (*PR-2*) was analyzed by real-time quantitative PCR. After normalization with *Elongation Factor gene 1 α* (*EF1 α*), results are expressed as the fold changes in transcript level compared to the control (water-treated) and are the mean \pm SE of technical duplicates from three biological replicates (n=6). Asterisks indicate statistically significant difference between BABA and OG treatments using Student's t test for pairwise comparison ($p < 0.05$).

level monitored in control cells. Therefore, contrary to OGs, BABA did not induce any variation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ in grapevine cells.

Intracellular NO production in grapevine cells was measured by fluorescence using the NO specific probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Vandelle *et al.*, 2006). Fluorescence increased quasi-linearly in control cells within 3 h, probably due to a constitutive NO production as previously shown in tobacco cell suspensions (Fig. 1B; Besson-Bard *et al.*, 2008). OGs induced a fast increase in fluorescence indicative of an induced NO production. The fluorescence reached a plateau after 45 min of treatment. In contrast, BABA did not trigger any increase in fluorescence, indicating that it did not elicit intracellular NO production.

MAPK phosphorylation was assessed by immunoblotting on protein extracts from OG- or BABA-treated cells with polyclonal antibodies raised against the active phosphorylated form of human ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2). These antibodies specifically react with the activated form of plant ERK-related MAPKs (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). In the samples corresponding to OG-treated cells, two phosphorylated MAPK orthologs with molecular masses of 45 and 49 kDa were detected (Fig. 1C). Their respective phosphorylation peaked at 15 min and almost returned to the basal level within 60 min. Of importance, immunoblotting performed using antibodies raised against the human total ERK1/2 MAPKs showed that OGs did not change the amount of the two MAPK orthologs during the experiment. This observation indicates that the signals immunodetected with the antibodies raised against the active MAPKs are related to an increase in phosphorylation of the two MAPKs rather than an increase in the amount of the corresponding proteins. In BABA-treated cells, BABA did not modify the global amount of MAPK and did not induce their phosphorylation.

H₂O₂ production was determined using chemiluminescence of luminol. A basal H₂O₂ production was observed in control cells (Fig. 1D). The addition of OGs on grapevine cells led to a H₂O₂ production that reached 12 nmol of H₂O₂ / g FWC (fresh weight of cells) at 20 min and decreased slowly within the next 70 min. On the contrary, BABA did not trigger any production of H₂O₂ in grapevine cells.

The expression of five genes which are known to be involved in plant defense was analysed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). *RbohD* is predicted to encode a NADPH oxidase potentially involved in ROS production. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) are two key enzymes involved in the biosynthesis of grapevine phytoalexins. Lipoyxygenase (*LOX*) is a marker gene for JA-signaling pathway and *PR-2*

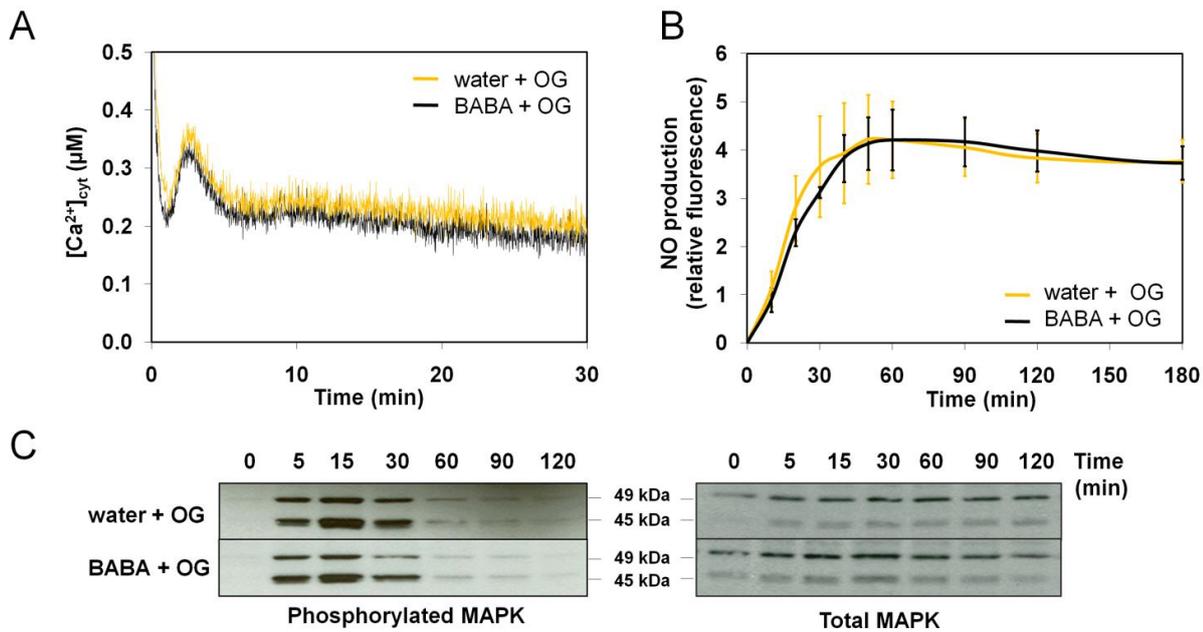
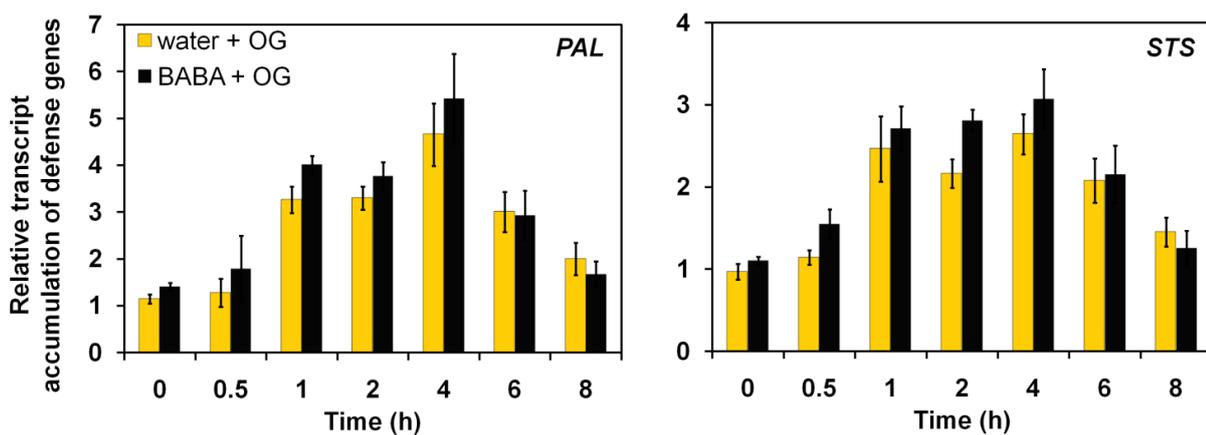


Fig. 2. Effect of BABA pre-treatment on OG-induced early signaling events in grapevine cells.

Cells were treated with water or 500 μM BABA 24 h prior to elicitation with 0.5 g/l OGs. A, Variations of [Ca²⁺]_{cyt} in apoaequorin-transformed grapevine cells. Results are representative of three independent experiments. B, Intracellular NO production monitored with DAF-2DA. Values are means ± SE of three independent experiments. C, Regulation of MAPK phosphorylation. Phosphorylated and total MAPKs from protein extracts were analyzed by western blotting using an antibody raised against human phosphorylated (activated) ERK1/2 and an antibody raised against human total ERK1/2, respectively. Results are representative of three independent experiments.



Supplementary Fig. 2. Effect of BABA pre-treatment on OG-induced expression of genes encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) in grapevine cells.

Cells were treated with water or 500 μM BABA 24 h prior to elicitation with 0.5 g/l OGs. The transcript accumulation was analyzed by real-time qPCR. After normalization with *EFlα*, results are expressed as the fold changes in transcript level compared to the control (water-treated) and are the mean ± SE of technical duplicates from three biological replicates (n=6). No significant difference was observed between BABA + OG and water + OG treatments using Student's t test for pairwise comparison ($p < 0.05$).

encodes a β -1,3 glucanase produced during pathogen infection. None of these genes was up-regulated during the 8 h of BABA treatment (only the 4 h-data are shown) whereas the transcript of all these five genes accumulated roughly 4 h after OG treatment (Fig. 1E). Thus, BABA did not elicit the expression of these defense genes.

BABA does not prime any variation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$, NO production, MAPK phosphorylation in OG-elicited cells

Since BABA itself did not elicit any of the early signaling events or any studied defense gene expression, we investigated whether BABA could prime these events in plant cells challenged by biotic stress, thus conferring an enhanced defense response on plants. To test this hypothesis, we pre-treated grapevine cells with 500 μ M BABA (or water) during 24 h before elicitation with OGs. The same defense-related events were studied (Fig. 2).

A 24-h water pre-treatment did not modify the OG-dependent responses (data not shown). OGs induced a similar kinetic of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ variations in both water and BABA pre-treated grapevine cells (Fig. 2A). The $[Ca^{2+}]_{cyt}$ peaked at 3 min and returned to the control level within the next minutes. These data indicate that BABA pre-treatment did not inhibit nor potentiate the OG-induced changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Similarly, BABA pre-treatment did not affect the production of NO triggered by OGs since the production of NO was similar in water and BABA pre-treated cells (Fig. 2B). Concerning gene expression, we confirmed that *STS* and *PAL* genes are up-regulated in response to OGs (Fig. 1E) but no significant difference in their transcript accumulation was observed in water or BABA pre-treated cells (Supplementary Fig. 2). Regarding MAPK phosphorylation, immunoblots revealed that BABA pre-treatment did not affect the dynamic of OG-induced MAPK phosphorylation (Fig. 2C). Furthermore, in both water and BABA pre-treated cells, the amount of MAPKs did not evolve during OGs treatment. These results showed that these early signaling events are not primed by BABA treatment in OG-elicited grapevine cells.

BABA primes both a ROS production and a *RbohD* transcript accumulation in OG-elicited cells

Contrary to the variation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$, NO production and MAPK phosphorylation, we observed that H_2O_2 production was targeted by BABA priming. Indeed, in both water and BABA pre-treated cells, OGs induced a transient production of H_2O_2 , the maximum being observed at 20 min (Fig. 3A). However, H_2O_2 production was twofold higher in BABA pre-treated cells. Although this production decreased after 20 min in both experiments, it

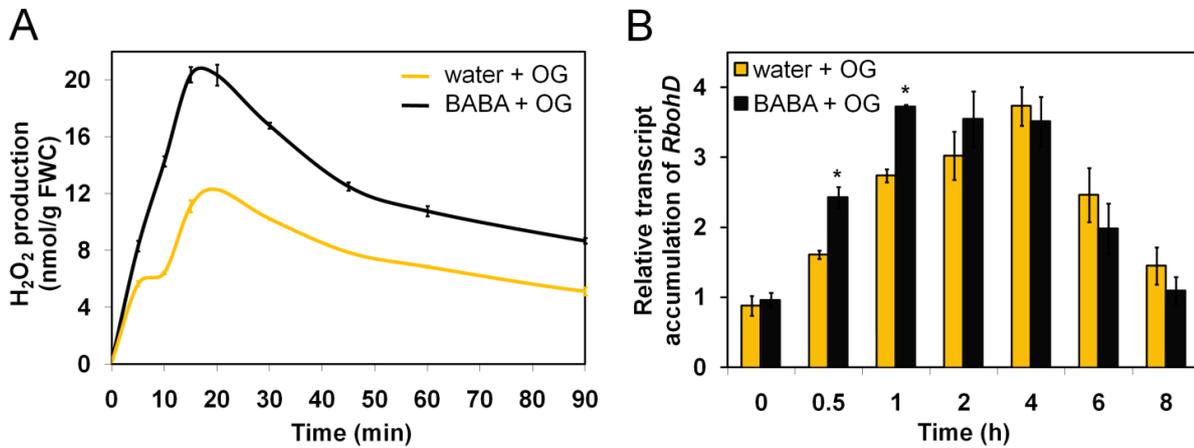


Fig. 3. Priming of OG-induced H₂O₂ production and *RbohD* expression in BABA pre-treated grapevine cells.

Cells were treated with water or 500 μ M BABA 24 h prior to elicitation with 0.5 g/l OGs. A, H₂O₂ production was measured using chemiluminescence of luminol. Values are means \pm SE of triplicate assays of one representative experiment out of three. B, Expression of *RbohD* gene. The transcript accumulation was analyzed by real-time quantitative PCR. After normalization with *EF1 α* , results are expressed as the fold changes in transcript level compared to the control (water + water-treated) and are the mean \pm SE of technical duplicates from three biological replicates (n=6). Asterisks indicate statistically significant difference between BABA + OG and water + OG treatments using Student's t test for pairwise comparison ($p < 0.05$).

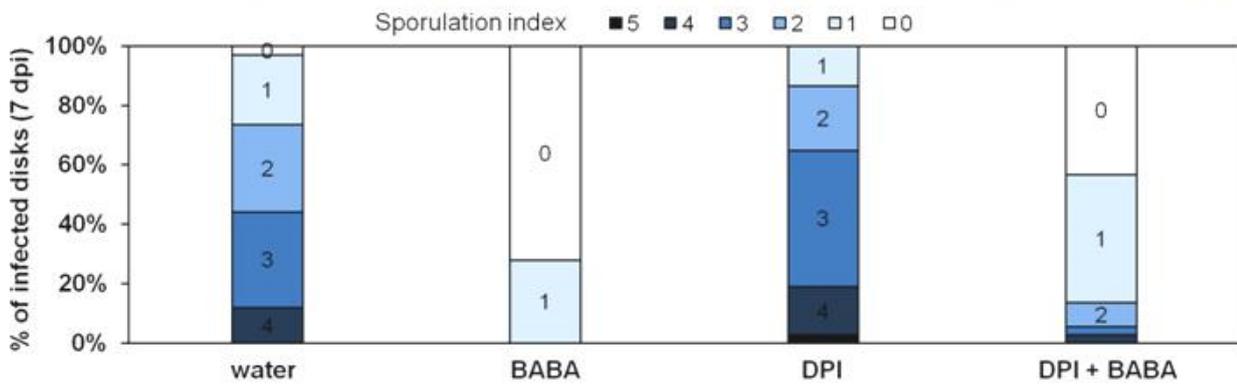
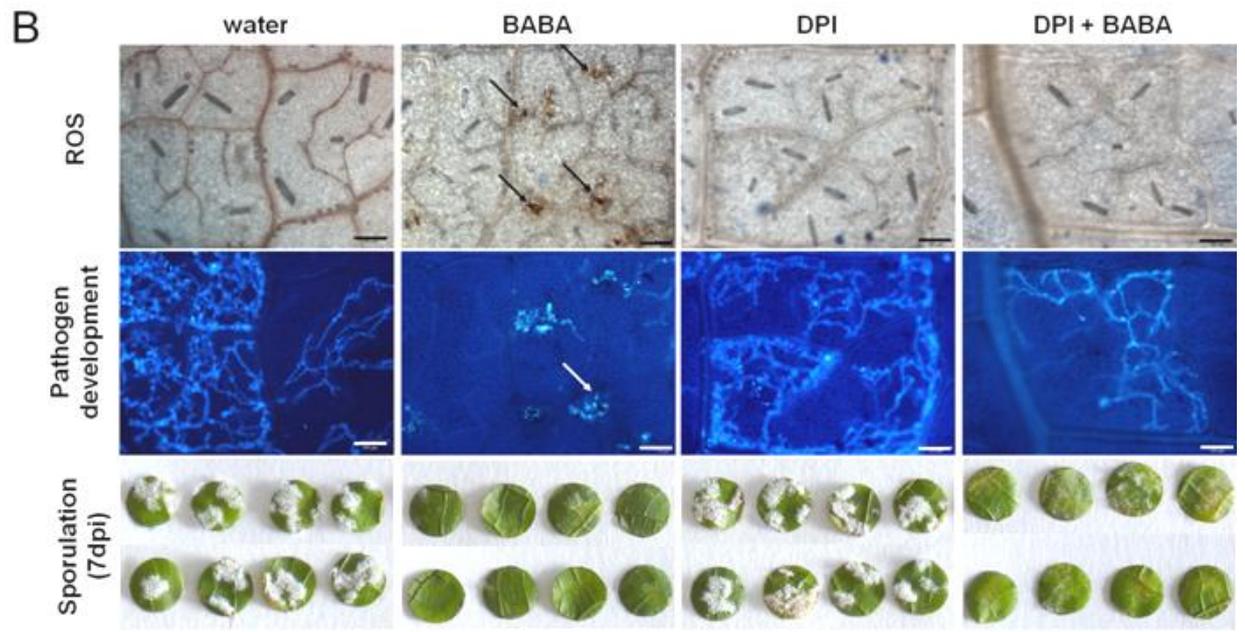
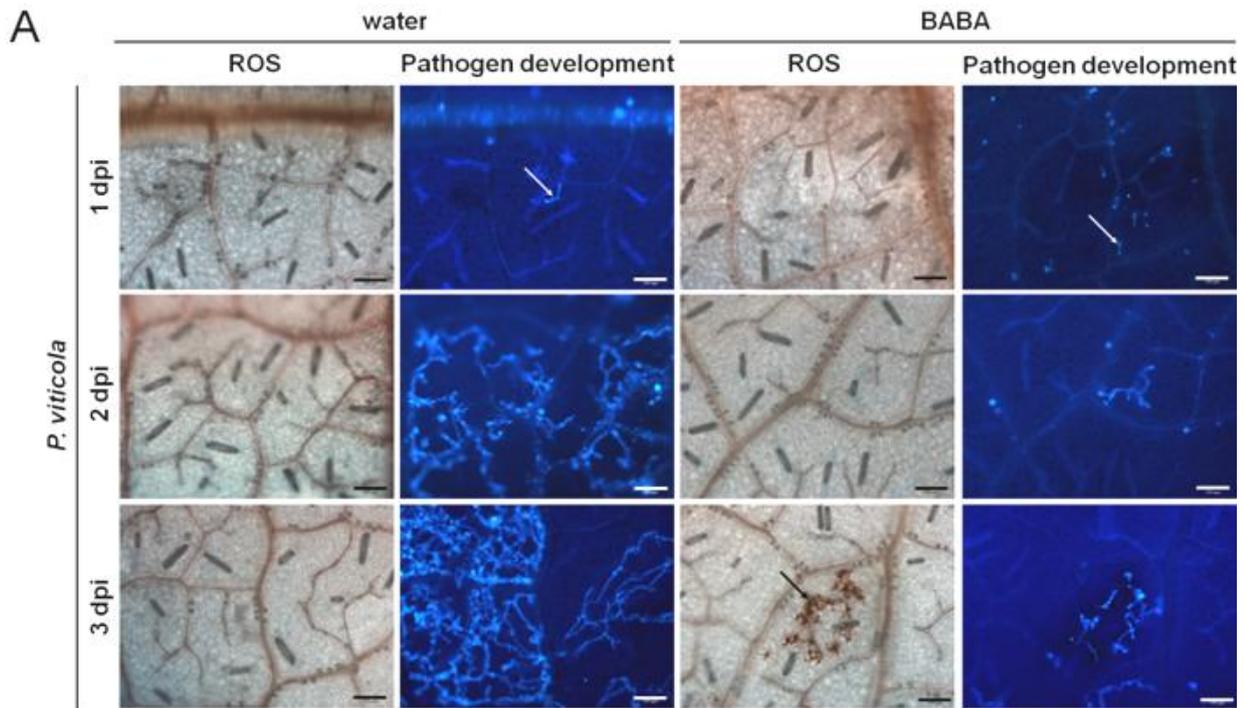
remained higher in BABA pre-treated cells until the end of experiment. The results showed that BABA pre-treatment of cells strongly primed H₂O₂ production during OG elicitation.

Rboh genes encode plasma membrane NADPH oxidases which are responsible for ROS production during plant defense responses (Torres *et al.*, 2002 ; Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2006). Therefore, we studied the effect of BABA pre-treatment on the expression of the grapevine *RbohD* gene after elicitation with OGs (Fig. 3B). In water pre-treated cells, OGs induced a transcript accumulation of *RbohD* gene after 30 min, with a maximum after 4 h of treatment. In BABA pre-treated cells, *RbohD* transcript accumulation was significantly higher than in water pre-treated cells at 30 min and 1 h, the maximum being observed after 1 h of treatment. This result shows that BABA primed the accumulation of *RbohD* transcripts during OG elicitation.

BABA-primed ROS production is correlated with the BABA-IR against *P. viticola* in grapevine leaves

Since BABA primed *RbohD* gene expression in OG-treated grapevine cells, we analyzed its regulation *in planta*. For this purpose, detached leaves were sprayed with water or BABA and then inoculated 24 h after with the oomycete *P. viticola*. Results indicated that *RbohD* transcript accumulation was not significantly primed in BABA-treated leaves at 0, 1, 2, 3 and 4 days post-inoculation (dpi; data not shown). Thereafter, we investigated whether BABA might nevertheless promote the priming of H₂O₂ production in plant challenged by pathogen. At 3 dpi, leaf disks were analyzed for H₂O₂ production using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining (Thordal-Christensen *et al.*, 1997) and the pathogen spreading was revealed by fluorescence observations using aniline blue staining (Hamiduzzaman *et al.*, 2005). The BABA-IR was observed at 7 dpi by measuring the sporulation index of *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008).

To transpose the BABA effect on H₂O₂ production in grapevine tissues, we firstly checked that BABA does not act as an elicitor in plant leaves. No brown precipitate, revealing the production of H₂O₂, was detected at 3 days after BABA treatment in uninoculated leaves (data not shown). From 3 days after inoculation with *P. viticola*, no DAB staining was detectable in water-treated leaves, whereas a strong H₂O₂ production appeared in BABA-treated leaves (Fig. 4A). This strong ROS production in BABA-treated leaves was observed mostly in mesophyll tissue (Fig. 4B). Moreover, aniline blue staining revealed that, in BABA-treated leaves, pathogen growth was clearly altered in the H₂O₂ producing zones such as stomata or parenchyma cells but was normal in zones without DAB staining (Fig. 4B). These host cells



in contact with the pathogen were altered evoking the HR-like cell death. These observations suggest the participation of ROS in pathogen alteration.

BABA-IR was confirmed with a clear reduction of *P. viticola* sporulation. As expected, at 7 dpi the pathogen sporulates normally in water-treated leaves, whereas its sporulation was totally abolished in BABA-treated leaves (Fig. 4B). These results suggest that BABA-IR to *P. viticola* is associated with the primed H₂O₂ production.

To demonstrate that the primed H₂O₂ production is NADPH oxidase-dependent, 24 h before BABA treatment we treated leaves with DPI, which, at low concentrations, specifically inhibits this class of enzymes in plants (Pugin *et al.*, 1997). DPI alone slightly enhanced disease triggered by *P. viticola*, showing an involvement of NADPH oxidase in basal resistance of plants (Fig. 4B). But DPI suppressed the H₂O₂-related brown precipitates and mycelium alterations observed in BABA-treated leaves. Pathogen sporulation was higher in BABA-treated leaves pre-treated with DPI compared to BABA-treated leaves (Fig. 4B). All these results indicated that the NADPH oxidase-dependent primed ROS production participates to BABA-IR in grapevine to *P. viticola* but seems to be independent of *RbohD* transcripts accumulation.

←

Fig. 4 Priming of H₂O₂ production and induced resistance in BABA-treated leaves inoculated by *P. viticola*.

Grapevine leaves were treated by spraying with water or 30 mM BABA 24 h prior to challenge inoculation with *P. viticola* sporangia (10⁴ sporangia/ml). H₂O₂ production was observed by DAB staining and pathogen colonization in the same leaf tissues was monitored by UV epifluorescence after aniline blue staining at different times after inoculation. Bar : 100 μm. A, Kinetic of H₂O₂ production and pathogen development in BABA-treated leaves inoculated with *P. viticola*. Pathogen infection starts with the encystment of zoospores (white arrow) observed at 1 day post-inoculation (dpi) in stomata. Hyphae structures from encysted zoospore develop with haustoria in mesophyll tissue (2 dpi) and spread in intercellular spaces (3 dpi) until sporulation which appears at 7 dpi with the formation of sporangiophores through stomata. No H₂O₂ accumulation was observed during the pathogen development in water-treated leaves whereas in BABA-treated tissues brown precipitates appeared at 3 dpi revealing an accumulation of H₂O₂ in mesophyll cells (black arrow). B, Effect of NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI) on primed H₂O₂ production at 3dpi and induced resistance in BABA-treated leaves inoculated by *P. viticola*. Leaves were treated with water or 5 μM DPI by petiole absorption 48 h prior to inoculation. The index of sporulation of *P. viticola* on leaf disks at 7 dpi was based on a scale between 0 to 5 which represented the percentage of disk area covered by sporulation (0 : no visible sporulation, 1 : 1 to 10 %, 2 : 10 to 25 %, 3 : 25 to 50 %, 4 : 50 to 75 % and 5 : 75 to 100 %). Values are means of index sporulation (35 disks) from two independent experiments.

DISCUSSION

BABA has been reported for years to induce resistance against biotic and abiotic stresses in plants (Jakab *et al.*, 2001 ; Cohen *et al.*, 1999 ; Jakab *et al.*, 2005). However, the molecular mechanisms underlying BABA-IR remain largely unknown. In parallel, it has been shown that most of the molecules able to trigger plant resistance possess elicitor activity that induce cellular signaling events leading to the expression of defense responses including a defense transcriptome activation (Asai *et al.*, 2002 ; Aziz *et al.*, 2007 ; Ferrari *et al.*, 2007 ; Galletti *et al.*, 2008 ; Zipfel *et al.*, 2004). Thus, based on these findings, we hypothesized that the BABA-IR could be related to the activation of early signaling events by BABA itself. Therefore, we investigated in grapevine cells the effect of BABA on variations of $[Ca^{2+}]_{cyt}$, NO and ROS production, MAPK phosphorylation, defense gene expression and compared it with the elicitor OGs.

BABA was used at 500 μ M because this concentration efficiently induced resistance in grapevine against *P. viticola* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005), even if a lower concentration was used in other pathosystems (Cohen *et al.*, 1999 ; Reuveni *et al.*, 2001 ; Ton & Mauch-Mani, 2004 ; Ton *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2001 ; Zimmerli *et al.*, 2008). Our results showed that at 500 μ M, BABA induced neither variation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$, nor production of NO and ROS and nor phosphorylation of the 2 MAPKs (Fig. 1). By contrast to the priming inducer BTH used in *A. thaliana* (Beckers *et al.*, 2009), BABA treatment did not affect the global total amount of the 2 MAPKs detected in grapevine. Thus, the priming effect on MAPKs accumulation differs between BABA and low concentration of BTH, suggesting different molecular mechanisms. Besides the distinct structures of the molecules, this difference might also be due to the plant species or the concentration used. Moreover, in our system, the same results have been obtained on ROS production with 0.05, 0.5, 5 or 50 mM of BABA (Supplementary Fig. 1B). Furthermore, cell viability assay showed that BABA had no toxic effect on grapevine cells at such concentrations (Supplementary Fig. 1A). So, in grapevine, BABA did not possess any ROS-eliciting or toxic activity even at high concentrations. Moreover, analysis by RT-qPCR showed that BABA did not up-regulate the phytoalexin biosynthesis-related genes *STS* and *PAL* as well as the JA-marker gene *LOX* (Fig. 1). To complete these results, *RbohD* and *PR-2* genes were not induced by BABA. Conversely, the expression of these defense-related genes was induced by the elicitor OGs, with a maximum at around 4 h after treatment.

Together with the previous demonstration that BABA was unable to induce the expression of the grapevine defense genes *PR-1*, *PR-4* and *LOX* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005), these results indicate that BABA, by itself, does not elicit early signaling events or the expression of the studied grapevine defense genes. However, at a close concentration, BABA induced a direct activation of *PR-1* gene expression in *A. thaliana* (van Hulst *et al.*, 2006). Thus, these data show that BABA-IR requires different mechanisms according to the plant species, as previously mentioned (Jakab *et al.*, 2001).

We next investigated whether the BABA-IR could involve the priming of early signaling events that might be involved in the resistant state of plants. Pre-treatment with BABA for 24 h primed neither variations of $[Ca^{2+}]_{cyt}$, production of NO or MAPK phosphorylation in response to OGs in grapevine cells (Fig. 2). It has been previously shown that the NO scavenger cPTIO greatly reduced the *B. cinerea* endoPG1-dependent transcript accumulation of *PAL* and *STS* genes in grapevine cells (Vandelle *et al.*, 2006). In the same way, we showed here that BABA did not prime the NO production nor the expression of *PAL* and *STS* genes (Fig. 2; Supplementary Fig. 2).

However, under the same conditions, a stronger OG-induced production of H_2O_2 was observed, highlighting a role for BABA in priming the elicitor-triggered oxidative burst. In many pathosystems, the oxidative burst was shown to be catalyzed by plasma membrane NADPH oxidases encoded by *Rboh* genes, particularly *RbohD* gene (Sagi & Fluhr, 2006). In grapevine cell suspensions elicited by OGs, we demonstrated that the accumulation of *RbohD* transcripts was significantly faster and higher in BABA pre-treated cells, compared to the control cells.

Interestingly, this primed H_2O_2 production was confirmed in grapevine tissues. Indeed, grapevine leaves treated with BABA showed a stronger H_2O_2 production in zones inoculated with *P. viticola* at 3 dpi (Fig. 4). The use of the NADPH oxidase inhibitor DPI confirmed that the ROS production primed by BABA depends on NADPH oxidase activity, which likewise plays a role in basal resistance against *P. viticola*. Contrary to cell suspensions, the expression of *RbohD* gene was not primed *in planta* (data not shown) suggesting that *RbohD* transcript accumulation might not be the only responsible for the ROS production in grapevine leaves. Interestingly, same results were observed in the tobacco-cryptogein model where the ROS production depends on *NtRbohD* in cell suspension whereas the cryptogein-triggered HR and SAR were not blocked in *NtRbohD*-silenced plants (Lherminier *et al.*, 2009). Taken together, these results suggest that *in planta* whether the ROS production depends on a NADPH oxidase encoded by another *Rboh* gene (seven *Rboh* genes found in the grapevine genome and

10 in the Arabidopsis one; Sagi & Fluhr, 2006) or by another ROS source, such as a polyamine oxidase (Lherminier *et al.*, 2009) or a peroxidase, even if most of those identified are not inhibited by DPI (Bindschedler *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2007).

The occurrence of oxidative burst preferentially in resistant plants has been repeatedly described (Torres *et al.*, 2006). For instance, in *A. thaliana* the vitamin B1-induced priming was shown to be dependent on H₂O₂ (Ahn *et al.*, 2007). In our experiments, we observed that the H₂O₂-producing zones were not any more colonized by the oomycete and showed rather pathogen alterations (Fig. 4A and B). These results suggested a putative direct toxic effect of ROS as the one triggered during the β -1,3 glucan sulfate-IR or in tolerant cv. Solaris plant against the same pathogen strain (Trouvelot *et al.*, 2008). Besides displaying toxic effects, ROS could also participate to signaling events leading to defense reactions able to block sporulation of the pathogen. Among those, callose deposition has been described in many resistant plant-pathogen interactions. In grapevine, pharmacological experiments based on the use of the callose synthase inhibitor 2-deoxy-D-glucose showed that the resistance induced by BABA or β -1,3 glucan sulfate against *P. viticola* partly depends on callose deposition (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Trouvelot *et al.*, 2008). In *A. thaliana*, the involvement of callose deposition is observed in resistance induced by BABA or vitamin B1 against *H. arabidopsidis* and *P. syringae* (Ahn *et al.*, 2007 ; Zimmerli *et al.*, 2000). Accordingly, the callose-deficient mutant *pmr4-1* was completely blocked in expressing BABA-IR against *P. cucumerina* (Ton & Mauch-Mani, 2004). Of interest, although the OG-triggered immunity against *B. cinerea* in *A. thaliana* appeared to be independent of ROS and callose formation, Galletti and associates (2008) showed that callose accumulation following OG treatment requires a functional AtRbohD. Together with the cell death colocalized with ROS producing zones in BABA-treated leaves (Fig. 4), we hypothesized that the priming of *Rboh*-dependent H₂O₂ production induced by BABA might promote HR and callose deposition, as demonstrated for the β -1,3 glucan sulfate-IR in grapevine against *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008).

Besides H₂O₂ production and callose deposition, BABA-IR also requires the priming of defense gene expression. Studies revealed that BABA treatment in *A. thaliana* and grapevine infected with *B. cinerea*, *P. syringae* and *P. viticola* primed the expression of genes involved in defense pathways such as *PR-1*, *PR-4* and *LOX* (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Ton *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2000 ; Zimmerli *et al.*, 2001). Here, we showed that BABA also primed the expression of *RbohD* gene encoding a NADPH oxidase in elicited cell suspensions. Similarly, the expression of a JA-signaling *LOX* gene and *PR-2* defense gene

encoding a β -1,3 glucanase, probably involved in the degradation of pathogen cell wall, were primed by BABA pre-treatment in OG-treated grapevine cells (data not shown). However, this priming of defense genes is not a general mechanism because the expression of genes encoding the phytoalexin biosynthetic enzymes STS and PAL was not modified by BABA.

Finally, the priming phenomenon probably involves unknown signals that remain to be discovered. The recent release of the grapevine genome sequence with the availability of wide genome microarrays should now permit the identification of key genes modulated by BABA in grapevine (Jaillon *et al.*, 2007 ; Velasco *et al.*, 2007).

Economically, the priming of defense reactions is an optimal strategy for the plant protection against diseases. Primed plants show a yield higher than the elicited ones without pathogen infection (van Hulten *et al.*, 2006). Interestingly, the benefits of priming also outweigh the costs under stress conditions. From an ecologic point of view, the protection of plants by priming phenomenon should become a future strategy to limit the use of phytochemicals.

MATERIALS AND METHODS

Grapevine Cells

Cell Culture Conditions

Vitis vinifera cv. Gamay was used for cell suspension assays. Wild type and apoaequorin-transformed cell suspensions were cultivated under continuous light as previously described (Vandelle *et al.*, 2006). Cells were maintained in the exponential phase and used for treatment 1 day after sub-culturing.

Cell Treatment

Cells were collected during the exponential growth phase, washed with M10 buffer (10 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.5) and re-suspended at 0.1 g of fresh weight of cells (FWC) per ml. After 2 h of equilibration (125 rpm at 24°C), cells were treated with water, 0.5 g/l OGs (degree of polymerization between 9 and 20; Goëmar laboratories, Saint-Malo, France) or 500 µM BABA (Sigma-Aldrich) before measurements of early signaling events. For free cytosolic calcium concentration variation analysis, 8-day old transformed cells were collected and washed with M10 buffer. *In vivo* reconstitution of aequorin was performed by adding 3 µM coelenterazine in cell suspensions for 3 h in the dark.

For priming assays, cells were aseptically treated with water or 500 µM BABA in the culture medium during 24 h. Cells were washed three times with M10 buffer, re-suspended at 0.1 g of FWC per ml, and then equilibrated during 2 h before treatment with 0.5 g/l OGs.

Free Cytosolic Calcium Concentration Variation Analysis

Free cytosolic calcium concentrations were analyzed by measuring luminescence of reconstituted aequorin. The bioluminescence of 250-µl aliquots of cells was recorded continuously at 1-s intervals using a luminometer (Lumat LB9507, Berthold Technologies). The bioluminescence counts were recorded as relative light units per second. At the end of the experiment, residual functional aequorin was quantified by adding 300 µl of lysis buffer (10 mM CaCl₂; 2 % Nonidet P40, v/v; 10 % ethanol, v/v) and monitoring the resulting increase in luminescence. The luminescence data were transformed into Ca²⁺ concentrations as previously described (Aziz *et al.*, 2007).

Gene	Primer sequences 5' - 3'		NCBI gene_ID
	Forward	Reverse	
<i>EF1-α</i>	GAA CTG GGT GCT TGA TAG GC	AAC CAA AAT ATC CGG AGT AAA AGA	XM_002284888
<i>RbohD</i>	ACC ATG CTT CAG TCC CTC CAT	AGC GAT CTT CTT GAA GAC TTG TCG CC	XM_002268568
<i>STS</i>	TAC GCC AAG AGA TTA TCA CT	CTA AAG AGT CCA AAG CAT CT	XM_002263926
<i>PAL</i>	AGT CTC CAT GGA CAA CAC CCG	TGC TCA GCA CTT TCG ACA TGG	XM_002268220
<i>LOX</i>	CTG GGT GGC TTC TGC TCT C	GCA TGA ATC TGC GGC TTA TC	XM_002280615
<i>PR-2</i>	ATG CTG GGT GTC CCA AAC TCG	CAG AAC AAA CTG CGC AAA CCG T	XM_002277133

Table 1. Characteristics of grapevine defense genes.

H₂O₂ Production Measurement

H₂O₂ production was determined using chemiluminescence of luminol as previously described (Kunz *et al.*, 2006).

Nitric Oxide Measurement

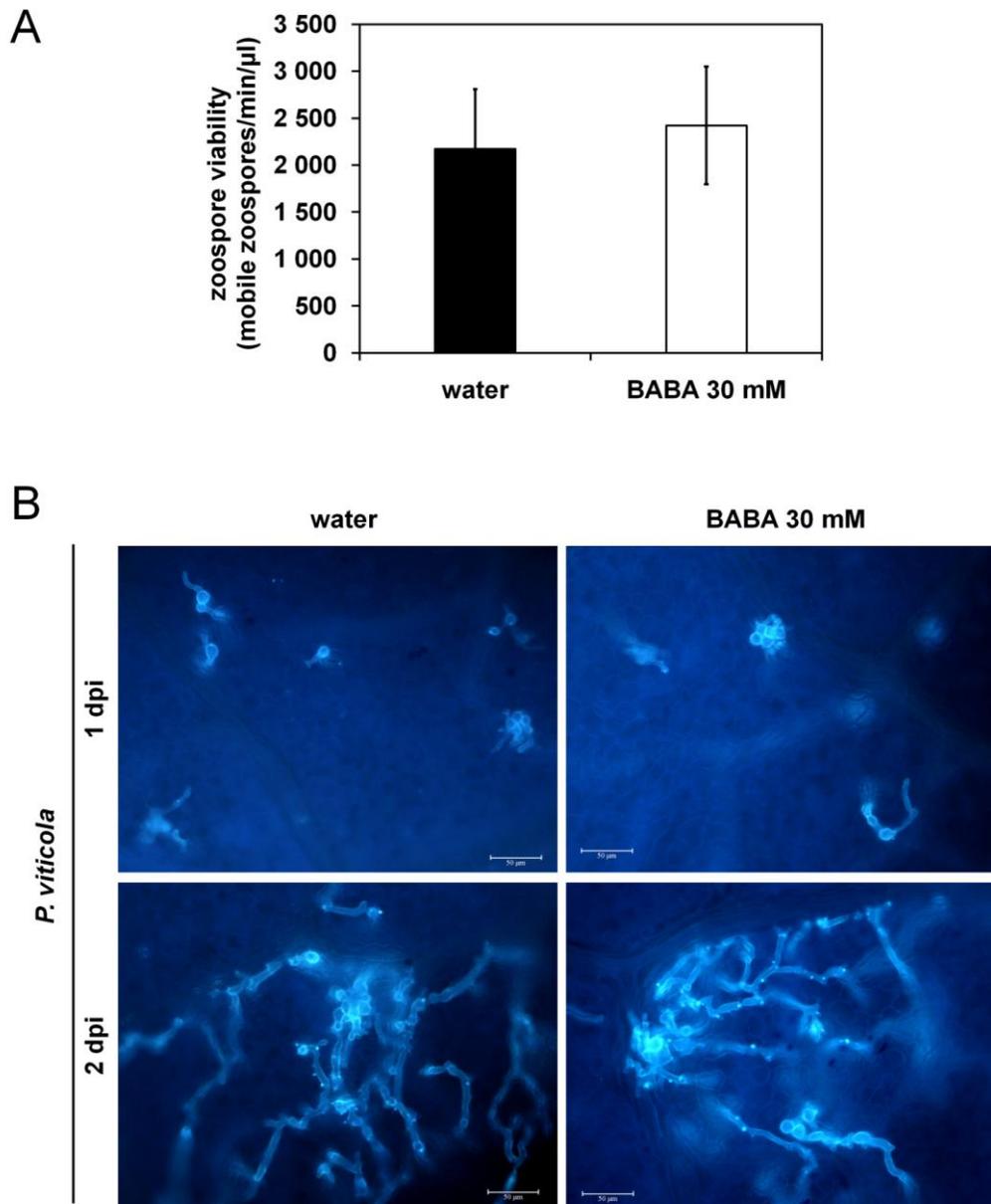
Intracellular NO accumulation was determined using the specific fluorophore 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Sigma-Aldrich) as described by Vandelle and associates (2006). Briefly, cells were incubated after filtration with 20 μ M DAF-2DA for 1 h in the dark (125 rpm at 24°C) and were washed three times with fresh M10 buffer to wash off excessive fluorophore. Cells were transferred into 24-well plates (Costar, Corning Inc.) containing 1 ml of cells per well. NO production was measured using a fluorimeter (Fluoroskan Ascent Fluorometer, Labsystems) with λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 510 nm filters. Fluorescence was expressed as relative fluorescence units.

Protein and Western Blot Analyses

Proteins and western blot analyses were performed as previously described (Vandelle *et al.*, 2006). Briefly, aliquots of cells (2 ml) were harvested by filtration on GF/A filters, frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar before protein extraction. Aliquots containing 15 μ g of proteins were then submitted to 12 % SDS-PAGE before transfer to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Biosciences) for western blot analysis. Detection of total MAPKs was performed with an antibody raised against human inactive ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Phosphorylated MAPKs were detected with an antibody raised against a synthetic phospho-Thr202/Tyr204 peptide corresponding to residues around Thr202/Tyr204 of human phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling Technology). Probing and detection were performed as described in the ECL western detection kit (Cell Signaling Technology) with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody.

RNA Extraction and Real-Time qPCR Analyses

Aliquots (1 ml) of treated cells were harvested by filtration on GF/A filters, frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar. Total RNA isolation was obtained with total RNA isolation kit (Promega). Total RNA (1 μ g) were reverse-transcribed using Superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen). The amplification of cDNA (8 μ l of 80-fold diluted) was performed in 20- μ l volume with ABsolute qPCR SYBR green ROX mix (containing *Taq* polymerase, dNTP and SYBR Green dye; ABgene) and 500 nM primers (Table 1) using an



Supplementary Fig. 3. Direct effect of BABA on *P. viticola* development.

A, Zoospore viability of *P. viticola* *in vitro*. Suspension of 1.10^5 sporangia/ml was incubated with water or 30 mM BABA for 1 h. Zoospore viability was determined by counting zoospores which crossed a hemacytometer square of 0.01- μ l during one minute. **B**, Germination and colonization of *P. viticola* *in planta*. Plants were treated by spraying with water or 30 mM BABA 2 h prior to inoculation with a suspension of 1.10^5 sporangia/ml. Development of *P. viticola* was observed by aniline blue staining in microscopy at 1 dpi (encysted zoospores) and 2 dpi (hyphae structures of pathogen).

ABI Prism sequence detection system (Applied Biosystem). PCR conditions were 15 min at 95°C followed by 40 cycles of 3 steps with 15 s at 95°C (denaturation), 30 s at 60°C (annealing), 45 s at 72°C (extension) and a final step with 15 s at 95°C, 15 s at 72°C and 15 s at 95°C. The activation factor of gene expression was determined with the comparative cycle threshold (Ct) method (LivakSchmittgen. 2001) : $2^{-\Delta\Delta Ct}$; with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{treated sample}) - \Delta Ct(\text{control sample})$ and $\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{reference gene})$. EF1 α was used as the reference gene (Table 1).

Grapevine Plants

Plant Culture Conditions

V. vinifera cv. Marselan plants were obtained from herbaceous cuttings placed in individual pots with a mixture of blond peat, sand and perlite (4/1/1, v/v/v). They were grown until they developed six leaves in a glasshouse at 24°C/18°C (day/night) with a photoperiod of 16 h and at a relative humidity (RH) of 70 \pm 10 %. Plants were watered daily and fertilized once a week.

Pathogen

Plasmopara viticola isolate, obtained from a Burgundy vineyard, was maintained on cv. Marselan herbaceous cuttings as previously described (Trouvelot *et al.*, 2008).

Plant Treatment and Inoculation

The third leaves from the top of plants were cut and their petiole was put in distilled water or 5 μ M diphenylene iodonium (DPI) for the NADPH oxidase inhibitor treatment under conditions at 24°C/18°C (day/night) with a photoperiod of 11 h and at a relative humidity (RH) of 45 \pm 5 %. After 24 h, petioles were washed and put in distilled water. Leaves were then treated with water or 30 mM BABA by spraying both upper and lower leaf surfaces until the run-off point for 24 h. BABA (30 mM) was used *in planta* to lead to induced resistance in our spraying treatment conditions as previously realized by Cohen *et al.* (1999 ; data not shown). In accordance with Cohen *et al.* (1999), the application of 30 mM BABA did not cause any phytotoxicity on grapevine leaves. Moreover, 30 mM BABA did not affect zoospore viability *in vitro*, zoospore germination and tissue colonization *in planta* (Supplementary Fig. 3).

Leaves were inoculated by spraying the lower surface with a sporangia suspension of *P. viticola* and placed in a humid chamber overnight.

Localization of H₂O₂ in Leaf Tissue

The petiole of leaves was put in 1 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB)-HCl during 6 h. Leaf disks (1-cm diameter) were clarified in a 2.5 mg/ml chloral hydrate solution overnight and were washed in phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0). After aniline blue staining, leaf disks were mounted on glass slides (lower surface uppermost) and H₂O₂ production was visualized under a microscope (Leica) as a brown coloration in plant tissues (Thordal-Christensen *et al.*, 1997).

Observation of Mycelium Development after Aniline Blue Staining and Disease Assessment in Leaf Disks

Clarified leaf disks were stained in 0.05 % aniline blue (in phosphate buffer) overnight and then were mounted on microscope slides in the same solution. Pathogen structure was observed in blue by epifluorescence microscopy under UV ($\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 380$ nm, stop filter LP 430 nm, Leica).

Disease intensity was assessed by measuring the area covered by sporulation on leaf disks at 7 days post inoculation, as previously performed (Trouvelot *et al.*, 2008).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Conseil Régional de Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (grant 07 9201 AA O40 S 3627), the Comité National des Interprofessions des Vins d'appellation d'origine, the ANR Génoplante Safegrape project (08-GENO-148G) and the ERA-PG PRR-CROP project. Carole Dubreuil-Maurizi is supported by a grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Agnès Klinguer for excellent technical assistance. We also thank Parul Vatsa and Stéphane Bourque for helpful discussion.

LITERATURE CITED

- Ahn, I.P., Kim, S., Lee, Y.H., and Suh, S.C. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143:838-848.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977-983.
- Aziz, A., Heyraud, A., and Lambert, B. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218:767-774.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bezler, A., Poinssot, B., Joubert, J., Pugin, A., Heyraud, A., and Baillieul, F. 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* 58:1463-1472.
- Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y.D., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S.Q., and Conrath, U. 2009. Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:944-953.
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A., and Wendehenne, D. 2008. Nitric oxide in plants: Production and cross-talk with Ca^{2+} signaling. *Molecular Plant* 1:218-228.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 47:851-863.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.
- Choi, H.W., Kim, Y.J., Lee, S.C., Hong, J.K., and Hwang, B.K. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* 145:890-904.
- Cohen, Y., Reuveni, M., and Baider, A. 1999. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:351-361.
- Conrath, U., Beckers, G., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M., Pieterse, C., Poinssot, B., Pozo, M., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1062-1071.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of

- salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.* 144:367-379.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., and Ferrari, S. 2008. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 148:1695-1706.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:711-724.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7:251-256.
- Hamiduzzaman, M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J., and Mauch-Mani, B. 2005. β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:819-829.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:285-306.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthonard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P., and French-Italian Public consortium 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463-U465.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Metraux, J., and Mauch-Mani, B. 2001. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:29-37.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Metraux, J., and Mauch-Mani, B. 2005. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.* 139:267-274.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A., and Boccardo, M. 2006. Characterization of a new nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytol.* 170:537-550.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J.* 15:773-781.

- Lherminier, J., Elmayan, T., Fromentin, J., Elaraqui, K.T., Vesa, S., Morel, J., Verrier, J.L., Cailleteau, B., Blein, J.P., and Simon-Plas, F. 2009. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:868-881.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25:402-408.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198:249-266.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P., and Pugin, A. 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:553-564.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M., and Azcon-Aguilar, C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 53:525-534.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. 1997. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9:2077-2091.
- Reuveni, M., Zahavi, T., and Cohen, Y. 2001. Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with β -aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* 29:125-133.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvaiscante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J.C. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired-resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183:555-563.
- Sagi, M., and Fluhr, R. 2006. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* 141:336-340.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.P. 2002. The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31:137-147.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z.G., Wei, Y.D., and Collinge, D.B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:1187-1194.
- Ton, J., and Mauch-Mani, B. 2004. β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38:119-130.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M., Mettraux, J., and Mauch-Mani, B. 2005. Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:987-999.

- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. 2002. *Arabidopsis* gp91(phox) homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:517-522.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141:373-378.
- Trouvelot, S., Varnier, A., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J., Pugin, A., and Daire, X. 2008. A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:232-243.
- Van Hulst, M., Pelsers, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., and Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:5602-5607.
- Van Loon, L.C., Bakker, P., and Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M., and Pugin, A. 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:429-440.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F., and Viola, R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2:e1326.
- Zimmerli, L., Jakab, C., Metraux, J., and Mauch-Mani, B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12920-12925.
- Zimmerli, L., Metraux, J., and Mauch-Mani, B. 2001. β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 126:517-523.
- Zimmerli, L., Hou, B., Tsai, C., Jakab, G., Mauch-Mani, B., and Somerville, S. 2008. The xenobiotic β -aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J.* 53:144-156.

- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764-767.
- Zipfel, C., and Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:353-360.

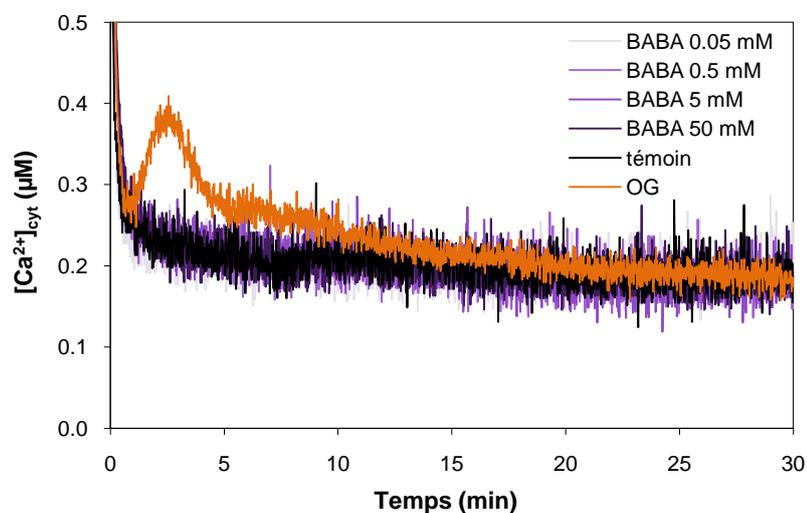


Figure 28. Variations de la concentration en calcium cytosolique libre ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) induites par BABA (0,05 à 50 mM), OG (0,5 mg/ml) sur suspension cellulaires de vigne.

Les variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sont mesurées dans des cellules de vigne exprimant l'apoequorine dans le cytosol. La protéine fonctionnelle aequorine est reconstituée durant 3 h en présence de coelentérazine (3 μ M). Durant le traitement, la luminescence émise par l'aequorine suite à la fixation d'ion Ca^{2+} est mesurée puis convertie en $[Ca^{2+}]_{cyt}$. La figure correspond à une expérience représentative parmi 2 expériences indépendantes.

3 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

3.1 Le BABA n'élucite pas les événements précoces de signalisation dans des suspensions cellulaires de vigne quelle que soit sa concentration

Lors de notre étude, nous avons voulu déterminer si le BABA agissait ou non comme un éliciteur activant directement les événements précoces de signalisation de défense. Puisque la dose efficace pour induire une résistance chez la vigne à *P. viticola* est de 0,5 mM par arrosage (Hamiduzzaman *et al.*, 2005), différentes concentrations de BABA allant de 0,05 à 50 mM ont été testées sur divers événements cellulaires précocement activés lors de l'induction des réponses de défense. Ainsi, les variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, la production d' H_2O_2 et de NO ont été suivies dans des suspensions cellulaires de vigne traitées par le BABA, utilisé à différentes concentrations. De plus, la toxicité éventuelle de la molécule a été vérifiée sur les cellules en quantifiant la mort cellulaire. Les résultats concernant la production d' H_2O_2 et la toxicité ont été montrés dans la Figure supplémentaire 1 de l'article précédent. Les résultats montrent que, quelle que soit la concentration testée, le BABA ne présente pas de toxicité et n'induit aucune production significative d' H_2O_2 sur suspensions cellulaires de vigne.

3.1.1 Les variations de la concentration en Ca^{2+} cytosolique libre

Le traitement des cellules par les OG à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ s'accompagne d'une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ atteignant $0,4 \mu\text{M}$ après 3 min de traitement. La réponse est transitoire, la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ diminuant ensuite jusqu'à atteindre un niveau basal de $0,25 \mu\text{M}$ après 15 min (Figure 28). Les cellules traitées par le BABA, à des concentrations comprises entre 0,05 et 50 mM, présentent un niveau basal de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ de $0,25 \mu\text{M}$, similaire à celui des cellules témoins. Ainsi, le BABA, quelle que soit la concentration utilisée, n'induit pas de variations significatives de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ au cours du temps.

3.1.2 La production de NO

Une accumulation du fluorophore DAF-2T témoignant d'une production de NO est observée dans les cellules témoins (Figure 1B de l'article précédent). Cette production

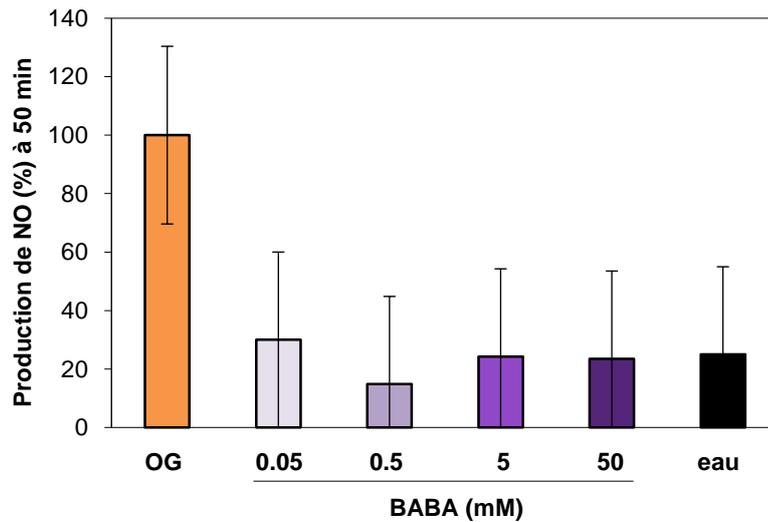


Figure 29. Production de monoxyde d'azote (NO) intracellulaire en réponse à BABA (0,05 à 50 mM), OG (0.5 mg/ml) dans des suspensions cellulaires de vigne. L'augmentation de fluorescence de la sonde DAF-2DA consécutive au traitement a été mesurée par spectrofluorimétrie durant 3 h. La production de NO à 50 min est représentée et est exprimée en % de la production maximale induite par les OG. Les valeurs \pm ESM (erreur standard sur la moyenne) correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

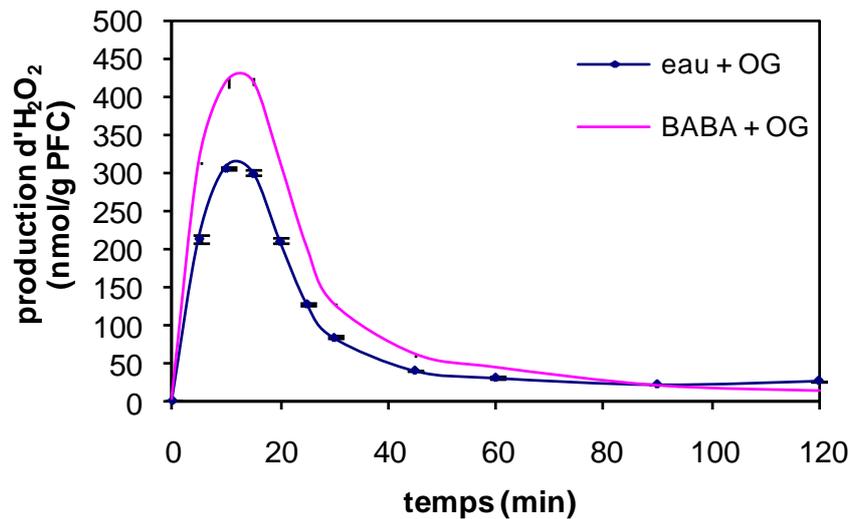


Figure 30. Production d'H₂O₂ induite par les OG 0,1 mg.mL⁻¹ dans les cellules d'*A. thaliana* prétraitées par l'eau ou le BABA à 500 μM 6 h avant l'élicitation. La production d'H₂O₂ est mesurée par chimioluminescence du luminol.

pourrait être constitutive et/ou être due au stress inhérent à la manipulation des cellules. En réponse aux OG, une production significative de NO atteignant un maximum de 5 urf après 50 min de traitement a été mesurée. Le BABA (0,05 à 50 mM) n'induit pas de production de NO significativement différente des cellules témoins au cours du temps (Figure 29).

3.2 Potentialisation de la production d'H₂O₂ par le BABA et étude de son implication dans la résistance induite chez *A. thaliana*

En parallèle des travaux réalisés sur la vigne, nous avons étudié la potentialisation de la production d'H₂O₂ chez *A. thaliana* et analysé l'implication de cette dernière dans la résistance induite par le BABA en réponse à l'oomycète *H. arabidopsidis*. Ce choix a en particulier été guidé par la possibilité de disposer de mutants invalidés dans l'expression de différentes isoformes de la NADPH oxydase.

3.2.1 Le BABA potentialise la production d'H₂O₂ en réponse aux OG sur suspensions cellulaires d'*A. thaliana*

Nous avons étudié la potentialisation de la production d'H₂O₂ par le BABA en réponse aux OG dans les mêmes conditions que sur cellules de vigne. En réponse aux OG, la production d'H₂O₂ sur suspensions cellulaires d'*A. thaliana* est maximale à 10 min, atteignant 300 nmol d'H₂O₂.g⁻¹ PFC, puis diminue ensuite pour atteindre le niveau basal après 1h30 de traitement (Figure 30). Lors du prétraitement par le BABA à 500 µM 6 h, 24 h ou 48 h avant élicitation par les OG, seule l'addition de BABA 6 h avant élicitation déclenche une production d'H₂O₂ plus intense (environ 30 %) que dans les cellules prétraitées par l'eau.

3.2.2 Implication des gènes *RbohD* et *RbohF* dans la résistance induite par le BABA chez *A. thaliana* à *H. arabidopsidis*

Les enzymes *RbohD* et *F* sont à l'origine de la production d'O₂^{•-} et d'H₂O₂ induite pendant l'infection d'*A. thaliana* par divers pathogènes (Torres *et al.*, 2002). Sur la base de ces données, nous avons appréhendé l'implication des enzymes *RbohD* et *F* dans la résistance induite par le BABA à l'oomycète *H. arabidopsidis* via l'utilisation des mutants *rbohD*,

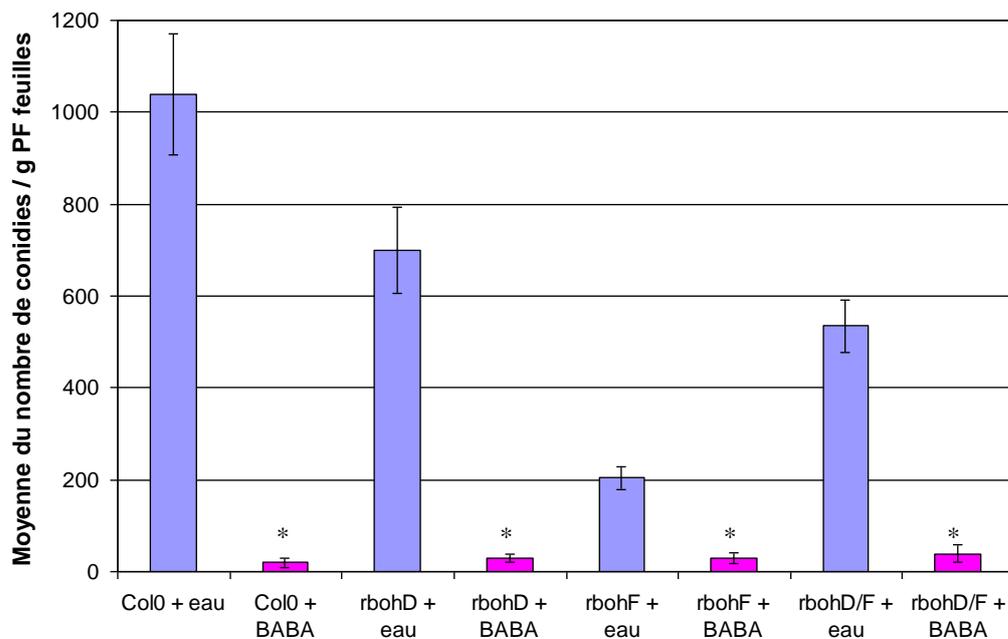


Figure 31. Comparaison de la résistance à *H. arabidopsidis* induite par le BABA chez le sauvage (Col-0) et les mutants *rbohD*, *rbohF* et *rbohD/F* d'*A. thaliana*. Des plantes de 15 j sont traitées par arrosage avec un solution de BABA à 120 μM final puis inoculées 2 j après par une suspension de conidies de *H. arabidopsidis* à 5.10^4 conidies.mL⁻¹. Le comptage des conidies est réalisé 7 j après l'inoculation. Les astérisques indiquent les moyennes significativement différentes (test t de Student).

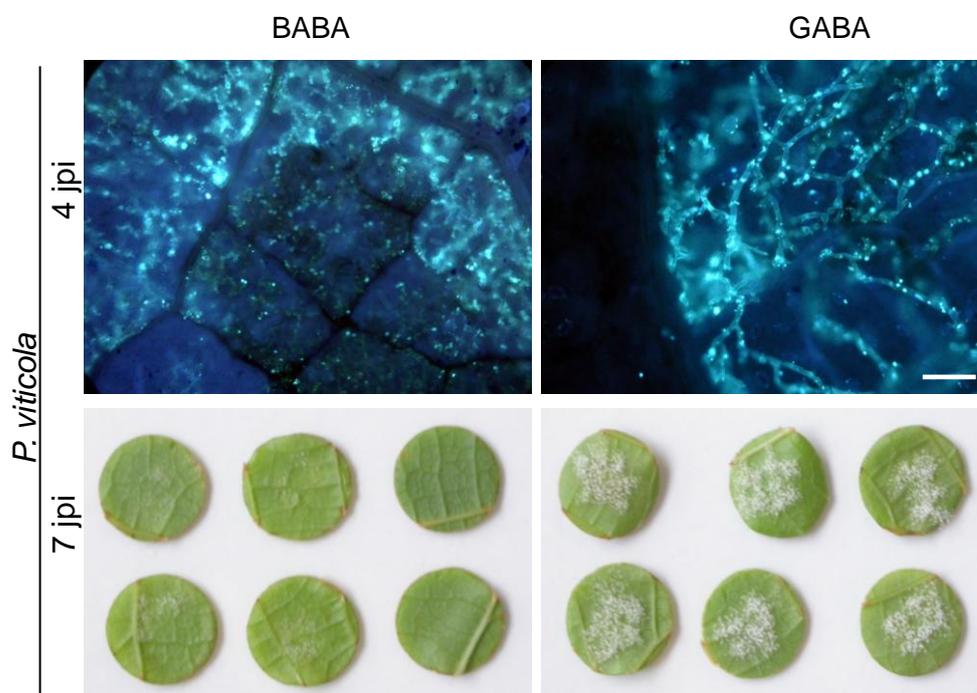


Figure 32. Développement de *P. viticola* sur des disques foliaires de vigne traités par le BABA ou le GABA (2 mM). Des disques (1 cm de diamètre) sont prélevés sur des feuilles de vigne puis placés dans une solution de BABA ou GABA à 2 mM pendant 24 h puis inoculés avec 20 μL d'une suspension de sporanges ($10^4/\text{mL}$). A 4 jours post-inoculation (dpi), le développement de *P. viticola* est visualisé par coloration au bleu aniline en microscopie à épifluorescence. Puis la sporulation du pathogène est observée à 7 jpi sur d'autres disques foliaires. L'expérience a été réalisée 3 fois. Barre : 100 μm .

rbohF et *rbohD/F*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. B. Mauch-Mani et du Pr. J.-M. Neuhaus à Neuchâtel (Suisse).

La résistance est évaluée en comparant sur les feuilles le taux de sporulation du pathogène. Le prétraitement par le BABA 2 jours avant inoculation des plantes d'*A. thaliana* sauvages par une suspension de conidies déclenche une résistance à *H. arabidopsidis* puisque la sporulation diminue de 98 % (Figure 31). Etonnamment, en absence de prétraitement par le BABA, les mutants *rbohD*, *rbohF* et *rbohD/F* présentent une résistance au pathogène. En effet, le taux de sporulation est inférieur à celui des plantes sauvages et varie suivant le génotype, le mutant *rbohF* présentant la plus forte résistance. Le prétraitement par le BABA accentue la résistance des trois mutants qui est identique à celle mesurée dans les plantes sauvages prétraitées par le potentialisateur. Ainsi, les gènes *RbohD* et *RbohF* ne semblent pas impliqués dans la résistance induite par le BABA chez *A. thaliana* contre *H. arabidopsidis*.

3.3 Le GABA est-il un bon contrôle négatif du BABA pour étudier la potentialisation ?

Dans notre étude, nous avons initialement choisi l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme second contrôle négatif, en plus de l'eau, puisqu'il possède une structure très proche de celle du BABA et n'induit pas de résistance chez les plantes (Cohen *et al.*, 1994).

3.3.1 Le traitement par le GABA n'induit pas la résistance à *P. viticola* sur disques foliaires de vigne

Afin de vérifier que le GABA n'induit pas de résistance dans le pathosystème vigne-*P. viticola*, des disques foliaires ont été traités par flottaison dans une solution de BABA ou de GABA à 2 mM pendant 24 h puis inoculés avec une suspension de sporanges de *P. viticola* à 1.10^4 mL⁻¹. L'observation microscopique à 4 jpi par la coloration au bleu d'aniline montre que le développement du pathogène semble normal dans les disques traités par le GABA, contrairement aux disques traités par le BABA où une altération de la structure du pathogène est observée (Figure 32). De plus, le taux de sporulation du pathogène analysé macroscopiquement, 7 jours après inoculation, dans les disques traités par le GABA est très nettement supérieur à celui observé dans les disques traités par le BABA. Le GABA n'induit donc pas de résistance chez la vigne à *P. viticola*.

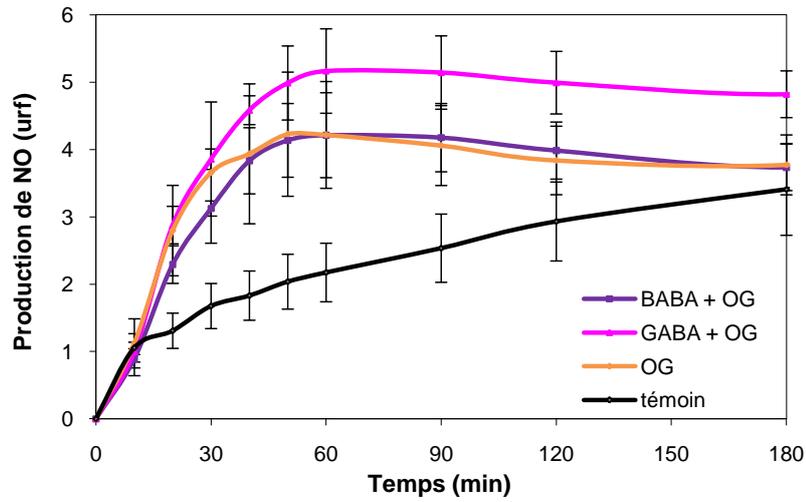


Figure 33. Production de monoxyde d'azote (NO) intracellulaire en réponse aux OG (0.5 mg/ml) dans des suspensions cellulaires de vigne traitées pendant 24 h avec l'eau, le BABA ou le GABA à 500 μ M. L'augmentation de fluorescence de la sonde DAF-2DA consécutive au traitement a été mesurée par spectrofluorimétrie. Les valeurs \pm ESM (erreur standard sur la moyenne) correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

3.3.2 Le GABA potentialise la production de NO en réponse aux OG dans les suspensions cellulaires de vigne

Lors des expériences menées sur les événements précoces de signalisation afin de déterminer l'action élicitrice du BABA, nous n'avons observé aucune induction de réponse dans les suspensions cellulaires traitées au GABA à 50 mM, semblable au traitement à l'eau (résultat non montré).

De la même manière, le prétraitement des cellules par le GABA à 500 μ M pendant 24 h ne modifient pas la cinétique et l'amplitude d'événements cellulaires tels que la production d' H_2O_2 , les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ou la phosphorylation des MAPK observés en réponse aux OG (résultat non montré). En revanche, le prétraitement par le GABA pendant 24 h amplifie la production de NO induite par les OG sans pour autant que la cinétique de production soit modifiée (Figure 33). Il est à noter que, contrairement au BABA, le GABA est un composé produit par les plantes en réponse aux pathogènes qui est métabolisé *via* le cycle du GABA shunt en succinate lui-même réintégré au cycle de Krebs (Bouche & Fromm, 2004). Bien qu'hypothétique, il est envisageable que la métabolisation du GABA pourrait fournir des précurseurs de substrats ou des co-facteurs nécessaires à une ou plusieurs enzymes régulant ou catalysant la synthèse de NO chez les plantes.

Ce résultat, bien qu'intéressant, nous a obligé à rester vigilants quant au choix des contrôles et nous a conduit à garder l'eau comme unique contrôle négatif.

4 DISCUSSION

4.1 Le traitement par pulvérisation des feuilles de vigne par le BABA permet une résistance à *P. viticola*

La capacité du BABA à conférer une résistance accrue a été observée chez de nombreuses espèces végétales et ceci contre différents types de pathogènes (Jakab *et al.*, 2001). Afin d'appréhender les mécanismes par lesquels le BABA contribue à ce processus, dans un premier temps nous avons vérifié la résistance établie chez la vigne par un traitement par le BABA réalisé 24 h avant inoculation par *P. viticola* (Cohen *et al.*, 1999 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005). Nous avons observé que la concentration de BABA nécessaire pour induire un taux de résistance de 95 % diffère selon le mode d'application. En effet, de faibles concentrations en BABA, à partir de 0,25 mM ou 0,5 mM, sont utilisées respectivement pour la flottaison de disques foliaires ou pour l'arrosage de la plante par les racines (Cohen *et al.*, 1999 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005). Par contre, notre mode de traitement par pulvérisation des feuilles imposait une solution de BABA à 30 mM pour induire une résistance à *P. viticola* semblable. Il faut donc une concentration environ 100 fois plus élevée pour obtenir une protection similaire par la méthode de pulvérisation, celle qui est utilisée au vignoble. Ceci est en corrélation avec les résultats obtenus par Cohen *et al.* (1994) qui montrent que la pulvérisation d'une solution de BABA à 20 mM sur les feuilles de tomate confère une résistance proche de 100 % à *P. infestans*. Une concentration identique s'avère nécessaire pour induire une protection contre *P. infestans* chez la variété sensible de pomme de terre cv. Bintje (J. Floryszak-Wieczorek, communication personnelle). Cette concentration en BABA ne peut toutefois pas être applicable à toutes les plantes puisque une solution de BABA à 1 mM appliquée chez le tabac par pulvérisation engendre des effets toxiques au niveau des tissus foliaires (apparition de lésions nécrotiques ; Cohen *et al.*, 1994). De plus, la concentration en BABA dépend aussi de l'espèce végétale puisque chez la salade, la pulvérisation foliaire à 2,5 mM et l'arrosage à 0,7 mM suffisent pour induire la même résistance à *B. lactucae* (Cohen *et al.*, 2010). Chez *A. thaliana*, le BABA est appliqué par arrosage avec une concentration de 0,15 et 0,3 mM, selon le pathogène utilisé (Zimmerli *et al.*, 2000 ; Zimmerli *et al.*, 2001 ; Ton & Mauch-Mani, 2004 ; Ton *et al.*, 2005). Ainsi, la résistance induite par le BABA dépend à la fois du mode d'application mais aussi de l'espèce végétale. Il semble donc que, chez la vigne, la résistance induite par arrosage soit beaucoup

plus efficace. Le fait que la vigne soit une plante ligneuse est probablement à l'origine d'une faible pénétration des molécules dans les feuilles expliquant la forte concentration utilisée en BABA par pulvérisation.

4.2 Le BABA n'exerce pas d'activité antimicrobienne directe sur *P. viticola* lors de la protection chez la vigne

Nos résultats ont montré que le BABA 30 mM n'a aucun effet antimicrobien sur *P. viticola* concernant toutes les étapes de la germination des zoospores au développement du pathogène, puisque la viabilité des zoospores *in vitro* et le développement du mycélium *in planta* ne sont pas modifiés. Ces résultats confirment ceux de Cohen *et al.* (1999) où l'effet non toxique du BABA (2,5 à 20 mM) a également été vérifié sur la viabilité des zoospores de *P. viticola*. Plus récemment, Cohen *et al.* (2010) ont montré que le BABA n'induit aucune altération de la germination des zoospores *in vitro*, *in planta* et sur la formation d'appressorium du pathogène obligatoire *B. lactucae* dans les tissus foliaires de la salade. De plus, plusieurs études ont montré que le BABA n'avait aucun pouvoir antimicrobien *in vitro* ou *in vivo* sur différents types de pathogènes tels que les bactéries (*P. syringae* DC3000 et *P. syringae* pv. *maculicola*; Zimmerli *et al.*, 2000) et les oomycètes/champignons (*P. infestans*, *H. arabidopsidis*, *P. capsici*, *Plasmopara helianthi*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum coccodes*; Cohen *et al.*, 1994; Jakab *et al.*, 2001; Zimmerli *et al.*, 2000). De manière intéressante, un autre inducteur de résistance étudié au laboratoire, la laminarine sulfatée PS3, n'a pas d'effet direct sur *P. viticola* bien qu'il induise une résistance chez la vigne à *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008). Ainsi, la protection observée chez les plantes traitées par le BABA requiert l'établissement des mécanismes de défense de la plante. Ceci est conforté par le mode d'application du BABA par arrosage qui induit une résistance de la plante sans contact direct entre les spores du pathogène et le BABA (Ton & Mauch-Mani, 2004; Zimmerli *et al.*, 2001; Hamiduzzaman *et al.*, 2005; Eschen-Lippold *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2010).

4.3 Le BABA n'induit pas les événements précoces de signalisation et l'expression de gènes impliqués dans les réactions de défense chez la vigne

Puisque le BABA n'a aucun effet direct sur le développement du pathogène, nous avons étudié certains événements de signalisation cellulaire induits communément par les éliciteurs qui confèrent une résistance aux plantes (Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Gómez-Gómez & Boller, 2002). Une large gamme de concentration en BABA a été utilisée afin d'identifier toutes les concentrations efficaces pour induire une résistance chez la vigne quel que soit le mode d'application.

Un influx de Ca^{2+} est observé dès les premières minutes de traitement par BcPG1, la laminarine ou les OG dans des suspensions cellulaires de vigne (Vandelle *et al.*, 2006 ; Aziz *et al.*, 2003 ; Poinssot *et al.*, 2003). Dans la présente étude, nous avons observé une variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse aux OG atteignant 0,4 μM . Par contre, aucune variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ n'est observée en réponse au BABA pour chaque concentration testée.

Plusieurs études ont montré chez la vigne et le tabac que la production de NO était placée en aval des événements impliquant le Ca^{2+} , bien qu'il contribue aussi, dans certains cas, à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Vandelle *et al.*, 2006 ; Lamotte *et al.*, 2004 ; Lamotte *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous avons montré que, contrairement aux OG, le BABA n'induit aucune production significative de NO au cours du temps et ce quelle que soit la concentration testée.

Bien qu'aucune étude n'ait démontré l'implication de la cascade d'activation des MAPK dans les réponses de défense chez la vigne, plusieurs éliciteurs tels que BcPG1, les OG ou la laminarine induisent une phosphorylation de deux orthologues de MAPK de 45 et 49 kDa dès 5 min de traitement dans des suspensions cellulaires de vigne (Vandelle *et al.*, 2006 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Aziz *et al.*, 2003). Contrairement aux OG, nous avons montré que le BABA n'avait aucun effet sur la phosphorylation des orthologues de ces deux MAPK, ni sur leur quantité respective. A l'inverse, une étude a montré qu'à faible concentration un autre inducteur de résistance, le BTH, un analogue fonctionnel du SA, conduit à l'accumulation des MAPK inactives MPK3 et MPK6 chez *A. thaliana*. Après l'application d'un stress biotique ou abiotique, les plantes traitées par le BTH montrent une phosphorylation plus intense des ces deux MAPK (Beckers *et al.*, 2009). Le mode d'action des inducteurs de résistance semble donc différer en fonction de la molécule utilisée.

Concernant la production d' H_2O_2 , les OG, BcPG1 et la laminarine induisent chez la vigne une production d' H_2O_2 dont le maximum varie entre 10 et 20 min selon le traitement

(Vandelle *et al.*, 2006 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Aziz *et al.*, 2004). Nos expériences sur suspensions cellulaires de vigne confirment bien une production d' H_2O_2 atteignant un maximum à 20 min après traitement par les OG mais qui n'est pas induite par le BABA quelle que soit sa concentration. De plus, l'absence de production d' H_2O_2 en réponse au BABA a aussi été observée dans les tissus foliaires de vigne par microscopie puisque aucun précipité brun révélant l' H_2O_2 n'a été détecté *via* la coloration par le DAB.

Considérés dans leur ensemble, ces données montrent que chez la vigne le BABA n'induit pas directement certains des événements cellulaires précoces classiquement activés par des éliciteurs. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus chez la vigne avec la laminarine sulfatée PS3 (Trouvelot *et al.*, 2008). En effet, PS3 n'induit aucunement les événements précoces de signalisation cités ci-dessus dans des suspensions cellulaires de vigne (thèse Gauthier A., 2009).

Puisque la cascade de signalisation cellulaire induite par les éliciteurs engendre une reprogrammation de l'expression des gènes, notamment les gènes de défense, nous avons choisi d'étudier l'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse des phytoalexines incluant les gènes *PAL* et *STS*, ou les gènes *LOX*, *PR-2* et *RbohD* induits généralement lors d'une infection. Tous ces gènes sont induits par les OG avec un maximum atteint après environ 4 h de traitement. Par contre, aucune expression de ces gènes n'est détectée en réponse au BABA dans les suspensions cellulaires de vigne. A l'exception du gène *PR-1* chez *A. thaliana*, plusieurs études ont montré chez différentes espèces que le BABA n'induisait pas l'expression de la plupart des gènes de défense (Van Hulst *et al.*, 2006 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Eschen-Lippold *et al.*, 2010 ; Zimmerli *et al.*, 2000).

Selon les pathosystèmes, il a été montré dans diverses études que suite à l'application du microorganisme, l'expression de gènes de défense tels que *PR-1*, *PR-4*, ou *LOX*, est potentialisée dans les plantes traitées par le BABA (Zimmerli *et al.*, 2001 ; Zimmerli *et al.*, 2000 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005). Ainsi nos résultats, associés à ceux d'autres études, mènent à la conclusion que la résistance induite par le BABA n'utilise pas l'activation directe d'événements de signalisation cellulaire ou de gènes associés aux réactions de défense mais plutôt le phénomène de potentialisation qui prépare la plante à réagir plus intensément et plus rapidement après l'application d'un stress. L'analyse du transcriptome, du protéome et du métabolome après traitement par le BABA devrait permettre de découvrir les événements moléculaires impliqués dans cette potentialisation.

4.4 Le BABA potentialise la production d'H₂O₂ en réponse aux OG sur suspensions cellulaires ou à *P. viticola* in planta

Puisque l'expression plus rapide et/ou plus intense de gènes de défense en réponse à un stress est observée dans différentes espèces végétales prétraitées par le BABA, nous avons analysé l'effet du BABA sur la potentialisation d'événements précoces de signalisation induits par des éliciteurs. Ainsi, un prétraitement des cellules de vigne en suspension par le BABA a été réalisé 24 h avant élicitation par les OG. En réponse aux OG, ni la cinétique, ni l'intensité des variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, de la production de NO et de la phosphorylation des orthologues des deux MAPK n'ont été modifiées dans les cellules prétraitées par le BABA.

Par contre, un résultat intéressant montre que la production d'H₂O₂ en réponse aux OG est potentialisée dans les cellules prétraitées par le BABA. Elle est alors plus intense tout au long de la cinétique avec un maximum deux fois plus élevé à 20 min. Cette production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA s'observe également *in planta* en réponse à *P. viticola*. Là où la présence de *P. viticola* ne déclenche pas chez la vigne une production d'H₂O₂, le traitement par le BABA 24 h avant inoculation des feuilles conduit à une hyper-accumulation d'H₂O₂, visible à 3 jpi, et localisée surtout au niveau du site d'infection du pathogène. Jusqu'à aujourd'hui, aucune donnée ne reporte une potentialisation de la production d'H₂O₂ dans la résistance induite par le BABA. En revanche, l'application d'autres inducteurs de résistance comme PS3 et la thiamine conduit à une surproduction d'H₂O₂ respectivement en réponse à *P. viticola* chez la vigne et à *P. syringae* chez *A. thaliana* alors qu'aucune accumulation d'H₂O₂ n'est observée dans le cas d'une infection seule ou d'un traitement par PS3 ou la thiamine avant infection (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Ahn *et al.*, 2007). Chez la vigne, cette réponse de défense potentialisée en réponse à *P. viticola* est plus rapide dans le cas d'un traitement par PS3 que par le BABA puisque l'accumulation d'H₂O₂ est détectée dès 1 jpi puis persiste pendant au moins 3 jours. La potentialisation de la production d'H₂O₂ par le BABA est aussi transposable chez *A. thaliana* puisque nous avons montré qu'une production plus intense en réponse aux OG était observée dans les suspensions cellulaires traitées par le BABA. De façon surprenante, bien que la potentialisation de la production d'H₂O₂ soit observée dans le cas du BABA, PS3 et la thiamine, nous remarquons que le temps de traitement par l'inducteur de résistance est différent. En effet, nous avons défini un temps de prétraitement par le BABA de 24 h, conférant une résistance induite comparable aux autres études, ceci sur des suspensions cellulaires de vigne et des plantes entières (Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Cohen *et al.*, 1999). Alors qu'avec un traitement par le BABA de 24 h ou 48 h, la

potentialisation de la production d'H₂O₂ n'est pas observée en réponse aux OG sur suspensions cellulaires d'*A. thaliana*, le temps de 6 h de traitement permet une potentialisation significative. De plus, Ahn *et al.* (2007) ont montré une potentialisation de la production d'H₂O₂ en réponse à *P. syringae* avec un traitement préalable des plantes de 5 jours par la thiamine. Ces données montrent que le phénomène de potentialisation de la production d'H₂O₂ semble propre à chaque modèle biologique et dépend du temps de pré-traitement.

4.5 Etude de la source de la production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA

Il est clairement établi que les NADPH oxydases codées par les gènes *Rboh* sont impliquées dans la production d'H₂O₂ lors d'une élicitation ou d'une infection par un pathogène (Sagi & Fluhr, 2006). Plus précisément, les gènes *RbohD* et *RbohF* sont indispensables à l'accumulation de l'H₂O₂ en réponse à *P. syringae* ou *H. arabidopsidis* chez *A. thaliana* (Torres *et al.*, 2002). De plus, le burst oxydatif observé dans les cellules de tabac traitées par la cryptogéine est aboli dans les cellules antisens *rbohD* (Simon-Plas *et al.*, 2002). Nous avons donc tenté de déterminer si la production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA était dépendante d'une NADPH oxydase. Le DPI, inhibiteur de NADPH oxydase bien caractérisé chez les animaux, inhibe complètement la production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA dans les feuilles de vigne lors d'une infection par *P. viticola*. Ce résultat nous guiderait donc vers l'implication d'au moins une NADPH oxydase dans cette production d'H₂O₂. De la même manière, la production d'H₂O₂ observée dans les feuilles traitées par PS3 lors de l'infection par *P. viticola* est totalement inhibée par le DPI (thèse Gauthier A., 2009). Afin de s'affranchir de toute action du DPI sur une autre cible que les NADPH oxydases et de conforter cette observation, l'abolition de cette production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA devrait être observée dans des plantes où l'expression de *rboh* serait invalidée. Ceci permettrait en plus de définir quel(s) gène(s) *Rboh* codant une NADPH oxydase est (sont) impliqué(s) dans la potentialisation de la production d'H₂O₂. Nous avons néanmoins observé une potentialisation de l'expression de *RbohD* en réponse aux OG dans les cellules de vigne traitées par le BABA, qui pourrait maintenir la production d'H₂O₂ au cours du temps. Afin de vérifier l'implication de ce gène dans cet événement, des suspensions cellulaires dont l'expression de *RbohD* serait abolie pourraient être utilisées.

Ce résultat nous amène également à proposer que d'autres événements que l'expression d'un gène *Rboh* seraient impliqués dans la potentialisation de la production d' H_2O_2 . En effet, les NADPH oxydases sont régulées à la fois au niveau transcriptionnel et par des modifications post-traductionnelles. Takeda *et al.* (2008) ont montré que le Ca^{2+} activait la NADPH oxydase (RbohD) et, en conséquence, une production d' H_2O_2 chez *A. thaliana*. Ces résultats peuvent être expliqués par l'existence dans la protéine de deux motifs EF-hands liant directement le Ca^{2+} (Sagi & Fluhr, 2006). De plus, les NADPH oxydases peuvent subir une phosphorylation sur deux résidus sérines du côté N terminale de la protéine (Kobayashi *et al.*, 2007). Une synergie entre ces deux modifications post-traductionnelles (phosphorylation et fixation de Ca^{2+}) permet d'activer la NADPH oxydase (RbohD) chez *A. thaliana* (Ogasawara *et al.*, 2008). Ainsi, une première hypothèse proposée est que le traitement par le BABA seul induirait une première modification post-traductionnelle comme la phosphorylation de la NADPH oxydase sans l'activer. Puis l'application d'un second stress activerait des événements impliquant l'influx de Ca^{2+} , dont la fixation à l'enzyme provoquerait son activation. Basé sur les travaux de Beckers *et al.* (2009), un autre processus est envisagé *via* l'accumulation de protéines inactives après traitement par le BABA, puis leur hyper-activation induite par le second stress. En effet, il a été observé chez *A. thaliana* que le BTH seul conduit à l'expression des gènes codant les deux MAPK, MPK3 et MPK6 et l'accumulation des protéines sous forme inactive. Différents types de stress appliqués par la suite induisent l'activation de ces protéines par leur phosphorylation.

Mise à part les NADPH oxydases, d'autres enzymes comme les peroxydases pourraient être à l'origine de la production d' H_2O_2 potentialisée par le BABA puisqu'elles sont capables de générer l' H_2O_2 en réponse à une infection. En effet, un burst oxydatif observé chez *A. thaliana* en réponse à *Fusarium oxysporum* est insensible au DPI mais inhibé par l'azide, un inhibiteur à spectre large agissant entre autre sur la production d' H_2O_2 dépendante de peroxydase (Bindschedler *et al.*, 2006). De plus, la transformation des plantes d'*A. thaliana* par une construction antisens d'une peroxydase de haricot inhibe la production d' H_2O_2 et rend les plantes sensibles à différents pathogènes. Une autre étude utilisant la technique de silencing ou une approche pharmacologique montre qu'une peroxydase (CaPO2) est impliquée dans l'accumulation d' H_2O_2 chez le poivron infecté par *X. campestris* et *A. thaliana* infecté par *P. syringae* (Choi *et al.*, 2007).

4.6 Etude de l'implication de la production d'H₂O₂ potentialisée dans la résistance induite par le BABA

Nous avons pu établir une relation entre la production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA et une résistance de la vigne à *P. viticola*. Dans la résistance induite, l'H₂O₂ produit pourrait contribuer à limiter le développement du pathogène i) de manière directe en ayant une action toxique, ii) en participant à la mise en place des réactions de défense de la plante en tant que molécule signalisatrice, iii) en participant au renforcement de paroi ou, iv) à la mise en place d'une RH.

Dans notre étude, les observations microscopiques montrent que la production d'H₂O₂ potentialisée par le BABA est localisée au point d'infection du pathogène. De plus, l'altération des structures du pathogène observée laisse supposer que l'H₂O₂ jouerait un rôle toxique direct sur le pathogène. Cette production d'H₂O₂ peut être impliquée dans la résistance induite par le BABA puisque le DPI lève de manière partielle cette résistance. Ceci se manifeste par un développement du pathogène plus étendu à 3 jpi dans les feuilles traitées par le DPI et le BABA que dans celles seulement traitées par le BABA. De plus, une sporulation apparaît sur les feuilles traitées par le DPI et le BABA bien qu'elle soit très modérée par rapport au contrôle où les feuilles ont été prétraitées par l'eau. Cette observation a également été rapportée lors de la résistance induite par PS3 chez la vigne (thèse Gauthier A., 2009). Ce résultat est aussi observé dans le cas de la résistance génétique chez la vigne comme chez *Vitis rupestris*, où le DPI rend les plantes sensibles et inhibe l'accumulation d'H₂O₂ induite par la reconnaissance du pathogène (Trouvelot *et al.*, 2008 ; thèse Gauthier A., 2009). Afin de vérifier que la production d'H₂O₂ dépendante d'une NADPH oxydase est impliquée dans la résistance, la perte de la résistance induite devra être analysée dans des mutants *rboh*. Chez *A. thaliana*, l'utilisation des mutants *rbohD*, *rbohF* et *rbohD/F* a permis de montrer que ces deux gènes ne semblent pas impliqués dans la résistance induite par le BABA à *H. arabidopsidis*. Dans ce sens, Galletti *et al.* (2008) ont montré que *RbohD* n'était pas nécessaire à la résistance induite par les OG à *B. cinerea* chez *A. thaliana*.

D'autres réponses de défense telles que le dépôt de callose et la RH semblent associées et liées à la production d'H₂O₂ potentialisée dans la résistance induite. En plus de la production d'H₂O₂, le traitement par le DPI de *V. rupestris* inhibe le dépôt de callose et l'apparition de la RH en réponse à *P. viticola* (thèse Gauthier A., 2009). En accord avec ces données, la catalase qui inhibe la production d'H₂O₂ observée lors de la résistance induite par la thiamine à *P. syringae* altère complètement le dépôt de callose et la RH (Ahn *et al.*, 2007).

Ces résultats montrent que ces trois réponses de défense sont indispensables dans ce contexte à la résistance induite.

Il est clairement établi que la production d' H_2O_2 joue un rôle important dans la mise en place de la RH (Lamb & Dixon, 1997). Il a été montré récemment que le gène *RbohD* impliqué dans la résistance d'*A. thaliana* à *A. brassicicola* jouait un double rôle dans le processus de mort cellulaire, en l'activant au niveau des cellules infectées et en l'inhibant au niveau des cellules adjacentes (Pogany *et al.*, 2009). De plus, Torres *et al.* (2002) ont montré que *RbohD* et *RbohF* exerçaient une fonction différente dans la régulation de la RH puisque le mutant *AtrbohF* présente une RH plus développée en réponse à *H. arabidopsidis* que le mutant *AtrbohD*. Toutefois, l'implication de H_2O_2 dans la RH n'est pas unanimement admise. Par exemple, chez le tabac, la production d' H_2O_2 dépendante de *RbohD* en réponse à la cryptogéine sur suspensions cellulaires ne semble pas déterminante pour l'établissement de la RH sur plantes (Lherminier *et al.*, 2009). Lors de nos observations microscopiques, une mort cellulaire ressemblant à la RH a été détectée au niveau du point d'infection entouré par l'accumulation d' H_2O_2 . De plus, une colocalisation est observée entre la mort cellulaire et la production d' H_2O_2 . Des analyses complémentaires utilisant une sonde fluorescente comme la fluorescéine diacétate et la coloration au bleu Evans permettront respectivement de détecter et de quantifier la RH lors de la résistance induite par le BABA.

La mise en évidence du dépôt de callose dans la résistance induite a été le plus souvent appréhendée par approche pharmacologique *via* l'utilisation d'un inhibiteur de la callose synthase, le DDG (2-désoxy-D-glucose). En effet, la réduction de 30 % de la résistance induite par PS3 chez la vigne dans des feuilles traitées par le DDG montre que le dépôt de callose est une composante importante de la résistance induite à *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008). Hamiduzzaman *et al.* (2005) ont également montré chez la vigne qu'un dépôt de callose était observé dans la résistance induite par le BABA à *P. viticola*. Cependant le traitement par le DDG ne lève que partiellement cette résistance, suggérant que le dépôt de callose contribue mais n'est pas suffisant à la résistance induite. De plus, le traitement par PS3 des plantes de vigne conduit à un dépôt de callose dès le premier jour suivant l'inoculation par *P. viticola* et qui augmente au cours du temps (thèse Gauthier A., 2009). Afin de déterminer si la production d' H_2O_2 pourrait agir en amont du dépôt de callose, nous pourrions observer l'effet de la catalase ou du DPI sur le dépôt de callose en réponse à *P. viticola* dans les feuilles traitées par le BABA. Toutes ces études semblent montrer que la production d' H_2O_2 potentialisée, étroitement liée à la mise en place de la RH et au dépôt de callose, est une composante de la résistance induite de la vigne à *P. viticola*.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont pu mettre en évidence que le mode d'action du BABA dans la résistance induite chez la vigne n'empruntait pas l'activation directe d'événements précoces de signalisation ni l'expression de gènes de défense. De nombreuses études ont montré que la résistance induite impliquait un phénomène de potentialisation, manifesté par l'apparition plus précoce et/ou plus intense de l'expression de gènes de défense mais aussi des réponses de défense comme le dépôt de callose. La potentialisation de la production d' H_2O_2 observée en réponse aux OG sur suspensions cellulaires et en réponse à *P. viticola* sur plantes nous a orientés vers l'étude de la source d' H_2O_2 et son implication dans la résistance induite. Pour la suite de ce travail, il serait intéressant de poursuivre les travaux relatifs à l'origine de la production d' H_2O_2 et aux mécanismes globaux impliqués dans la résistance induite par le BABA.

Concernant la production d' H_2O_2 , l'identification de sa source enzymatique et son implication dans la résistance induite seront menées grâce à des cellules et plantes dans lesquelles l'expression des gènes *rboh* et *peroxydases* sera invalidée chez la vigne mais aussi chez *A. thaliana* puisque tous les mutants sont disponibles. Une fois la source d' H_2O_2 déterminée, les réponses biologiques potentialisées par le BABA seront examinées chez le mutant correspondant. Ainsi, l'observation des réponses comme le dépôt de callose ou la mort cellulaire localisée pourra être réalisée par des techniques de coloration sur tissus. Un dosage des phytoalexines permettra d'obtenir des informations intéressantes sur l'accumulation et/ou la potentialisation de ces composés dans la résistance induite par le BABA. Dans ce sens, l'observation de la perte de résistance induite des mutants correspondants aux protéines impliquées dans les réponses de défense décrites ci-dessus permettra de vérifier leur contribution respective dans la résistance induite.

Concernant l'étude du mode d'action du BABA, puisque seul l'énantiomère R du BABA confère une résistance, et sachant que des différences de résistance induite sont observées entre espèces végétales, il serait intéressant de déterminer par quel mode le BABA est perçu à l'échelle cellulaire. Ceci pourrait impliquer un récepteur putatif. Une autre hypothèse plausible serait que le BABA pourrait être transporté dans la cellule grâce à un transporteur d'acide aminé. Puisque des mutants d'*A. thaliana* présentant une perte de résistance induite par le BABA ont déjà été isolés (Mauch-Mani), la caractérisation fonctionnelle des gènes correspondants permettra de proposer plusieurs candidats.

Afin de comprendre le mécanisme de potentialisation de l'expression de gènes de défense dans la résistance induite par le BABA, deux voies pourront être explorées. Tout d'abord, nous analyserons l'état redox cellulaire après traitement par le BABA mais aussi après l'application d'un stress biotique dans des plantes traitées par le BABA puisqu'il est montré que l'état redox cellulaire régule un grand nombre de gènes de défense des plantes. L'utilisation de la roGFP nécessite la transformation de plantes mais le dosage du glutathion dans un premier temps sera une méthode plus abordable. De plus, le remodelage de la chromatine en réponse à BABA sera étudié puisque ce processus régule l'expression des gènes notamment *via* les histones et des enzymes de remodelage appelées histone désacétylases ou histone acétyltransférases. Des mutants de ces enzymes pourront être étudiés dans la perte de la résistance induite par le BABA.

Enfin, d'un point de vue plus général, des analyses de transcriptome, protéome, métabolome et interactome en réponse à BABA devraient permettre d'identifier les cibles moléculaires de la potentialisation.

Au final, l'intégration des différentes approches menées avec différents potentialisateurs comme le BABA, PS3, la thiamine, devraient contribuer à définir les bases génétiques et moléculaires du phénomène de potentialisation.

CHAPITRE II

ETUDE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE AUX PATHOGENES DU MUTANT PAD2 D'ARABIDOPSIS DEFICIENT EN GLUTATHION

CHAPITRE II :

ETUDE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA SENSIBILITE AUX PATHOGENES DU MUTANT PAD2 D'ARABIDOPSIS DEFICIENT EN GLUTATHION

1 RÉSUMÉ DE LA PUBLICATION 2

Le mutant *pad2* (phytoalexin déficient) d'*A. thaliana* présente une sensibilité accrue à différents types de pathogènes tels que les bactéries, les champignons, les oomycètes mais aussi à certains insectes (Tableau II §2.3.5).

Il contient un faible taux de glutathion, une forte accumulation de cystéine et une déficience importante en camalexine et en SA après infection (Tableau V). Toutes ces caractéristiques démarquent *pad2* des trois autres mutants du gène *GSH1*, *cad2*, *rax1* et *rml1*. De plus, en lien avec le chapitre précédent, ce mutant est également incapable de mettre en place une résistance induite chez *A. thaliana* contre *B. cinerea* (Chassot *et al.*, 2008). Tous ces arguments en font un modèle de choix pour étudier les perturbations de la résistance basale et de la résistance induite chez ce mutant *pad2*. En réponse aux pathogènes, l'altération de certaines réponses de défense est observée, telles que l'accumulation de camalexine ou l'activation de l'expression du gène de défense *PR-1*. Le gène muté code une γ -glutamylcystéine synthétase (*GSH1*), première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion. De ce fait, le glutathion est présent en faible quantité chez *pad2*, de l'ordre de 20 % par rapport au sauvage. Chez les plantes, le glutathion joue un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires pouvant être impliqués dans la défense. Afin de comprendre plus en détail les mécanismes défaillants qui conduisent à la sensibilité chez *pad2*, nous nous sommes proposé de comparer des événements de signalisation cellulaire et le profil transcriptomique chez *pad2* et le sauvage en réponse à une élicitation par les OG ou à une infection par *P. brassicae*.

Tout d'abord, nous avons montré que le faible taux de glutathion provenait non pas d'une faible expression du gène *GSH1* mais d'une faible quantité de la protéine *GSH1* (de

Caractéristiques	<i>pad2</i> phytoalexin déficient	<i>cad2</i> cadmium sensitive	<i>rax1</i> regulator of APX2	<i>rml1</i> root meristemless
Phénotype croissance	aucun	élongation racinaire réduite (2)	aucun	pas de développement des racines (15)
Accumulation de composés (% par rapport au sauvage)				
Cystéine	500% (10)	200% (3)	80% (1)	300% (15)
γ-glutamylcystéine		33% (3)	100% (1)	non détectable (15)
Glutathion	22% (10)	20-30% (3, 7)	32% (1)	3% (15)
Phytochelatines		10% (après stress cadmium) (7)		
Canalexines	35% (36h <i>A. brassicicola</i>) (14) 35% (24h <i>Cochliobolus carbonum</i> , 72h <i>P. syringae</i>) (6) 40% (24h <i>P. parasitica</i>) (11) 25% (48h <i>B. cinerea</i>) (4) 16% (48h <i>P. syringae</i> pv <i>maculicola</i>) (10) 10% (66h <i>P. syringae</i> pv <i>maculicola</i>) (5)	72% (10)	110% (10)	
Glucosinolates	60% (48h <i>S. littoralis</i>) (12) 46% (24h <i>P. brassicae</i>) (13)			
Acide salicylique	20% (24h <i>P. brassicae</i>) (11)			
Activité enzymatique in vitro				
GSH1		40% (3)		non détectable (15)
GSH2		100% (3)		90% (15)
Sensibilité aux stress				
Cadmium, Sélénium, Mercure, Arsenic		croissance plante altérée (7, 8, 9)		
H ₂ O ₂		croissance plante altérée (7)		
Pathogènes (% résistance)	voir Tableau II; 10% (<i>P. brassicae</i>) (10)	20% (<i>P. brassicae</i>) (10)	75% (<i>P. brassicae</i>) (10)	

(1) Ball *et al.*, 2004 ; (2) Bashandy *et al.*, 2010 ; (3) Cobbett *et al.*, 1998 ; (4) Ferrari *et al.*, 2003 ; (5) Glazebrook & Ausubel, 1994 ; (6) Glazebrook *et al.*, 1997 ; (7) Howden *et al.*, 2005 ; (8) Hugouvieux *et al.*, 2009 ; (9) Li *et al.*, 2006 ; (10) Parisy *et al.*, 2007 ; (11) Roetschi *et al.*, 2001 ; (12) Schlaeppli *et al.*, 2008 ; (13) Schlaeppli *et al.*, 2010 ; (14) van Wees *et al.*, 2003 ; (15) Vernoux *et al.*, 2000.

Tableau V. Caractéristiques biochimiques et sensibilité aux stress des mutants *gsh1* chez *A. thaliana*.

l'ordre de 50 % par rapport au sauvage). Concernant cette enzyme qui peut être régulée par oxydation ou réduction, nous avons montré que sa forme oxydée était prédominante chez *pad2*, contrairement au sauvage où la forme majoritaire est la forme réduite. Puisque le glutathion joue un rôle important dans l'homéostasie de l'état redox cellulaire, nous avons confirmé que le potentiel redox du glutathion était plus faible chez *pad2*, traduisant un état redox plus oxydé dans la cellule. Afin de déterminer l'impact de l'état redox sur l'expression de gènes, une approche transcriptomique a permis de montrer que parmi 64 gènes différentiellement exprimés à l'état basal entre le sauvage et *pad2*, 63 étaient réprimés. La plupart de ces gènes codent des protéines impliquées dans la régulation de la transcription et dans la régulation protéique incluant la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la dégradation. L'étude d'événements impliqués dans la signalisation cellulaire déclenchée par une élicitation par les OG dans des suspensions cellulaires montre que *pad2* présente une altération de la dépolarisation de la membrane plasmique, de la production d' H_2O_2 et de NO. Nous avons pu confirmer sur plantes qu'une production d' H_2O_2 plus faible était observée chez *pad2* après inoculation par *P. brassicae*. Ceci est en corrélation avec une absence de RH en réponse à *P. brassicae* et un développement accru du pathogène au niveau des feuilles. Afin d'identifier les gènes impliqués dans l'altération de la réponse aux stress, nous avons comparé le transcriptome en réponse aux OG ou à *P. brassicae* chez *pad2* et le sauvage. D'un point de vue général, nous avons mis en évidence que des changements transcriptomiques importants apparaissaient entre *pad2* et le sauvage, quel que soit le stress, avec une dominance de la catégorie fonctionnelle relative à la dégradation des protéines chez *pad2* suggérant un rôle déterminant du glutathion dans la stabilité et le turn-over des protéines de signalisation.

2 PUBLICATION 2

THE GLUTATHIONE DEPLETION IN THE ARABIDOPSIS *PAD2* MUTANT DEPENDS ON THE LOW AMOUNT OF GLUTAMATE-CYSTEINE LIGASE PROTEIN WHICH DISTURBS GENOME EXPRESSION PROFILE, REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION AND HYPERSENSITIVE RESPONSE

Carole Dubreuil-Maurizi^{1,2,3}, Jan Vitecek^{1,2,3#}, Laurent Marty⁴, Lorelise Branciard⁵, Patrick Frettinger^{1,2,3}, David Wendehenne^{1,2,3}, Andreas Meyer⁴, Felix Mauch⁵ and Benoît Poinssot^{1,2,3,*}.

¹Université de Bourgogne, ²INRA 1088, ³CNRS 5184, Unité Mixte de Recherche Plante-Microbe-Environnement, 17 Rue Sully, F-21000 Dijon, France.

⁴Heidelberg Institute for Plant Science, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 360, D-69120 Heidelberg, Germany

⁵Department of Biology, University of Fribourg, 3 Rue Albert Gockel, CH-1700 Fribourg, Switzerland

Present address: Dept. Free Radical Pathophysiology, Institute of Biophysics AS CR v.v.i., Kralovopolska 135, 612 65 Brno, Czech Republic

* corresponding author : benoit.poinssot@dijon.inra.fr

Soumise dans *Plant Physiology* (16 juin 2010)

ABSTRACT

The *Arabidopsis thaliana* phytoalexin-deficient mutant *pad2* displays susceptibility to a broad range of invaders (necrotrophs, biotrophs and insects) that is correlated to camalexin and salicylate deficiencies. The *pad2* mutation is localized in the unique glutamate-cysteine ligase (*GSH1*) gene encoding the first enzyme involved in the glutathione biosynthesis. If glutathione deficiency of *pad2* is not related to a decrease in *GSH1* transcripts, analysis of GSH1 protein level revealed that *pad2* contained only 48 % of wild type amount. Moreover, the oxidized form of GSH1 was always dominant in *pad2* suggesting a distinct redox environment. The use of the specific redox-sensitive GRX1-roGFP2 confirmed that the cytosolic glutathione redox potential was significantly lower in *pad2*. Gene expression profiling was used to evaluate the impact of this more oxidized glutathione pool in *pad2*. In basal conditions, most of the genes were down-regulated in *pad2* and encoded proteins involved in the regulation of gene transcription, protein machinery and signaling events. After elicitation with oligogalacturonides (OG) or *Phytophthora brassicae* infection, transcriptome analysis showed that the signaling functional category was enriched in Col-0, whereas protein degradation was the main category in *pad2*. To confirm that glutathione depletion could deregulate signaling events, *pad2* was shown to be impaired in plasma membrane depolarization, H₂O₂ production and establishment of hypersensitive response (HR) which was correlated to pathogen susceptibility. All together, these results suggest that the *pad2* mutation specifically provoke an instability of the GSH1 protein which deeply modifies the plant transcriptome and the protein turn-over leading to wrong signaling and biological responses.

INTRODUCTION

Interactions between plants and microbes are the result of a finely tuned co-evolution. During symbiosis, the life of each partner is optimized by the mutualism. At the opposite, during pathogen parasitism, microorganisms gain control over the interaction and exploit photosynthetic metabolites of the host to complete their own life cycle. To counter these microbial attacks, plants developed perception systems which activate molecular defense mechanisms. Two main defense pathways are described in plant innate immunity (Boller & Felix, 2009). The first is named PAMP-triggered immunity (PTI) which is based on the recognition of pathogen-, microbe- or damage-associated molecular patterns (PAMPs; MAMPs; DAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs; Jones & Dangl, 2006). The second and more specialized effector-triggered immunity (ETI) begins rather by the interaction between a pathogen effector coded by an avirulence (*avr*) gene and the product of a plant resistance (*R*) gene, as initially proposed by Flor in the gene-for-gene concept (Flor, 1971). In any case, the perception of a microbial molecular tag is followed by several changes in plant. At cellular level, many signaling events such as ion fluxes (Ca^{2+} , K^+ , NO_3^- , Cl^-), oxidative burst, nitric oxide (NO) production, redox state changes and mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation cascade participate to a whole transcriptional reprogramming (Asai *et al.*, 2002 ; Besson-Bard *et al.*, 2008 ; Foyer *et al.*, 2009 ; Torres *et al.*, 2006 ; Wendehenne *et al.*, 2002). Defense responses including the production of antimicrobial compounds like phytoalexins (Hammerschmidt, 1999), pathogenesis-related (PR) proteins (van Loon *et al.*, 2006), and cell wall strengthening arise from this new genome expression profile. In the case of biotrophic pathogens, hypersensitive response (HR), a form of plant programmed cell death, is developed at the infection site to avoid pathogen spreading (Hofius *et al.*, 2007). Thus, this complex defense network allows plants to resist to most of their invaders.

Studies with plant mutants have provided essential information to understand the molecular mechanisms underlying plant disease resistance. The *Arabidopsis* phytoalexin-deficient mutant *pad2* displays susceptibility to a broad range of pathogens from necrotrophs (*Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*) to biotrophs (*Phytophthora brassicae*, *Pseudomonas syringae*) or insects (*Spodoptera littoralis*; Bohman *et al.*, 2004 ; Ferrari *et al.*, 2003 ; Glazebrook & Ausubel, 1994 ; Glazebrook *et al.*, 1997 ; Parisy *et al.*, 2007 ; Reuber *et al.*, 1998 ; Schlaeppli *et al.*, 2008 ; Roetschi *et al.*, 2001 ; Van Wees *et al.*, 2003). The *pad2*

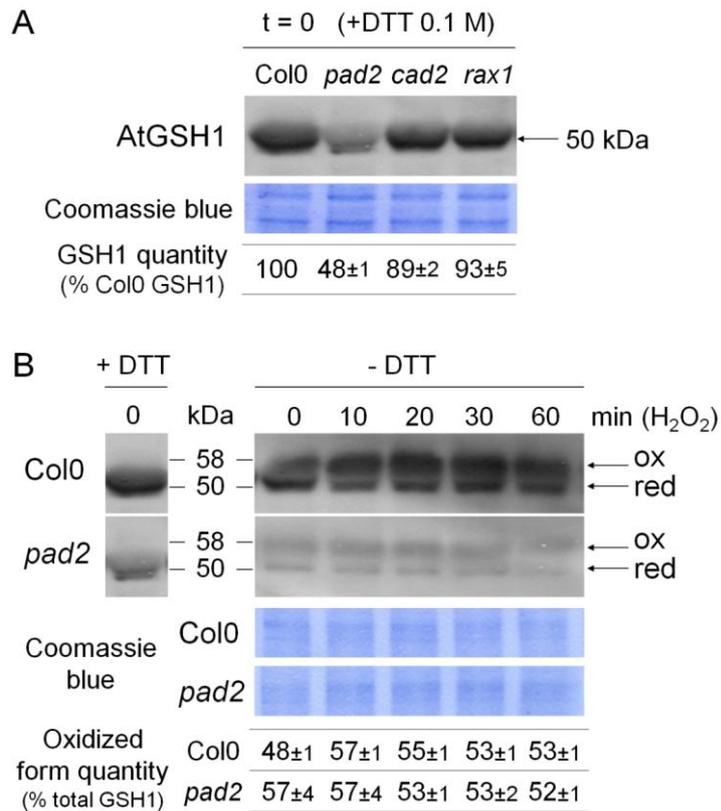


Figure 1. Analysis of the total content and redox state of GSH1.

Total proteins were extracted under reducing (+ 0.1 M DTT) or non-reducing (-DTT) conditions. Oxidized (ox) and reduced (red) forms of GSH1 were analyzed by western blotting using an antibody raised against a recombinant AtGSH1.

A, Total amount of GSH1 in Col-0 and glutathione-deficient mutants *pad2*, *cad2* and *rax1*.

B, Changes of redox state of GSH1 after H₂O₂ treatment in Col-0 and *pad2* plants. Leaf discs were treated with 5 mM H₂O₂ by vacuum infiltration. Results are representative of three independent experiments. The equal protein loading was checked by Coomassie blue staining.

mutation is localized in the unique gene At4g23100 which encodes the glutamate-cysteine ligase (GSH1), the first enzyme involved in the tripeptide glutathione biosynthesis (Parisy *et al.*, 2007). Glutathione formation occurs in two ATP-dependent steps in which, firstly, GSH1 catalyses the formation of γ -glutamylcysteine from L-glutamate and L-cysteine, and then, glutathione synthase (GSH2) forms glutathione by adding glycine. Glutathione biosynthesis is controlled at the first step by transcriptional, post-transcriptional and post-translational regulations of GSH1 (Jez *et al.*, 2004 ; May *et al.*, 1998). GSH1 protein has been shown to have an exclusive plastid subcellular localization, whereas GSH2 protein is found in plastids as well but predominantly in the cytosol (Wachter *et al.*, 2005).

Previous studies showed that the *pad2* mutant displays a particular phenotype. Related to GSH1 mutation, *pad2* shows just 22 % of wild-type content of glutathione (Parisy *et al.*, 2007). Concerning defense responses, production of camalexins, the main *A. thaliana* phytoalexin, is strongly affected during pathogen infection with *B. cinerea*, *A. brassicicola*, *P. syringae* pv. *maculicola* and *P. brassicae* (Ferrari *et al.*, 2003 ; Glazebrook & Ausubel, 1994 ; Parisy *et al.*, 2007 ; Roetschi *et al.*, 2001 ; van Wees *et al.*, 2003). Interestingly, comparison of camalexin levels 48 h after inoculation with *Psm* in the different *gsh1* mutants (*pad2*, *cad2* and *rax1*) indicated that only *pad2* had a production significantly lower compared to Col-0, around 20 % of wild-type content (Parisy *et al.*, 2007). Moreover, salicylic acid accumulation and *PR-1* expression are very low in *pad2* (Despres *et al.*, 2003 ; Mou *et al.*, 2003 ; Roetschi *et al.*, 2001), suggesting a role for GSH in the modulation of the redox state required for the monomerisation of NPR-1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1; Chakravarthy *et al.*, 2003 ; Mou *et al.*, 2003 ; Roetschi *et al.*, 2001). Since transformation with *GSH1* cDNA or glutathione feeding of *pad2* mutant restore glutathione level, camalexin amount and resistance to *P. brassicae*, glutathione content clearly modulates defense responses (Parisy *et al.*, 2007).

In animals and plants, glutathione is an ubiquitous non-protein thiol compound that plays a major role in many cellular processes such as development and responses to biotic or abiotic stresses (Noctor, 2006; Potters *et al.*, 2002). Indeed, glutathione is necessary for heavy metal detoxification as a precursor of phytochelatin and is a substrate for glutathione S-transferases to neutralize xenobiotics (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Edwards *et al.*, 2000). Glutathione is also involved in the process of S-glutathionylation of many proteins notably involved in protein turn-over (20S proteasome subunits, aminopeptidases and chaperonins) and primary metabolism (amino acid and carbohydrate biosynthesis; Dixon *et al.*, 2005; Michelet *et al.*, 2005). This post-translational modification modulates protein

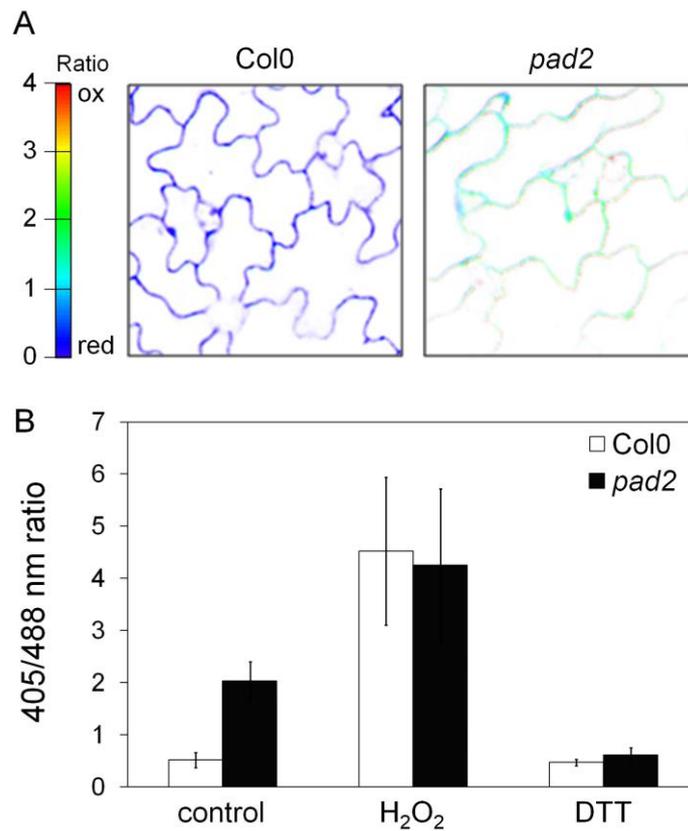


Figure 2. Comparison of the glutathione redox potential in the cytosol of Col-0 and *pad2* epidermal cells.

A, Redox images were taken by CLSM, GRX1-roGFP2 was excited with 405 and 488 nm wavelengths. The color scale of the fluorescence ratio represents the redox state of roGFP2 oscillating between an oxidized state (red) and a reduced state (blue).

B, Quantitative ratio values for images taken on Col-0 and *pad2* mutant tissue. Water treated (control), fully oxidized (100 mM H₂O₂) or fully reduced (10 mM DTT) samples for Col-0 and *pad2* mutant were compared (mean ± SD; n = 6).

function and prevents protein degradation due to an irreversible oxidation of thiol groups (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Further glutathione was shown to be an important antioxidant involved in detoxification of reactive oxygen species (ROS) through glutathione-ascorbate cycle (Noctor, 2006). Many studies reported that the total glutathione concentration, as well as the ratio of reduced/oxidized form of glutathione, controls the homeostasis of cellular redox state during plant development or environmental stress (May *et al.*, 1998; Mullineaux & Rausch, 2005). Notably, cellular redox changes influence protein activity or gene expression (Ball *et al.*, 2004). For example, GSH1 is activated by the formation of two disulfide bonds, switching the reduced inactive monomer form to an oxidized active form (Hicks *et al.*, 2007 ; Jez *et al.*, 2004) that could be correlated to a monomer to dimer transition in *Brassica juncea* (Hothorn *et al.*, 2006).

To better understand the pathogen susceptibility of *pad2*, we compared signaling events and transcriptomic changes occurring in wild type and *pad2* elicited with oligogalacturonides (OG) or in response to the pathogen *P. brassicae*. Our study highlights a central role of glutathione in signal transduction and regulation of gene expression under normal physiological conditions as well as upon elicitation of defense responses.

RESULTS

Analysis of GSH1 amount and redox state in *pad2*

The *pad2* mutation S298N of GSH1 causes a low glutathione content as compared to wild type (Parisy *et al.*, 2007). Since glutathione deficiency of *pad2* is not related to reduced *GSH1* and *GSH2* transcript levels (Parisy *et al.*, 2007), we first compared GSH1 protein level between *pad2* and wild type plants by western blotting using an antibody raised against a purified recombinant AtGSH1 (Hicks *et al.*, 2007). As GSH1 occurs in oxidized and reduced form, tissue extracts were reduced prior to detection of total GSH1 protein. Interestingly, *pad2* tissue contained only 48 % of wild type amount of GSH1. Two other allelic mutants of GSH1, *cad2* and *rax1*, were taken to this experiment as well. In these mutants, the level of GSH1 was almost the same like in wild type (Fig 1A). It is interesting to note that the prediction of the GSH1 tridimensional structure in Col-0 and *pad2* indicates that the S298N transition does not impact the ternary structure of the enzyme (I-TASSER server with the PyMOL software; data not shown), excluding the hypothesis that the lower detection in the *pad2* mutant is caused by a reduced binding of the antibody to the mutated protein.

Table I. Genes with assigned function significantly down-regulated at basal level in *pad2* as compared to Col0

Locus identifier ^a	Description ^b	Functional category ^c	<i>pad2</i> /Col0 ^d
At3g14070	CAX9 (CATION EXCHANGER 9); cation:cation antiporter	transport.calcium	-142.9
At5g14870	ATCNGC18 (cyclic nucleotide-gated ion channel 18)	transport	-2.0
At1g51960	IQD27 (IQ-domain 27); calmodulin binding protein	signalling	-8.5
At1g21240	WAK3 (WALL ASSOCIATED KINASE 3)	signalling	-8.1
At5g27100	ATGLR2.1 (glutamate receptor 2.1)	signalling	-2.0
At5g43500	ATARP9 (ACTIN-RELATED PROTEIN 9)	RNA	-47.8
At1g80730	ZFP1 (ZINC-FINGER PROTEIN 1); transcription factor	RNA	-7.0
At1g32490	EMB2733/ESP3 (EMBRYO DEFECTIVE 2733); RNA helicase	RNA	-2.0
At2g12900	DNA binding / transcription factor	RNA	-2.0
At2g19820	LOB (lateral organ boundaries) domain family protein	RNA	-2.0
At1g67710	ARR11 (RESPONSE REGULATOR 11); transcription factor	RNA	-2.0
At2g42940	DNA-binding family protein	RNA	-2.0
At3g54810	BME3/BME3-ZF (BLUE MICROPLYLAR END3); transcription factor	RNA	-2.0
At3g27070	TOM20-1 (TRANSLOCASE OUTER MEMBRANE 20-1)	protein	-18.0
At1g51690	ATB α (protein phosphatase 2A regulatory subunit B α isoform)	protein	-8.6
At2g06390	unknown protein	protein	-7.3
At1g18950	aminoacyl-tRNA synthetase family	protein	-2.0
At4g24550	clathrin adaptor complexes medium subunit family protein	protein	-2.0
At1g07730	disease resistance-responsive family protein	stress.biotic.PR-proteins	-6.0
At4g09360	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	stress.biotic.PR-proteins	-2.0
At5g62080	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid metabolism	-2.0
At2g38530	LTP2 (LIPID TRANSFER PROTEIN 2)	lipid metabolism	-2.0
At1g13680	phospholipase C	lipid metabolism	-2.0
At1g50580	glycosyltransferase family protein	hormone.auxin	-6.7
At4g08040	ACS11 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 11)	hormone.ethylene	-5.2
At1g49830	ethylene-responsive protein	hormone.ethylene	-2.0
At3g61040	CYP76C7 (cytochrome P450)	misc	-2.0
At1g60530	dynamain family protein	misc	-2.0
At3g59530	strictosidine synthase family protein	secondary metabolism	-27.0
At1g67980	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	secondary metabolism	-2.0
At2g21770	CESA9 (CELLULASE SYNTHASE 9); transferase	cell wall	-9.3
At1g29630	nuclease, similar to exonuclease	DNA	-16.6
At1g67500	ATREV3 (Arabidopsis thaliana recovery protein 3); DNA binding protein	DNA	-2.0
At3g15950	TSA1 (TSK-associating protein 1)-like protein	DNA	-2.0
At5g18270	ANAC087; transcription factor	development	-2.0
At5g62310	IRE (INCOMPLETE ROOT HAIR ELONGATION); kinase	development	-2.0

a,b Annotations of genes based on The Arabidopsis Information Resource. c Functional categories described from Mapman software (<http://mapman.gabipd.org>). d Fold-change of gene expression in *pad2*, only genes significantly regulated ($P \leq 0.01$; ≥ 2.0 -fold induction or repression in *pad2* as compared to Col0) are indicated in the table. -2.0 : ≥ 2.0 -fold repression but non determined.

Accordingly, GSH1 from *cad2* and *rax1* allelic mutants, in which a minor disruption occurs in one β -sheet (data not shown), were normally detected. Thus, only the *pad2* mutant displayed a low level of GSH1.

GSH1 activity is regulated by a reversible redox dependent monomer-dimer protein transition in *B. juncea* (Hothorn *et al.*, 2006). In Arabidopsis, the oxidation of the inactive reduced monomer switches the protein into an active oxidized form by intramolecular disulfide bonds (Hicks *et al.* 2007; Jez *et al.*, 2004). Therefore, we investigated the oxidized and reduced forms of GSH1 after oxidative stress (Fig. 1B). For this purpose, leaf discs were treated with 5 mM H₂O₂ and total proteins were extracted in reducing (+DTT) or non-reducing (-DTT) conditions and examined by western blotting. As reported in Fig. 1A, under reducing conditions, one band was detected with a molecular mass of 50 kDa in both Col-0 and *pad2* plants (Fig. 1B). According to Hicks *et al.* (2007), in non-reducing conditions, two bands were detected in wild type plants, corresponding to the oxidized (up) and reduced (down) forms of GSH1. Thus, the oxidative stress induced by H₂O₂ shifted GSH1 to the oxidized active form. In the *pad2* mutant, in non-reducing conditions, both the reduced and oxidized forms of GSH1 were detected at a lower level. However, in contrast to wild type plants, the oxidized form of GSH1 was already dominant at time 0 and no change of the redox state of the enzyme was observed during the time course of H₂O₂ treatment. These data suggest that the *pad2* mutant might display a distinct redox environment.

Cytosolic glutathione redox potential is more oxidized in *pad2* than in wild type

To investigate whether the cytosolic glutathione redox potential (E_{GSH}) differs between *pad2* and wild type, we measured E_{GSH} with the glutathione specific redox-sensitive GFP variant GRX1-roGFP2. It was previously demonstrated, that this fusion sensor of the human glutaredoxin1 (GRX1) and roGFP2 equilibrates with glutathione and thus reports the local E_{GSH} (Gutscher *et al.*, 2008).

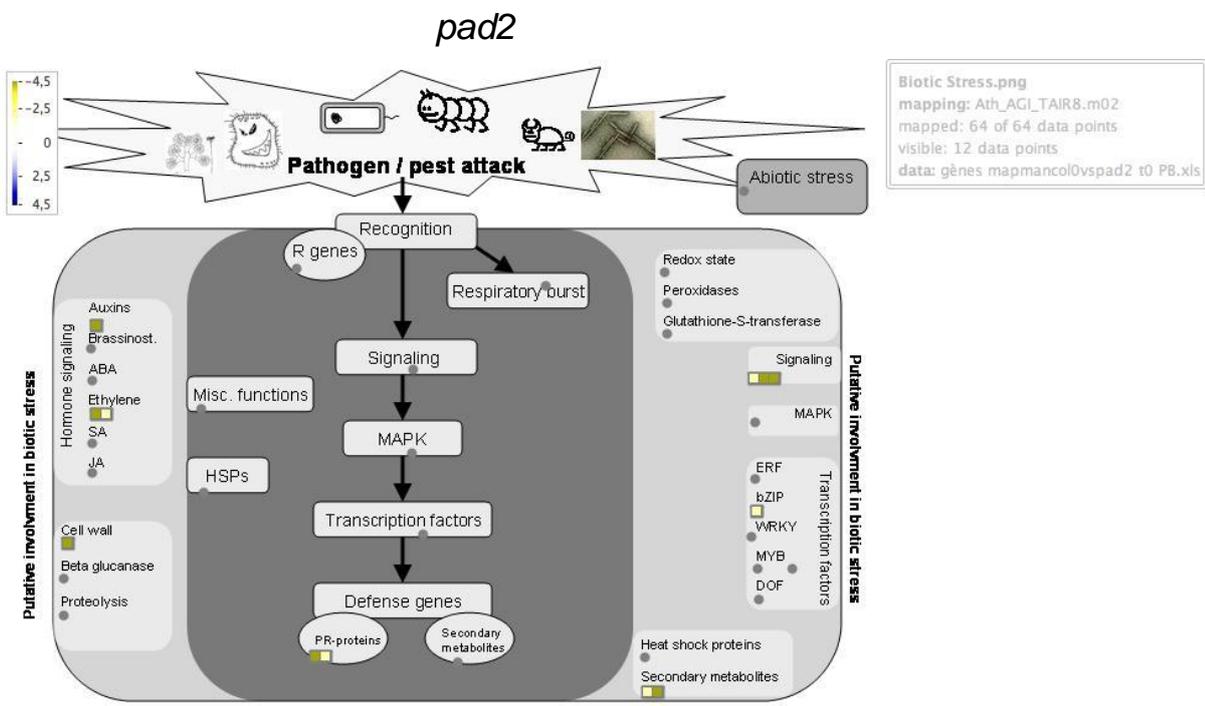
Col-0 and *pad2* seedlings expressing cytosolic GRX1-roGFP2 were subjected to ratiometric analysis of roGFP2 through confocal imaging of roGFP2 fluorescence with excitation at 405 nm and 488 nm, respectively (Fig. 2). In basal conditions, the 405/488 nm fluorescence ratio of GRX1-roGFP2 was higher in *pad2* (2.03 ± 0.36) than in wild type (0.51 ± 0.14), reflecting that GRX1-roGFP2 is more oxidized in *pad2* plants (Fig. 2A and B).

As controls, the Col-0 and *pad2* tissues were treated with 100 mM H₂O₂ and 10 mM DTT to fully oxidize and reduced the GRX1-roGFP2 probe (Fig. 2B). By the 100 mM H₂O₂ treatment, the GRX1-roGFP2 ratio of Col-0 (4.52 ± 1.41) and *pad2* (4.24 ± 1.46) increased to



Figure 3. Functional categorization of genes significantly down-regulated at basal level in *pad2* as compared to Col-0.

A part of pie chart represents the percentage of genes in a functional category based on TAIR annotations.



Supplemental Figure S1. Distribution of genes significantly regulated in *pad2* at basal level in biotic stress pathway using MapMan software.

Up-regulated or down-regulated genes are represented with a blue or yellow square, respectively.

the same value. Similar, the ratio of the DTT treated tissues were comparable in Col-0 (0.46 ± 0.06) and *pad2* (0.61 ± 0.13). These result showed that the ratiometric behavior of the fluorophore including its dynamic range was the same in mutant and the wild-type. In addition, it became evident that in untreated *pad2* GRX1-roGFP2 was partially oxidized. Based on these ratio values, E_{GSH} was calculated as described in Meyer *et al.* (2007) and determined to be $-312 \text{ mV} \pm 10$ for Col-0 and $-275 \text{ mV} \pm 5$ for *pad2*.

In basal conditions, most of the genes differentially expressed between *pad2* and Col-0 are down-regulated

Modulation of the cell redox state is known to be one of the components acting on the regulation of gene expression through oxidation or reduction of transcription factors (Apel & Hirt, 2004 ; Mittler *et al.*, 2004). Since the glutathione pool is more oxidized under non-stress conditions in *pad2* compared to wild type, we evaluated how this impacts the transcriptome. Microarray analysis using Array Ready Oligo Set technology showed that 64 genes were significantly differentially regulated in *pad2* as compared to wild type plants (Table I shows only genes with assigned function; Supplemental Table I (Annexe II), 63 being repressed (fold-change ≥ 2 and $P \leq 0.01$). Global analysis with the Mapman software (Usadel *et al.*, 2005) indicated that many of these down-regulated genes encoded proteins involved in the regulation of gene transcription (RNA category, 13 %) and protein machinery including synthesis, post-translational modification and degradation processes (protein category, 8 % ; Fig. 3). Twelve genes of 63 (20 %) differentially down-regulated in *pad2*, are known to be mobilized in biotic stress pathway (Supplemental Fig. S1). So, the *pad2* mutation in GSH1 causes significant modifications of the transcriptome, notably the repression of genes involved in transcription such as the transcription factors ZFP1, BME3 and ARR11 (At1g80730, At3g54810, At1g67710) and encoding proteins responding to biotic stresses such as disease resistance-responsive proteins (At1g07730 and At4g09360) or enzymes involved in secondary metabolism (At3g59530 and At1g67980; Table I). This data also highlights the importance of glutathione in maintaining normal protein modifications (At1g51690, At2g14110), targeting (At3g27070) or degradation (At5g22680, At5g28480, At1g32840). Signaling protein transcripts are also affected such as the wall-associated kinase 3 (At1g21240), the calmodulin binding protein IQD27 (At1g51960) and the phospholipase C (At1g13680). Interestingly, the strongest down-regulated gene in *pad2* (142.9-fold repression) encodes a putative cation exchanger (CAX9; At3g14070). Similarly, a glutamate receptor (GLR2.1; At5g27100) and a cyclic-nucleotide gated channel (CNGC18;

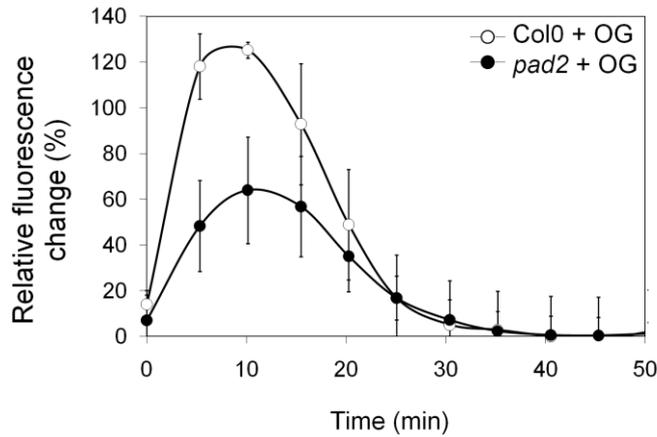
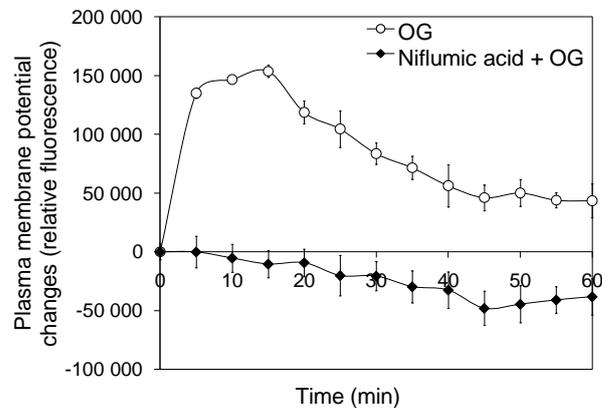


Figure 4. Plasma membrane potential changes in response to OG treatment in Col-0 and *pad2* cell suspensions.

Cells were incubated with the voltage-sensitive fluorescent probe DiBAC₄(3) (10 μM) in the dark before OG treatment (0.5 g L⁻¹). Plasma membrane depolarization was monitored by following the variation of DiBAC₄(3) fluorescence and was expressed as a relative percentage : [Fluorescence (OG) – Fluorescence (water)]/Fluorescence (water). The chart shows mean values ± SD out of five independent experiments.



Supplemental Figure S2. Effect of the anionic channel inhibitor niflumic acid on OG-induced changes of plasma membrane potential in Col-0 cell suspensions.

Cells were incubated with the voltage-sensitive fluorescent probe DiBAC₄(3) (10 μM) in the dark and were treated with 200 μM niflumic acid 10 min before 0.5 g L⁻¹ OG treatment. Plasma membrane depolarization was monitored by following the variation of DiBAC₄(3) fluorescence. Values are means of three measurements of a representative experiment out of three independent ones.

At5g14870) are also significantly down-regulated in *pad2*, suggesting a potential perturbation in plasma membrane ion fluxes that could modify downstream signaling events.

***Pad2* is impaired in plasma membrane depolarization, H₂O₂ and NO production after OG treatment or *P. brassicae* infection**

To test the hypothesis that a perturbation of ion fluxes might occur in the *pad2* mutant, cell suspensions were treated with 0.5 g.L⁻¹ OG as an elicitor of defense responses. Subsequently, changes in the plasma membrane potential of wild type and *pad2* cell suspensions were monitored by using the voltage-sensitive fluorescent probe DiBAC₄(3). This dye enters into the cell through the depolarized plasma membrane. Then its fluorescence is turned on due to the interaction with plasma membrane and membrane associate proteins. This process is reversible as a plasma membrane repolarization leads to a net efflux of the fluorophore and, consequently, a decrease of fluorescence (Konrad & Hedrich, 2008). The efficiency of DiBAC₄(3) to monitor plasma membrane depolarization was previously demonstrated (Lamotte *et al.*, 2006 ; Konrad & Hedrich, 2008). In both Col-0 and *pad2* cells, a transient increase in fluorescence, reflecting a plasma membrane depolarization, occurred within the first minutes in response to OG with a peak at 10 min. Then it reached steady level at 25 to 30 min (Fig. 4). Interestingly, in *pad2* cells the maximal fluorescence at 10 min was 2.5 times lower than in Col-0 cells. This result shows that *pad2* was partly impaired in OG-dependent plasma membrane depolarization. Addition of the Cl⁻ exchange inhibitor niflumic acid in Col-0 cells 10 min before treatment inhibited the increase of DiBAC₄(3) fluorescence, confirming the involvement of anion channels in this process (Supplemental Fig. S2).

Ion fluxes have been described to act upstream of the oxidative burst and NO production, these latter being involved in HR (Delledonne *et al.*, 2001 ; Heath, 2000 ; Greenberg & Yao, 2004 ; Roetschi *et al.*, 2001 ; Wendehenne *et al.*, 2002) which is observed during the *A. thaliana* Col-0 resistance to *P. brassicae* (Roetschi *et al.*, 2001). Based on these data and our observation that ion fluxes at the plasma membrane level were impaired in *pad2*, we checked if the production of H₂O₂ and NO was altered in this mutant. Col-0 and *pad2* were subjected to treatment with OG or *P. brassicae*. H₂O₂ production was first determined using chemiluminescence of luminol. In Col-0 cells, OG treatment elicited a transient H₂O₂ production which peaked at 10 min and decreased slowly until the end of experiment (Fig. 5A). In *pad2* cells, H₂O₂ production also transiently increased but represented only 30 % of the maximal production detected in Col-0 cells and the peak occurred later. The OG-dependent H₂O₂ production was totally inhibited by niflumic acid, confirming that this event

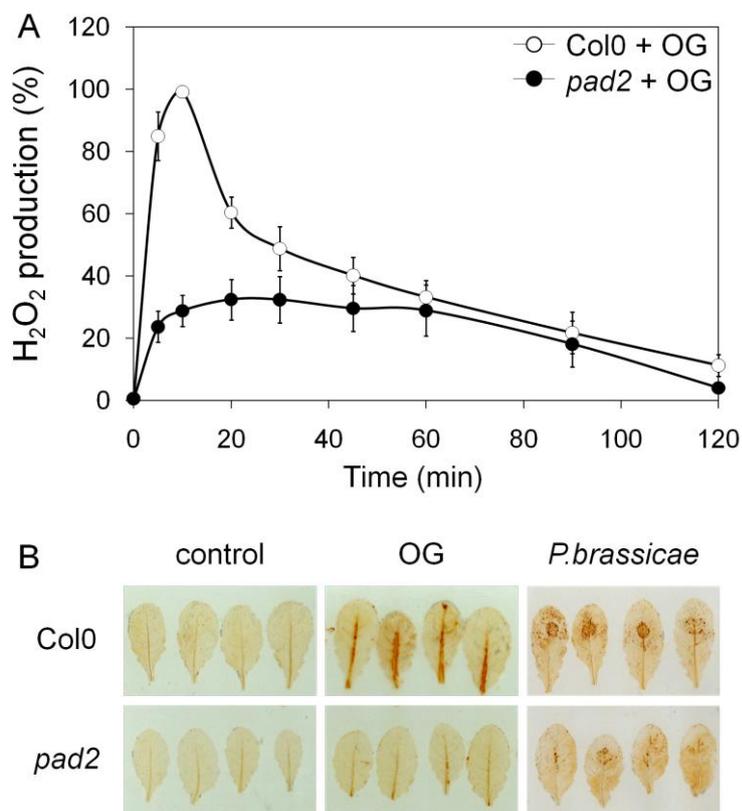


Figure 5. H₂O₂ production in response to OG or *P. brassicae* in Col-0 and *pad2*.

A, Chemiluminescence detection of H₂O₂ production in Col-0 and *pad2* cell suspensions. H₂O₂ production was measured using chemiluminescence of luminol after OG treatment (0.5 g L⁻¹). Data are expressed as a percentage of the maximum H₂O₂ production in OG-treated Col-0 cells. Values are means ± SD of nine assays.

B, *in planta* H₂O₂ detection by the DAB staining method. Leaves were treated with 2.5 g L⁻¹ OG or inoculated with a zoospore suspension of *P. brassicae* (10⁵ zoospores mL⁻¹). H₂O₂ production was detected as brown precipitates obtained after DAB staining. Results are representative of three independent experiments.

occurs downstream of anion channel activation (Supplemental Fig. S3). This weak content of H₂O₂ in *pad2* was due to an impairment of its production and not to an increase in its degradation/metabolization as H₂O₂ half-life and peroxidase or catalase global activity were identical in the two genotypes (Supplemental Fig. S4).

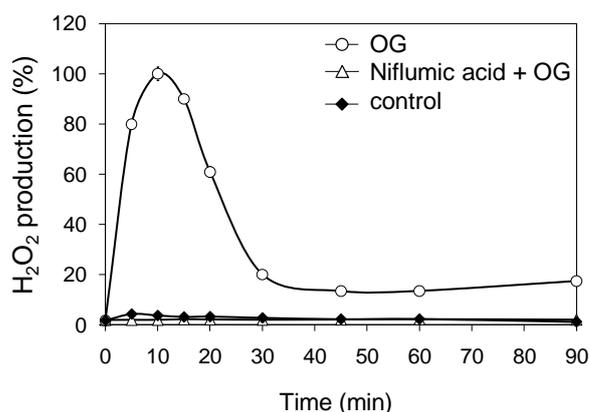
The loss of OG-induced H₂O₂ production was also observed in *pad2* leaves using a modified diaminobenzidine (DAB) staining method (Fig. 5B). In presence of peroxidases which are ubiquitous in plant tissue, H₂O₂ reacts with DAB to produce brown precipitates (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). In order to allow a higher sensitivity of the approach, an excess of horseradish peroxidase was added to the solution of DAB prior to infiltration into leaves. Such modification allowed easy visualization of OG-induced H₂O₂ production which was hardly achievable without such modification. No precipitate was detected in control leaves of Col-0 and *pad2* plants. We observed a strong brown precipitate in Col-0 leaves treated with OG whereas, under the same conditions, H₂O₂ production was weakly detected in *pad2* leaves. Similar result was obtained with leaves treated with *P. brassicae* for 2 days. Col-0 leaves showed an intense brown precipitate at the infection site whereas the response was much weaker in case of *pad2* leaves (Fig. 5B).

Intracellular NO production was monitored using the NO-sensitive probe DAF-2DA (Besson-Bard *et al.* 2008). Leaf discs were infiltrated with a solution containing OG and DAF-2DA, and the increase in fluorescence corresponding to NO accumulation was followed for 12 h (only the 8-h data are shown; Fig. 6). In water-infiltrated leaf discs, a basal fluorescence was observed in Col-0 and *pad2*, probably reflecting a constitutive NO production and/or the wounding response caused by the preparation of leaf discs. After OG treatment, an increase in fluorescence was observed in Col-0 and *pad2*. However, this increase was less pronounced in *pad2* at 8 hours after treatment. The use of the specific NO scavenger cPTIO confirmed the NO-specificity of the probe by suppressing the fluorescence triggered by OG in Col-0 and *pad2* cells.

Together, these results show that key signaling events related to defense responses are impaired in *pad2*.

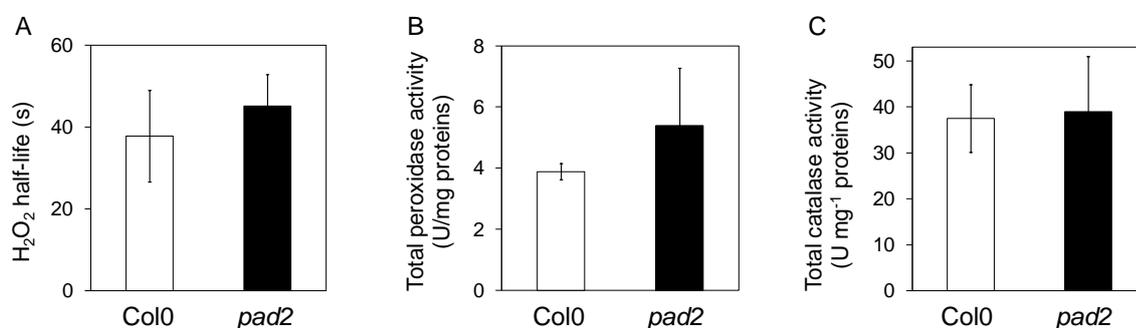
The *pad2* hyper-susceptibility to *P. brassicae* is correlated to a lack of HR

The incompatible interaction between *A. thaliana* Col-0 and *P. brassicae* isolate D is well described and leads to resistance (Roetschi *et al.*, 2001). One of the mechanisms stopping the pathogen invasion into leaf tissue is HR, which appears at 1 day post-inoculation (dpi). Since *pad2* has low H₂O₂ and NO production and is susceptible to many pathogens



Supplemental Figure S3. Effect of niflumic acid on OG-dependent H₂O₂ production in Col-0 cell suspensions.

Cells were treated with 200 μ m niflumic acid 10 min before OG treatment (0.5 g L⁻¹). H₂O₂ production was measured using chemiluminescence of luminol. Data are expressed in percentage of maximal H₂O₂ production in OG-treated cells and are means of three measurements \pm SD. Results are representative of two independent experiments.



Supplemental Figure S4. Half-life of H₂O₂ and H₂O₂-degradating enzymatic activity in Col-0 and *pad2* cell suspension.

A, Half-life of H₂O₂ was determined by measuring the absorbance of H₂O₂ at 240 nm. Data are the mean of two independent experiments.

B, Total peroxidase activity determined by measuring the absorbance of oxidized guaiacol substrate at 470 nm. Results are the mean of three independent experiments.

C, Total catalase activity determined by measuring the absorbance of H₂O₂ at 240 nm. Results are the mean of three independent experiments. No significant difference was observed between Col-0 and *pad2* for assays of H₂O₂ half-life, peroxidase and catalase activities.

including *P. brassicae*, we checked the establishment of HR in *pad2* after inoculation with *P. brassicae* (Fig. 7). Col-0 and *pad2* plants were inoculated by spraying a zoospore suspension and the establishments of HR and pathogen growth were followed by trypan blue staining preceding microscopic observations (Fig. 7A and B). No significant difference of zoospore germination and pathogen penetration efficiency were found between Col-0 and *pad2* (data not shown). However, at 1 dpi, in Col-0 epidermal or mesophyll cells HR occurred in 86 % of our observations whereas this percentage was reduced to 22 % for the *pad2* mutant (Fig. 7A). This observation was well correlated with the rate of pathogen growth as zoospores producing hyphae which were observed only in 14 % of cases in Col-0 and in 78 % of cases in *pad2*. The difference of responses to *P. brassicae* between the two genotypes was also illustrated in Fig. 7B. At 7 dpi, HR was mainly visualized in Col-0 whereas oospores were only observed in *pad2* infected plants. Macroscopically, HR-related death tissues were specifically observed in Col-0 after 7 dpi, whereas disease symptoms were observed as water-soaked lesions in the whole leaf of *pad2* (Fig. 7C).

Consequential changes in transcriptome induced by OG or *P. brassicae* between *pad2* and wild type plants

In order to identify genes which are involved in the impaired response in *pad2* under biotic stresses, we analyzed the transcriptome of wild type and *pad2* plants 1 h after OG treatment or 24 h post-infection by *P. brassicae*. Total RNAs were extracted from mock- or OG-infiltrated discs or mock-agar or *P. brassicae*-inoculated plants in three independent experiments and were analyzed using the same microarray as described above. On the whole, 810 genes were found to be significantly regulated (fold-change ≥ 2 ; P value ≤ 0.01) at least in one of the four conditions (OG-treated Col-0 or *pad2*, *P. brassicae*-inoculated Col-0 or *pad2*; Supplemental Table II (Annexe III)).

Venn diagrams of the overlapping and non-overlapping selected genes after OG or *P. brassicae* treatment of Col0 or *pad2* are shown in Fig. 8 (lists of genes in Supplemental Table III (Annexe IV)). In response to OG treatment, 52 genes were up-regulated in wild type and only one of those genes was also up-regulated in *pad2*. In the same manner, only one gene amongst the 65 repressed genes in wild type was also down-regulated in *pad2* treated with OG. Concerning *P. brassicae* infection, 22 genes were commonly up-regulated in wild type and *pad2*, whereas 227 and 219 genes were specifically induced in Col-0 and *pad2*, respectively. Moreover, amongst the 63 down-regulated genes in wild type, only six of them were repressed in *pad2*. These results clearly indicate that the transcriptome changes

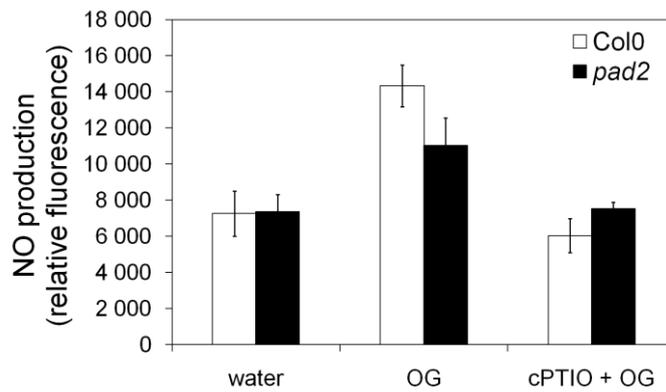


Figure 6. Intracellular NO production at 8 h after treatment with OG in Col-0 and *pad2* plants.

Leaf discs were vacuum-infiltrated with 2.5 g L⁻¹ OG and 20 μm of DAF-2DA +/- 500 μM cPTIO. NO production was monitored by measuring DAF-2T fluorescence. Values are means ± SE of eight parallels in a representative experiment out of three independent ones.

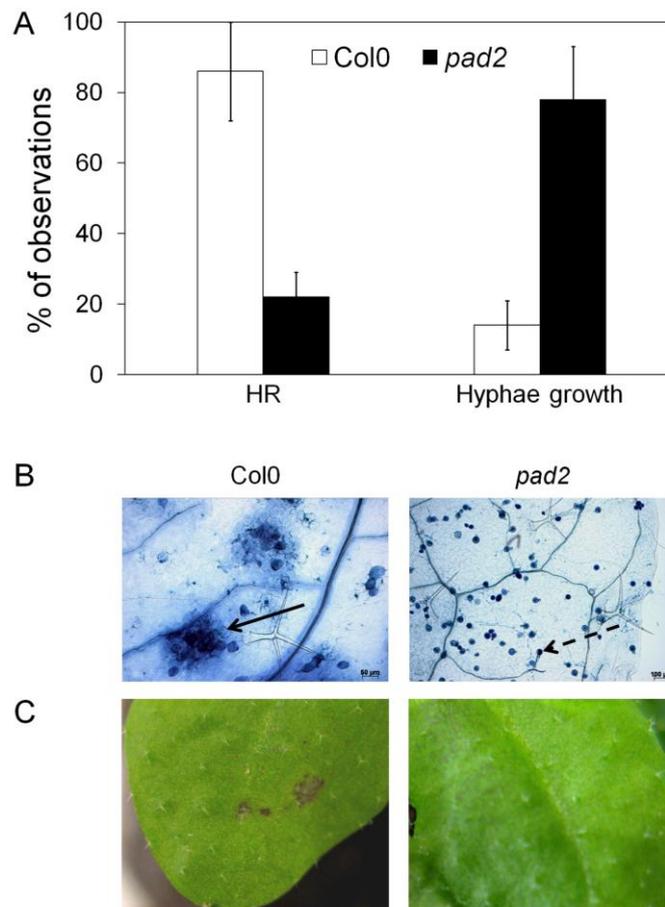


Figure 7. Hypersensitive response (HR) and *P. brassicae* development in Col-0 and *pad2* plants.

Leaves were inoculated by spraying a zoospore suspension of *P. brassicae* (10⁵ zoospores mL⁻¹) and harvested at indicated time. Hypersensitive response and pathogen structures were observed with lactophenol trypan blue staining.

A and B, Microscopic analysis of hypersensitive reaction (arrow) and pathogen growth (dotted arrow : oospore) at 1 day post-inoculation (dpi) and 7 dpi, respectively.

C, HR and water-soaked disease symptoms at 7 dpi in Col-0 and *pad2* plants, respectively.

occurring in *pad2* in response to OG and *P. brassicae* are distinct from those activated in Col-0.

These data were confirmed by the functional categorization of the genes be up- or down-regulated in Col-0 and *pad2* (Fig. 9). In Col-0, the main category of the OG-induced genes was related to signaling and only 2 % of genes were identified in protein degradation process (protein category; Fig. 9A). In *pad2*, the proportion of up-regulated genes found in these two categories was inverted, with five times more genes in protein category, containing degradation and post-translational modification processes. It is necessary known that the genes encoding proteins related to redox regulation or secondary metabolism were significantly induced in Col-0 but totally absent among the genes up-regulated in *pad2*. Concerning OG-repressed genes, the transport category in Col-0 (6 %) was absent in *pad2* and the protein category, containing synthesis, degradation and post-transcriptional modification processes, doubled in *pad2* as compared to wild type. A different distribution of genes was also observed between Col-0 and *pad2* following *P. brassicae* infection (Fig. 9B). The percentage of up-regulated genes in both signaling and RNA categories was reduced in *pad2* as compared to Col-0, whereas other categories almost did not change. However, most of the genes down-regulated in Col-0 were classified in protein category including genes involved in protein degradation and folding processes, whereas the main category in *pad2* was related to photosynthetic processes. This repression of photosynthesis-related genes in *pad2* could be due to the *P. brassicae* infection which may decrease the photosynthetic activity (Berger *et al.*, 2007).

Globally, the processes related to protein category were clearly disturbed in *pad2* in response to OG or *P. brassicae*, suggesting a strong role of glutathione-related events in the protein processing. It was confirmed in pictures portraying gene distribution in biotic stress pathway where the number of genes in proteolysis process was more important in *pad2* than in Col-0 (Supplemental Fig. S5 and S6; Mapman software).

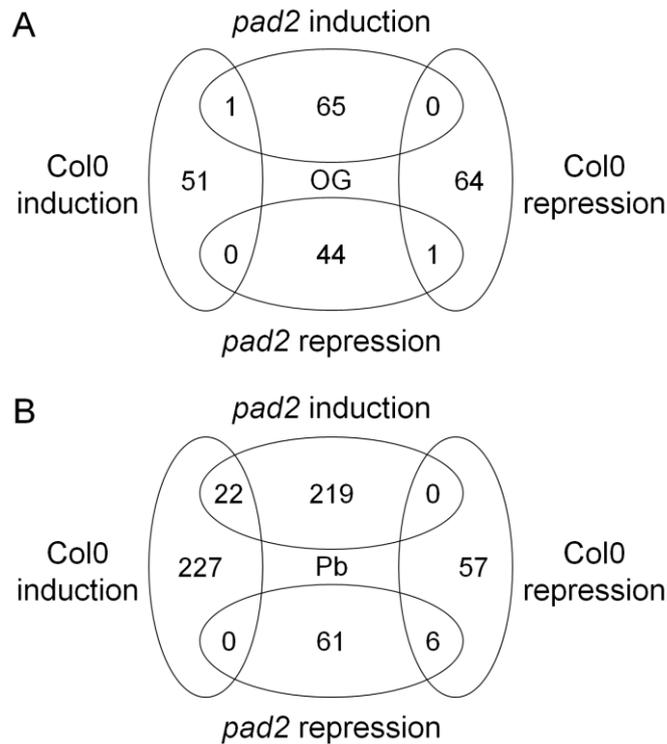


Figure 8. Overlap of significant transcriptional changes in Col-0 and *pad2* plants.

A, Venn diagram of overlapping and non-overlapping genes after 1 h of OG treatment in Col-0 and *pad2* plants. Leaf discs were vacuum infiltrated with 2.5 g L⁻¹ OG. Their mRNA was subjected to transcriptomic analysis. Three independent biological replicates were carried out.

B, Venn diagram of overlapping and non-overlapping genes after 24 h of *P. brassicae* (Pb) infection in Col-0 and *pad2* plants. Plants were inoculated with agar plugs of growing mycelium and mRNA extracted from three independent biological experiments were used for transcriptomic analysis. Induction or repression represented number of genes significantly up-regulated or down-regulated with 2.0-fold change in treated plants as compared to control, respectively ; $P \leq 0.01$.

DISCUSSION

The *pad2* mutant displays a low content of glutathione, around 20 % of wild type amount. Complementation with *GSH1* cDNA restores glutathione deficiency in *pad2* (Parisy *et al.*, 2007). GSH1 is described as the major control point of glutathione synthesis in plants and the amount glutathione depends on the regulation of GSH1 at both transcriptional and post-translational levels (Jez *et al.*, 2004; May *et al.*, 1998). Parisy *et al.* (2007) showed that under normal physiological conditions, *GSH1* and *GSH2* transcript levels were similar in *pad2* and wild type plants. Moreover, during infection with *P. brassicae*, *GSH1* and *GSH2* transcripts accumulation was higher in *pad2* as compared to Col-0, while the glutathione level remained lower in the mutant.

To establish a functional relationship between glutathione and GSH1 levels in *pad2*, we compared the concentration and post-translational regulation of GSH1 in *pad2* and Col-0 plants. GSH1 activity is modulated by redox control through thiol residues. The formation of intramolecular disulfide bonds under oxidative conditions switches the inactive to the active protein (Hothorn *et al.*, 2006; Jez *et al.*, 2004). Western blot analysis of GSH1 under reducing conditions showed that only the total amount of GSH1 in *pad2* was clearly lower than in Col-0. With GSH1 crystal structure in *Brassica juncea*, Hothorn *et al.* (2006) showed that *cad2* and *rax1* mutants are impaired in substrate binding. Depressed GSH level was caused by these conformational modifications in the two *cad2* and *rax1* mutants whereas the *pad2* mutation seems to be responsible for a drastic decrease in GSH1 protein content. Under non-reducing conditions, both reduced and oxidized forms of GSH1 were detected, a migration shift of the oxidized form of the protein being observed in the electrophoresis gel (Hicks *et al.*, 2007). As expected, in Col-0 the oxidative stress triggered by H₂O₂ caused an activation of GSH1 highlighted by a partial switch of the reduced to the oxidized form of the enzyme. In contrast, GSH1 did not undergo this post-translational modification in *pad2* even though its oxidized form was predominant at the start of the experiment. The observation that the GSH1 protein is more oxidized in *pad2* than in Col-0 is in accordance with the GRX1-roGFP2 measurements. The more oxidized GSH1 protein is most probably due to a more oxidizing *E_{GSH}*, caused by the diminished glutathione levels in the mutant. Taken together, these data suggest that the low content of glutathione in *pad2* is directly correlated to the low abundance of GSH1 protein rather than a transcriptional regulation of *GSH1*.

Glutathione is known to play a central role in antioxidant processes as it is an efficient scavenger of ROS through its cysteinyl thiol group (Noctor, 2006), although its direct role is

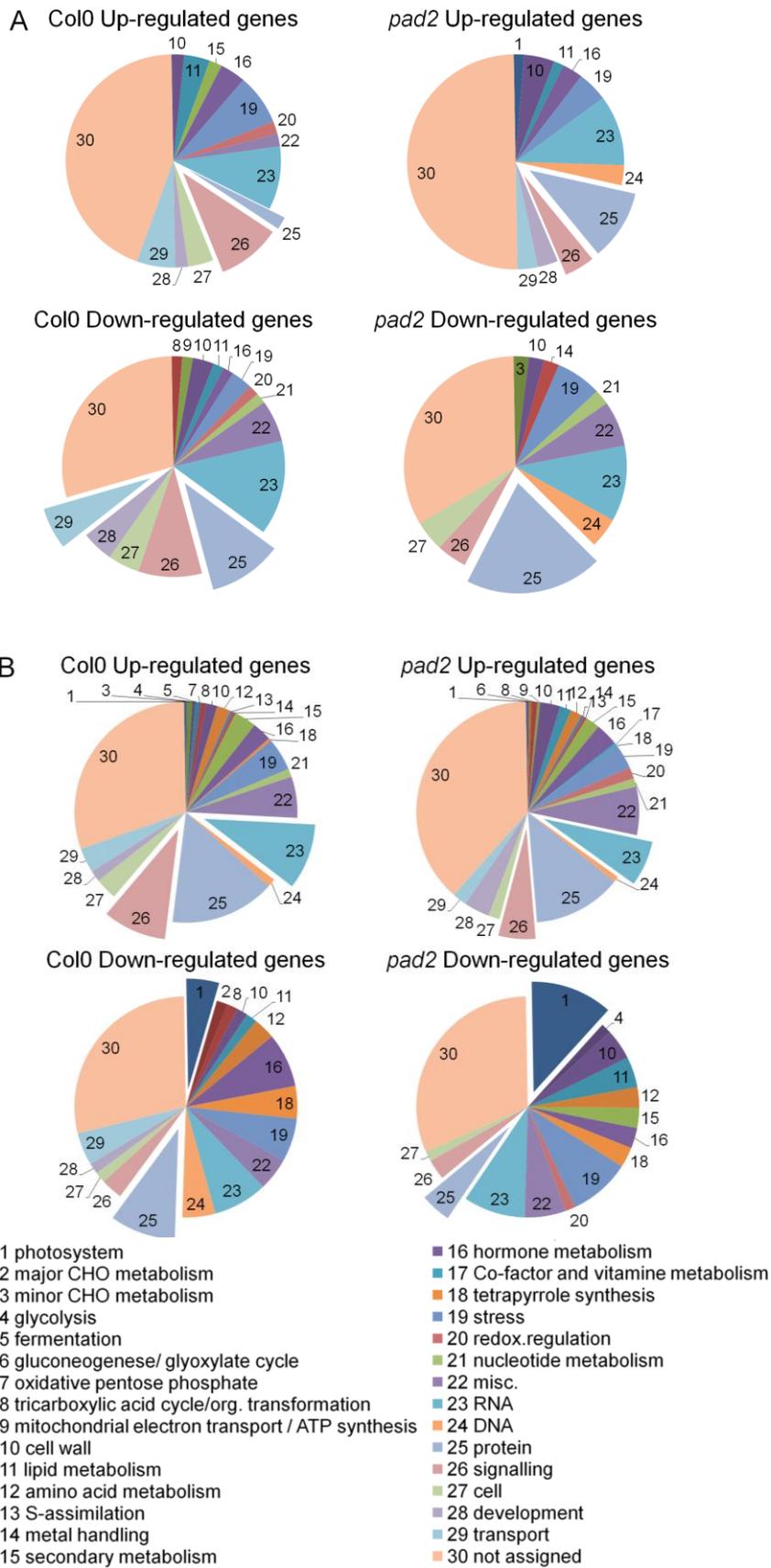
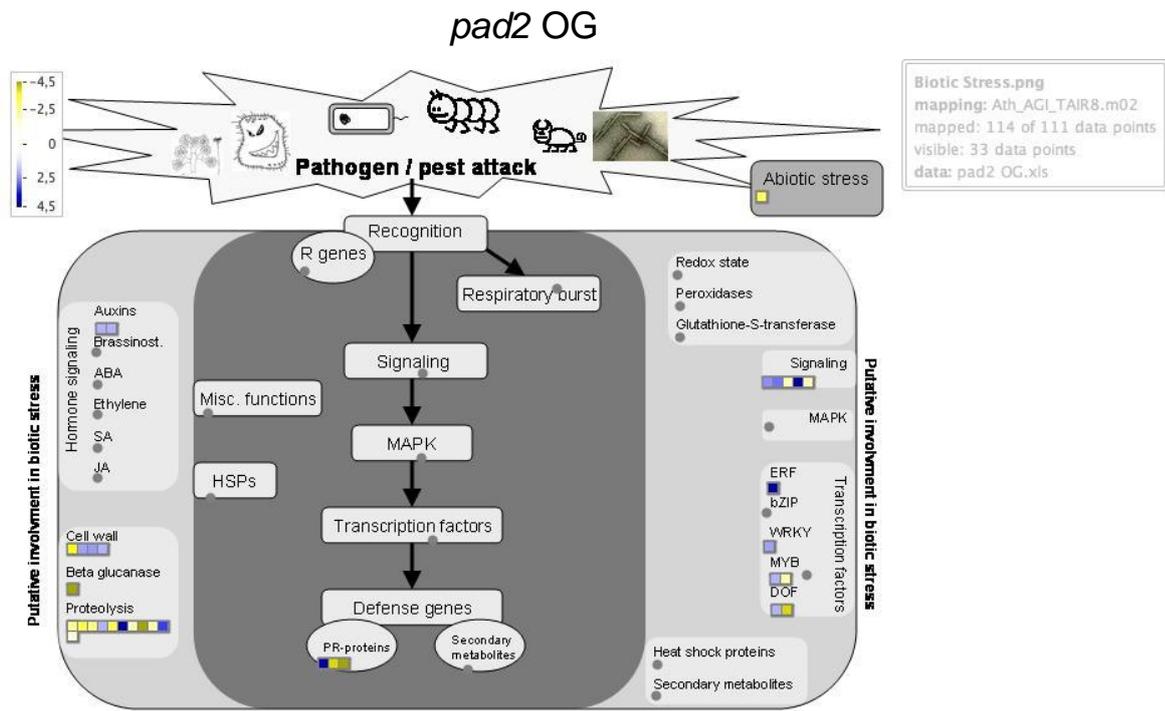
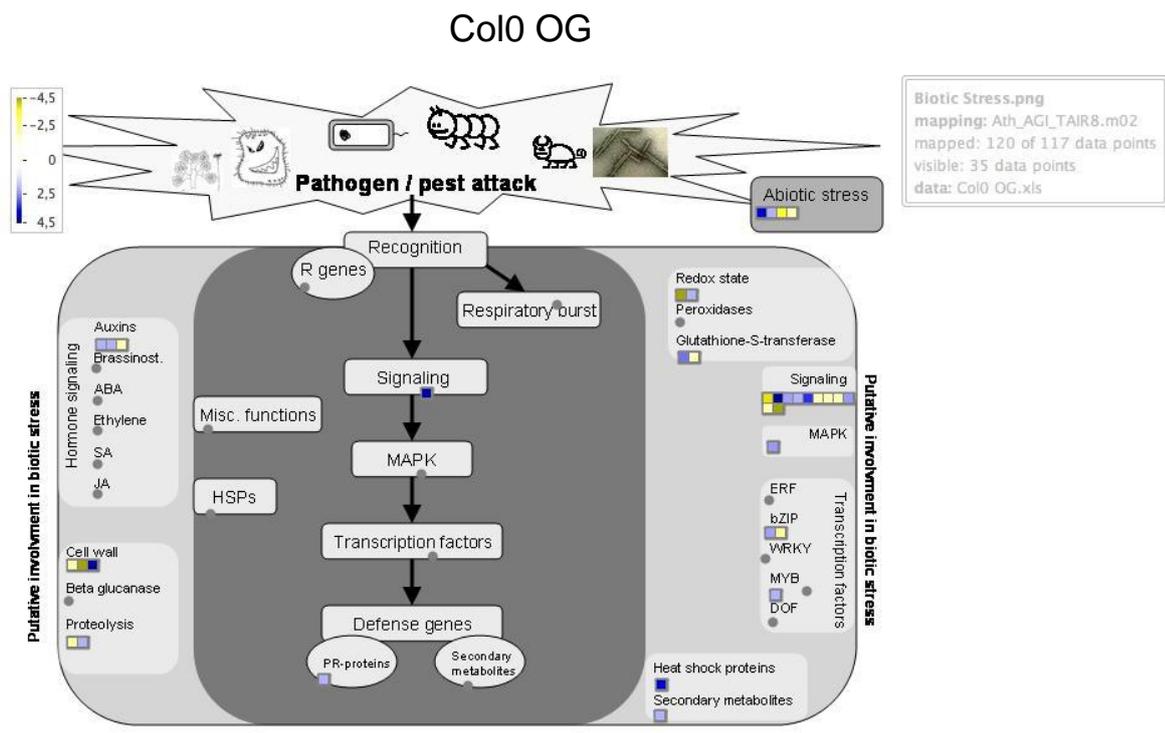


Figure 9. Functional categorization of genes differentially regulated in Col-0 and *pad2* plants (A) treated by OG or (B) inoculated by *P. brassicae*.

A part of pie chart represents the percentage of genes in a functional category based on TAIR annotations.

disputed (Winterbourn, 2008). The balance between the reduced and oxidized forms of glutathione in the cell is involved in the homeostasis of cell redox state and influences, directly or indirectly, the regulation of many cellular processes at gene or protein levels (Ball *et al.*, 2004 ; Cobbett *et al.*, 1998 ; Jez *et al.*, 2004 ; Mou *et al.*, 2003). To check whether the susceptibility of *pad2* to pathogens could be related to a deregulation of the glutathione-dependent control of the cellular redox state, we analyzed the cytosolic redox state of glutathione by following the behavior of the roGFP2 (Gutscher *et al.*, 2008 ; Schwarzländer *et al.*, 2008 ; Meyer *et al.*, 2007). In the absence of any treatment, roGFP2 was more oxidized in *pad2* than in Col-0, highlighting an oxidized glutathione redox state in *pad2*. Similarly, in the glutathione-deficient *cad2* mutant containing only 30 % of wild type glutathione, an increased fraction of roGFP2 was found in the oxidized state (Meyer *et al.*, 2007). In the same way, Maughan *et al.* (2010) showed that a shift in the glutathione redox potential in the cytosol is sufficient to trigger plants susceptible to pathogens. The oxidized state of glutathione could be explained by an alteration of the mechanisms maintaining the high reduced level of glutathione in the glutathione-ascorbate cycle through enzymatic system using the reducing power of NAD(P)H (Foyer & Noctor, 2005 ; Noctor, 2006).

We carried out an analysis of the transcriptome of *pad2* to check the incidence of the low glutathione content and the oxidized redox state on gene expression. Previously, using the glutathione-deficient *cad2* and *rax1* mutants, Ball *et al.* (2004) showed that the content of glutathione influences the expression of stress defense-related genes encoding proteins as PR-1 like protein, chitinase (class IV) or cation exchanger CAX1. Similarly, we found that the *pad2* mutant displays a distinct gene expression profile as compared to wild type plants. More precisely, our results showed that all the genes differentially expressed in *pad2* as compared to Col-0 are repressed, except one. Most of them are members of the so-called RNA-related class and include genes encoding transcription factor (7 out of 64). The difference in the identity of the gene differentially expressed in *cad2*, *rax1* and *pad2* mutants might be related to distinct glutathione content. Nevertheless, two genes encoding cation exchangers, namely CAX9 and CAX1, were independently found to be down-regulated in the *pad2* and *cad2* mutants, respectively. These channels have been shown to be involved in Ca²⁺ transport in plant cells (for review, Sze *et al.*, 2000). Since Ca²⁺ is recognized as a second messenger in stress defense signaling pathway (Lecourieux *et al.*, 2006), a perturbation of the Ca²⁺ signaling caused by the down regulation of CAX9 or CAX1 might, at least partly, contribute to the susceptibility of mutants. Further such hypothesis is supported by the finding that the genes encoding the putative Ca²⁺-permeable channels glutamate receptor GluR2.1 and



Supplemental Figure S5. Distribution of genes regulated by OG in Col-0 and *pad2* in biotic stress pathway.

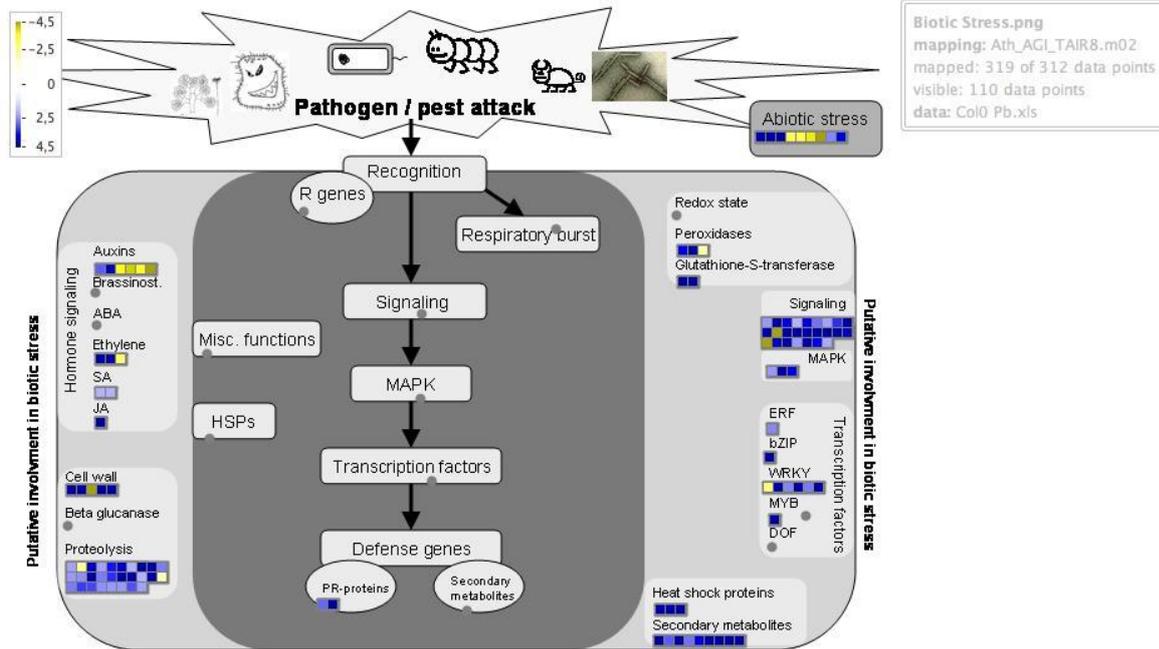
Up-regulated or down-regulated genes are represented with a blue or yellow square, respectively.

cyclic nucleotide-gated channel CNGC 18 are also down-regulated in *pad2*. The down-regulation of these genes could also explain the reduced intensity of the plasma membrane depolarization as well as the lower H₂O₂ and NO production observed in response to OG. Indeed, Ca²⁺ fluxes and/or anion effluxes were shown to act upstream of elicitor-induced early signaling events including changes in plasma membrane potential as well as H₂O₂ and NO synthesis (Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Gauthier *et al.*, 2007). Accordingly, *pad2* also displayed a reduced content of ROS in response to *P. brassicae* infection. This data was consistent with those of Belhaj *et al.* (2009) who found that the Arabidopsis *rph1* (*resistance to Phytophthora1*) mutant, which is highly susceptible to *P. brassicae*, is also impaired in H₂O₂ production. More generally, the impairment of early signaling events observed in *pad2* might explain, at least partly, the absence of HR following *P. brassicae* infection. Indeed, all of these events are reported to mediate pathogen or elicitor-induced cell death (Hofius *et al.*, 2007; Mur *et al.*, 2008).

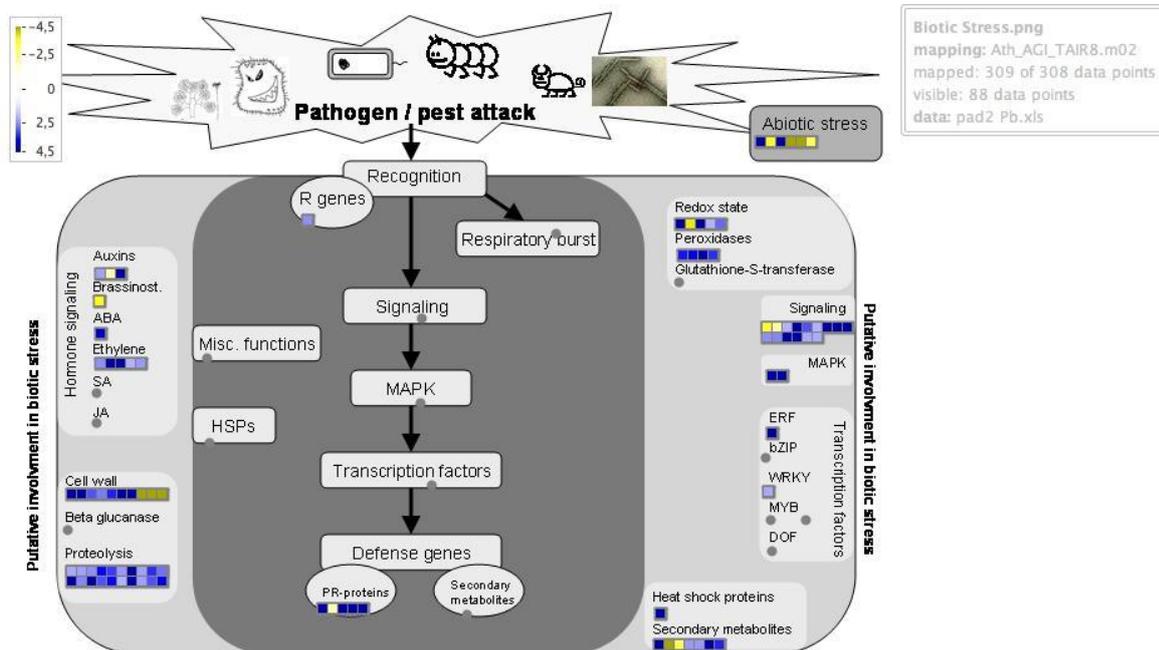
We also carried out transcriptomic analysis in wild type and *pad2* in response to OG or *P. brassicae* infection. In our experiments, few genes were commonly regulated in both genotypes after OG or *P. brassicae* stresses, showing that *pad2* clearly displays a different gene expression profile. The main functional category of genes which fluctuates between Col-0 and *pad2* was related to the protein regulation including synthesis, degradation, post-transcriptional modification and folding processes. Amongst these genes, some encoded proteins involved in proteasome-dependent proteolysis process. The ubiquitin-26S proteasome system has been reported to be the main proteolytic system involved in plant cellular signaling, and also in plant innate immunity (Craig *et al.*, 2009). Interestingly, in the neurodegenerative Parkinsons's disease, emerging evidence suggests that GSH depletion play an active role in the dysfunction of the ubiquitin-proteasome system leading to accumulation of damaged and misfolded proteins (Martin & Teismann, 2009). It has been shown that degradation process of oxidized and damaged proteins under oxidative stress is activated *via* the proteasome system to maintain cellular homeostasis (Friguet, 2006; Squier, 2006). Recently, Dixon *et al.* (2005) have shown that many subunits of the proteasome complex are glutathionylated in Arabidopsis suggesting a direct link between GSH depletion and proteasome activity. Thus, the turn-over of proteins seems to be altered in *pad2* and could be a consequence of the modified glutathione level and the related alteration in E_{GSH} .

In this study, we reported that the *pad2* mutant is characterized by an alteration of main cellular events involved in signal transduction and regulation of gene expression, thus highlighting a key role for glutathione in those processes under normal physiological

Col0 *P. brassicae*



pad2 *P. brassicae*



Supplemental Figure S6. Distribution of genes regulated by *P. brassicae* in Col-0 and *pad2* in biotic stress pathway.

Up-regulated or down-regulated genes are represented with a blue or yellow square, respectively.

conditions and upon elicitation of defense responses. Dissection of the cellular mechanisms underlying the susceptibility of *pad2* to biotic stress will provide further insights in the understanding of plant innate immunity process related to modification of the glutathione regulated redox status.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture Conditions and Treatment

Wild type *Arabidopsis* Col-0 and *pad2* cell suspensions were cultivated in Gamborg B5 medium (Duchefa, Gamborg *et al.*, 1968) with 30 g L⁻¹ Suc. and 0.2 mg L⁻¹ 1-naphtalene acetic acid (Duchefa) on a rotary shaker (120 rpm) at 24°C under continuous light (25 μmol m⁻² s⁻¹). Cell suspension was routinely subcultured once a week. For elicitor treatment, cells were collected 1 day after sub-culturing, washed with M10 buffer (10 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 0.5 mM CaCl₂, pH 6.2) and re-suspended at 0.1 g of fresh weight of cells (FWC) per mL of M10 buffer. After 1 h of equilibration (125 rpm at 24°C), cells were treated with water or 0.5 g L⁻¹ OGs (Goëmar laboratories Saint-Malo, France) and the measurements of plasma membrane depolarization or H₂O₂ production were performed.

Plant Growth Conditions and Treatment

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia-0 (Col-0) wild type or *pad2*, *cad2* and *rax1* mutant plants were grown in Jiffy-7 peat pellets (Jiffy) in a controlled growth chamber under a 10/14 h day/night cycle at 20/18°C (70 % relative humidity) with a light intensity of 175 μmol m⁻² s⁻¹ provided by fluorescent tubes.

The transformation of Col-0 and *pad2* with GRX1-roGFP2 was done by floral dip, according to Clough & Bent (1998).

For elicitation, leaf discs (7 mm-diameter) from 8-week-old plants were treated with water or 2.5 g L⁻¹ OGs in Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) under vacuum conditions for 2 min then collected at indicated time. For NO production measurement, the NO scavenger cPTIO (0.5 mM; Sigma-Aldrich) and the fluorescent probe DAF-2DA (20 μM; Sigma-Aldrich) were added in the Tris buffer at the same time as OGs. Precisely, 12 discs were cut from three

plants per kinetic point for GSH1 redox state analysis or expression profiling. For NO production, eight leaf discs from eight plants were used for each treatment.

For H₂O₂ detection, leaves were cut and infiltrated with a 20 mM MES buffer (pH 6.2) containing 2.5 g L⁻¹ OGS, 10 U mL⁻¹ peroxidase and 1 g L⁻¹ DAB (Sigma-Aldrich).

Pathogen Growth and Plant Inoculation

P. brassicae isolate D was routinely grown on 20 % V8 agar medium (Campbell Foods) supplemented with 3.5 g L⁻¹ CaCO₃ (pH 5) in a controlled chamber in the dark at 19°C.

For H₂O₂ detection and transcription profile analysis, 4-week-old plants were inoculated by putting agar plugs of 8-day-old mycelium upside-down on leaf surface. Uninoculated plugs were used for control treatments. Twelve leaves from three plants per time point were used and susceptibility was checked at 7 dpi by estimating symptom development as previously described (Parisy *et al.*, 2007). For hypersensitive response and susceptibility assays, plants were inoculated by spraying a suspension of zoospores at a concentration of 10⁵ zoospores mL⁻¹. Zoospores were produced as described by Roetschi *et al.* (2001). Inoculated plants were put under the same conditions as pathogen growth conditions at 100 % relative humidity with dark period for 14 first hours.

Measurement of Plasma Membrane Depolarization

Plasma membrane depolarization was monitored using the voltage-sensitive fluorescent probe DiBAC₄(3) (Sigma-Aldrich; Konrad & Hedrich, 2008). After 1 h of equilibration, cells were incubated 30 min with 10 μM DiBAC₄(3) in M10 buffer in the dark. Then, 0.5 mL of cells was transferred into 24-well plates (Costar) and treated with water or OGS. DiBAC₄(3) fluorescence was recorded continuously at 1-min intervals using a fluorimeter (Fluoroskan Ascent Fluorometer, Labsystems ; λ_{excitation} = 485 nm and λ_{emission} = 535 nm) and expressed as relative fluorescence units. Cells were maintained under shaking during measurements.

H₂O₂ Production Measurement and Leaf Tissue Localization

In cell suspensions, H₂O₂ production was determined using chemiluminescence of luminol. 250-μL aliquots of cells were added to 300 μL of H50 buffer (50 mM HEPES,

175 mM mannitol, 0.5 mM K₂SO₄, 5 mM CaCl₂, pH 8.5) and 50 µL of 0.3 mM luminol. Chemiluminescence, measured within a 10-s period with a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold), was integrated and was expressed in nmol of H₂O₂ per g of FWC, using a standard calibration curve obtained by adding H₂O₂ in aliquots of cells.

In plants a modified procedure by Thordal-Christensen *et al.* (1997) was applied. Leaves were vacuum-infiltrated with a 20 mM MES buffer (pH 6.2) containing 2.5 g L⁻¹ of OG, 1 g L⁻¹ DAB and 10 U mL⁻¹ horseradish peroxidase, then washed with MES buffer. Infiltrated leaves were incubated in dark at room temperature for 1 to 8 hours. Then leaves were destained with a solution of glycerol:lactic acid:ethanol (1:1:3, v/v/v) at 85°C for 5 min. H₂O₂ production was visualized macroscopically as brown precipitates in plant tissues.

Measurement of H₂O₂ half-life, total peroxidase activity and total catalase activity

Total proteins from Col-0 and *pad2* cell suspension were extracted with 100 mM potassium phosphate buffer supplemented with 1 % polyvinylpolypyrrolidone and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7. H₂O₂ half-life and catalase activity were determined by measuring the absorbance of H₂O₂ at 240 nm with a spectrophotometer. H₂O₂ solution was added in 95 µL of water + 5 µl of total proteins to measure an absorbance of 0.5. The absorbance was measured for 10 min. The decrease in absorbance was expressed in specific catalase activity (U mg⁻¹ proteins). For peroxidase activity measurement, 50 mM of peroxidase substrate gaïacol and 2 mM H₂O₂ were added to total proteins and the absorbance of oxidized gaïacol was measured at 470 nm and was expressed in specific peroxidase activity (U mg⁻¹ proteins).

Nitric Oxide Production Measurement

Intracellular NO accumulation was determined using the specific fluorophore DAF-2DA (Sigma-Aldrich) as described by Besson-Bard *et al.* (2009). Briefly, after infiltration with treatment and fluorophore, leaf discs were incubated for 1 h in the dark, washed three times with 50 mM mM Tris buffer pH 7.5 to wash off excessive fluorophore, and transferred into 96-well plates (Costar) containing 100 µL of the treatment solution. NO production was measured using a fluorimeter (Fluoroskan Ascent Fluorometer, Labsystems ; λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 510 nm). Fluorescence was expressed as relative fluorescence units.

Protein Extraction and Western Blot Analyses

Totals proteins were extracted from 12 leaf discs in 350 μ L of extraction buffer (50 mM HEPES, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM β -glycerolphosphate, 10 mM NaF, 5 mg L^{-1} leupeptin, 5 mg L^{-1} antipain, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5) with or without 0.1 M dithiothreitol (DTT). After centrifugation (15 min, 10,000 g), 15 μ g of soluble proteins were treated with Laemmli buffer (4 min at 100°C) and were subjected SDS-PAGE on 12 % gel before transfer to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Biosciences) for western blot analysis. GSH1 protein was detected with an antibody raised against a recombinant of AtGSH1 (antibody provided by J. Jez, Donald Danforth Plant Science Center, Saint-Louis, Missouri). Primary antibody detection was performed as described in the LumiGlo detection kit (Cell Signaling Technology) with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (Sigma-Aldrich).

Microarray Hybridization and Data Analysis

Total RNA was extracted from each sample using the SV total RNA isolation system (Promega). RNA quality was assessed by checking 28S/18S RNA ratio in agarose gel and determining $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ and $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ ratios with spectrophotometer. cDNA preparation and hybridization were carried out at the University of Arizona on Array Ready Oligo Set V3.0 (Qiagen-Operon) containing 26000 oligonucleotides which represented 25240 identified genes in *A. thaliana*, with 2-channel detection according to the protocol Microarray target preparation and hybridization (<http://ag.arizona.edu/microarray/methods.html>). For both OG and *P. brassicae* experiments, three biological replicates for each treatment were independently analyzed. Array slides were scanned for Cy3 and Cy5 dye fluorescent signals and feature extraction was performed with GenePix Pro 6.0 software (Axon Instruments).

For OG and *P. brassicae* experiments, raw data was the pixel intensity from fluorescence of dyes Cy3 and Cy5 measured in each spot for each array. A processing of data was performed before the expression profiling. Background calculated with internal controls was subtracted to each intensity value. Central normalization was applied for each spot by determining the ratio intensity/total intensity of array to avoid labeling and fluorophore bias. To increase analysis sensitivity, the average of three independent biological replicates was chosen to determine expression profile of each condition. To determine differentially expressed genes in treated condition as compared to control, a Student's t test for pairwise comparison was performed with a threshold of P value ≤ 0.01 and ratio treated/control was

computed for each gene. Based on the statistical analysis, genes were considered significantly up- or down-regulated in response to treatment or infection if the fold change between treated and control plants is ≥ 2.0 , with P value ≤ 0.01 .

A Venn diagram of the number of non- and overlapping genes in response to OG or *P. brassicae* were done using TIGR Multi-Experiment Viewer (TMeV) software version 3.0.2. The ratio data were \log_2 transformed into the TMeV software for the hierarchical clustering. Description and functional categorization of regulated genes were based on TAIR annotations by using MapMan software version 3.1.0.

Hypersensitive Response and Pathogen Development

The infected leaves were harvested at the appropriate time points and stained with an alcoholic lactophenol trypan blue solution (Keogh *et al.*, 1980) by boiling for one minute and keeping overnight in the staining solution. Leaves were clarified in 2.5 g mL^{-1} chloral hydrate solution. Hypersensitive response and pathogen structures were examined with a microscope (Leitz DM RB, Leica).

CLSM imaging and ratiometric analysis

Confocal laser scanning microscopy imaging and ratiometric analysis in Col-0 and *pad2* plants expressed GRX1-roGFP2 were carried out as described by Schwarzländer *et al.* (2008). Briefly, fluorescence of roGFP2 was analyzed in leaf tissue of 7 day-old *in vitro* grown seedlings. Images were taken with a 25x lens, in multi-track mode with line switching and averaging of two frames. The probe was excited with 405 nm laser in track 1 and with 488 nm laser in track 2. roGFP2 fluorescence was collected with a bandpass filter of 505–530 nm.

Ratiometric image analysis was done using a custom Matlab analysis suite as described in Schwarzländer *et al.* (2008). Pixels with intensities within 10 % saturation or with less than two standard deviation units above background were ignored for the analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

Carole Dubreuil-Maurizi is supported by a grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was financially supported by the Conseil Régional de Bourgogne, Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne and the Comité National des Interprofessions des Vins d'appellation d'origine.

We thank Delphine Desqué for excellent technical assistance and Joseph Jez for providing the anti-GSH1 antibody. We also thank François Bouteau for helpful discussion.

LITERATURE CITED

- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Ball L, Accotto GP, Bechtold U, Creissen G, Funck D, Jimenez A, Kular B, Leyland N, Mejia-Carranza J, Reynolds H, Karpinski S, Mullineaux PM** (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2448-2462
- Belhaj K, Lin BQ, Mauch F** (2009) The chloroplast protein RPH1 plays a role in the immune response of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae*. *Plant Journal* **58**: 287-298
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T** (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4019-4026
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D** (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**: 1302-1315
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 21-39
- Bohman S, Staal J, Thomma B, Wang ML, Dixelius C** (2004) Characterisation of an Arabidopsis-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Journal* **37**: 9-20
- Boller T, Felix G** (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379-406

- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Journal* **16**: 73-78
- Craig A, Ewan R, Mesmar J, Gudipati V, Sadanandom A** (2009) E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1123-1132
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A** (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences* **34**: 85-96
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13454-13459
- Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR** (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181-2191
- Dixon DP, Skipsey M, Grundy NM, Edwards R** (2005) Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**: 2233-2244
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5**: 193-198
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM** (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal* **35**: 193-205
- Flor H** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 455-484
- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Friguet B** (2006) Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *Febs Letters* **580**: 2910-2916
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**: 151-&
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 711-724

- Gauthier A, Lamotte O, Reboutier D, Bouteau F, Pugin A, Wendehenne D** (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* **2**: 86-95
- 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 Sciences of the United States of America* **91**: 8955-8959
- Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM** (1997) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* **31**: 547-569
- Greenberg JT, Yao N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**: 201-211
- Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP** (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature Methods* **5**: 553-559
- Hammerschmidt R** (1999) Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* **37**: 285-306
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**: 321-334
- Hicks LM, Cahoon RE, Bonner ER, Rivard RS, Sheffield J, Jez JM** (2007) Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 2653-2661
- Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JDG, Mundy J** (2007) Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology* **17**: 166-187
- Hothorn M, Wachter A, Gromes R, Stuwe T, Rausch T, Scheffzek K** (2006) Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 27557-27565
- Jez JM, Cahoon RE, Chen SX** (2004) *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase - Functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 33463-33470
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Keogh RC, Deverall BJ, McLeod S** (1980) Comparison of histological and physiological-responses to *phakopsora-pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. *Transactions of the British Mycological Society* **74**: 329-333
- Konrad KR, Hedrich R** (2008) The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant Journal* **55**: 161-173
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D** (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology And Medicine* **40**: 1369-1376

- Lecourieux D, Raneva R, Pugin A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New phytologist* **171**: 249-269
- Martin HL, Teismann P** (2009) Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. *Faseb Journal* **23**: 3263-3272
- Maughan SC, Pasternak M, Cairns N, Kiddle G, Brach T, Jarvis R, Haas F, Nieuwland J, Lim B, Muller C, Salcedo-Sora E, Kruse C, Orsel M, Hell R, Miller AJ, Bray P, Foyer CH, Murray JAH, Meyer AJ, Cobbett CS** (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2331-2336
- May MJ, Vernoux T, Sanchez-Fernandez R, Van Montagu M, Inze D** (1998) Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 12049-12054
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R** (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant Journal* **52**: 973-986
- Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin JM, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Lemaire SD** (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16478-16483
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490-498
- Mou Z, Fan WH, Dong XN** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935-944
- Mullineaux PM, Rausch T** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research* **86**: 459-474
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**: 501-520
- Noctor G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell and Environment* **29**: 409-425
- Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F** (2007) Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **49**: 159-172
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 537-548
- Reuber TL, Plotnikova JM, Dewdney J, Rogers EE, Wood W, Ausubel FM** (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant Journal* **16**: 473-485

- Roetschi A, Si-Ammour A, Belbahri L, Mauch F, Mauch-Mani B** (2001) Characterization of an Arabidopsis-Phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Journal* **28**: 293-305
- Schlaeppli K, Bodenhausen N, Buchala A, Mauch F, Reymond P** (2008) The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant Journal* **55**: 774-786
- Schwarzlander M, Fricker MD, Muller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, Meyer AJ** (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *Journal of Microscopy-Oxford* **231**: 299-316
- Squier TC** (2006) Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 217-228
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF** (2000) Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: Insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 433-462
- ThordalChristensen H, Zhang ZG, Wei YD, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* **11**: 1187-1194
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373-378
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible WR, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S, Stitt M** (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology* **138**: 1195-1204
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162
- van Wees SCM, Chang HS, Zhu T, Glazebrook J** (2003) Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology* **132**: 606-617
- Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T** (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant Journal* **41**: 15-30
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse J, Barbier-Brygoo H, Pugin A** (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1937-1951
- Winterbourn CC** (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* **4**: 278-286

	1				50
GSH1	MALLSQAGGS	YTVVPSGVCS	KAGTKAVVSG	GVRNLDVLRM	KEAFGSSYSR
pad2-1	MALLSQAGGS	YTVVPSGVCS	KAGTKAVVSG	GVRNLDVLRM	KEAFGSSYSR
rax1-1	MALLSQAGGS	YTVVPSGVCS	KAGTKAVVSG	GVRNLDVLRM	KEAFGSSYSR
cad2-1	MALLSQAGGS	YTVVPSGVCS	KAGTKAVVSG	GVRNLDVLRM	KEAFGSSYSR
	51				100
GSH1	SLSTKSMLLH	SVKRSKRGHQ	LIVAASPSTE	EAVVATEPLT	REDLIAYLAS
pad2-1	SLSTKSMLLH	SVKRSKRGHQ	LIVAASPSTE	EAVVATEPLT	REDLIAYLAS
rax1-1	SLSTKSMLLH	SVKRSKRGHQ	LIVAASPSTE	EAVVATEPLT	REDLIAYLAS
cad2-1	SLSTKSMLLH	SVKRSKRGHQ	LIVAASPSTE	EAVVATEPLT	REDLIAYLAS
	101				150
GSH1	GCKTKDKYRI	GTEHEKFGFE	VNTRLRPMKYD	QIAELLNGIA	ERFEWEKVME
pad2-1	GCKTKDKYRI	GTEHEKFGFE	VNTRLRPMKYD	QIAELLNGIA	ERFEWEKVME
rax1-1	GCKTKDKYRI	GTEHEKFGFE	VNTRLRPMKYD	QIAELLNGIA	ERFEWEKVME
cad2-1	GCKTKDKYRI	GTEHEKFGFE	VNTRLRPMKYD	QIAELLNGIA	ERFEWEKVME
	151				200
GSH1	GDKIIGLKQG	KQSISLEPGG	QFELSGAPLE	TLHQTCAEVN	SHLYQVKAVA
pad2-1	GDKIIGLKQG	KQSISLEPGG	QFELSGAPLE	TLHQTCAEVN	SHLYQVKAVA
rax1-1	GDKIIGLKQG	KQSISLEPGG	QFELSGAPLE	TLHQTCAEVN	SHLYQVKAVA
cad2-1	GDKIIGLKQG	KQSISLEPGG	QFELSGAPLE	TLHQTCAEVN	SHLYQVKAVA
	201				250
GSH1	EEMGIGFLGI	GFQPKWRRED	IPIMPKGRYD	IMRNYMPKVG	TLGLDMLRT
pad2-1	EEMGIGFLGI	GFQPKWRRED	IPIMPKGRYD	IMRNYMPKVG	TLGLDMLRT
rax1-1	EEMGIGFLGI	GFQPKWRRED	IPIMPKGRYD	IMRNYMPKVG	TLGLDMLRT
cad2-1	EEMGIGFLGI	GFQPKWRRED	IPIMPKGRYD	IMRNYM.LG	TLGLDMLRT
	251				300
GSH1	CTVQVNLDFS	SEADMIRKFR	AGLALQPIAT	ALFANSPFTE	GKPNGFLSMR
pad2-1	CTVQVNLDFS	SEADMIRKFR	AGLALQPIAT	ALFANSPFTE	GKPNGFLNMR
rax1-1	CTVQVNLDFS	SEADMIRKFR	AGLALQPIAT	ALFANSPFTE	GKPNGFLSMR
cad2-1	CTVQVNLDFS	SEADMIRKFR	AGLALQPIAT	ALFANSPFTE	GKPNGFLSMR
	301				350
GSH1	SHIWTDTDKD	RTGMLPFVFD	DSFGFEQYVD	YALDVPMYFA	YRKNKYIDCT
pad2-1	SHIWTDTDKD	RTGMLPFVFD	DSFGFEQYVD	YALDVPMYFA	YRKNKYIDCT
rax1-1	SHIWTDTDKD	RTGMLPFVFD	DSFGFEQYVD	YALDVPMYFA	YRKNKYIDCT
cad2-1	SHIWTDTDKD	RTGMLPFVFD	DSFGFEQYVD	YALDVPMYFA	YRKNKYIDCT
	351				400
GSH1	GMTFRQFLAG	KLPCLPGELP	SYNDWENHLT	TIFPEVRLKR	YLEMRGADGG
pad2-1	GMTFRQFLAG	KLPCLPGELP	SYNDWENHLT	TIFPEVRLKR	YLEMRGADGG
rax1-1	GMTFRQFLAG	KLPCLPGELP	SYNDWENHLT	TIFPEVRLKR	YLEMRGADGG
cad2-1	GMTFRQFLAG	KLPCLPGELP	SYNDWENHLT	TIFPEVRLKR	YLEMRGADGG
	401				450
GSH1	PWRRICALPA	FWVGLLYDDD	SLQAILDLLTA	DWTPAEREML	RNKVPVTGLK
pad2-1	PWRRICALPA	FWVGLLYDDD	SLQAILDLLTA	DWTPAEREML	RNKVPVTGLK
rax1-1	PWRRICALPA	FWVGLLYDDD	SLQAILDLLTA	DWTPAEREML	RNKVPVTGLK
cad2-1	PWRRICALPA	FWVGLLYDDD	SLQAILDLLTA	DWTPAEREML	RNKVPVTGLK
	451				500
GSH1	TPFRDGLLKH	VAEDVLKLA	DGLERRGYKE	AGFLNAVDEV	VRTGVTPAEK
pad2-1	TPFRDGLLKH	VAEDVLKLA	DGLERRGYKE	AGFLNAVDEV	VRTGVTPAEK
rax1-1	TPFRDGLLKH	VAEDVLKLA	DGLERRGYKE	AGFLNAVDEV	VRTGVTPAEK
cad2-1	TPFRDGLLKH	VAEDVLKLA	DGLERRGYKE	AGFLNAVDEV	VRTGVTPAEK
	501				522
GSH1	LLEMYNGEWG	QSVDPVFEEL	LY		
pad2-1	LLEMYNGEWG	QSVDPVFEEL	LY		
rax1-1	LLEMYNGEWG	QSVDPVFEEL	LY		
cad2-1	LLEMYNGEWG	QSVDPVFEEL	LY		

Figure 34. Alignement de la séquence protéique de GSH1 chez le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* d'*A. thaliana*.

Les acides aminés notés en rouge correspondent aux résidus mutés de chaque mutant. Les quatre résidus cystéines appartenant aux deux ponts disulfures impliqués dans la régulation enzymatique sont surlignés en jaune (Cys¹⁸⁶-Cys⁴⁰⁶, Cys³⁴⁹-Cys³⁶⁴; Hothorn *et al.*, 2006). Les acides aminés surlignés en orange sont les résidus appartenant au site actif de l'enzyme déterminés chez *B. juncea* par Gromes *et al.* (2008).

3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

3.1 Analyses de la séquence protéique de GSH1 : prédiction de structure tertiaire et des modifications post-traductionnelles chez le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* d'*A. thaliana*

3.1.1 Impact de la mutation de GSH1 sur le taux de glutathion : alignement de séquence primaire de GSH1 entre le sauvage, *pad2*, *cad2* et *rax1*

Puisque le faible taux de glutathion chez *pad2* n'est pas directement relié au taux de transcrits *GSH1* (Parisy *et al.*, 2007), nous avons étudié l'impact putatif de la mutation *pad2* sur la structure prédite de la protéine, cette mutation pouvant modifier l'activité enzymatique de GSH1 ou éventuellement jouer sur son turn-over. En effet, l'étude cristallographique de la protéine GSH1 chez *B. juncea* a mis en évidence une corrélation étroite entre le faible taux de glutathion et la proximité de la mutation dans le site actif de l'enzyme chez les mutants *cad2*, *rax1* et *rml1* (Hothorn *et al.*, 2006). Ainsi, la mutation des résidus d'acides aminés correspondant chez *cad2* (Val239Leu et délétion de Pro²³⁷ et Lys²³⁸), *rax1* (Arg228Lys) et *rml1* (Asp258Asn) interfère sur la fixation du substrat cystéine ou du coenzyme ATP.

Nous avons donc réalisé un alignement des séquences de GSH1 entre le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* à l'aide du serveur Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> ; Figure 34). L'identification des 12 résidus d'acides aminés appartenant au site actif de l'enzyme a été basée sur les travaux de Gromes *et al.* (2008) réalisés chez *B. juncea* (Glu¹¹⁵, Arg²²⁸, Tyr²²⁹, Met²³², Met²⁴⁷, Thr²⁵⁰, Asp²⁵⁸, Arg³⁰⁰, Trp³⁰⁴, Tyr³³⁸, Phe³⁸³ et Tyr³⁹¹). Ainsi, chez *rax1*, GSH1 présente bien une mutation de l'Arg²²⁸ du site actif de l'enzyme. Chez *cad2*, la mutation des acides aminés est encadrée par deux acides aminés du site actif, soit les Met²³² et Met²⁴⁷. Concernant *pad2*, la mutation concerne le résidu Ser²⁹⁸, remplacé par l'Asn, localisé à proximité de résidus appartenant au site actif tel que l'Arg³⁰⁰ et le Trp³⁰⁴.

Ces résultats suggèrent que la position de la mutation de la Ser²⁹⁸ de GSH1 chez *pad2* pourrait être à l'origine d'une altération de l'activité enzymatique de la protéine conduisant à une diminution de la biosynthèse du glutathion.

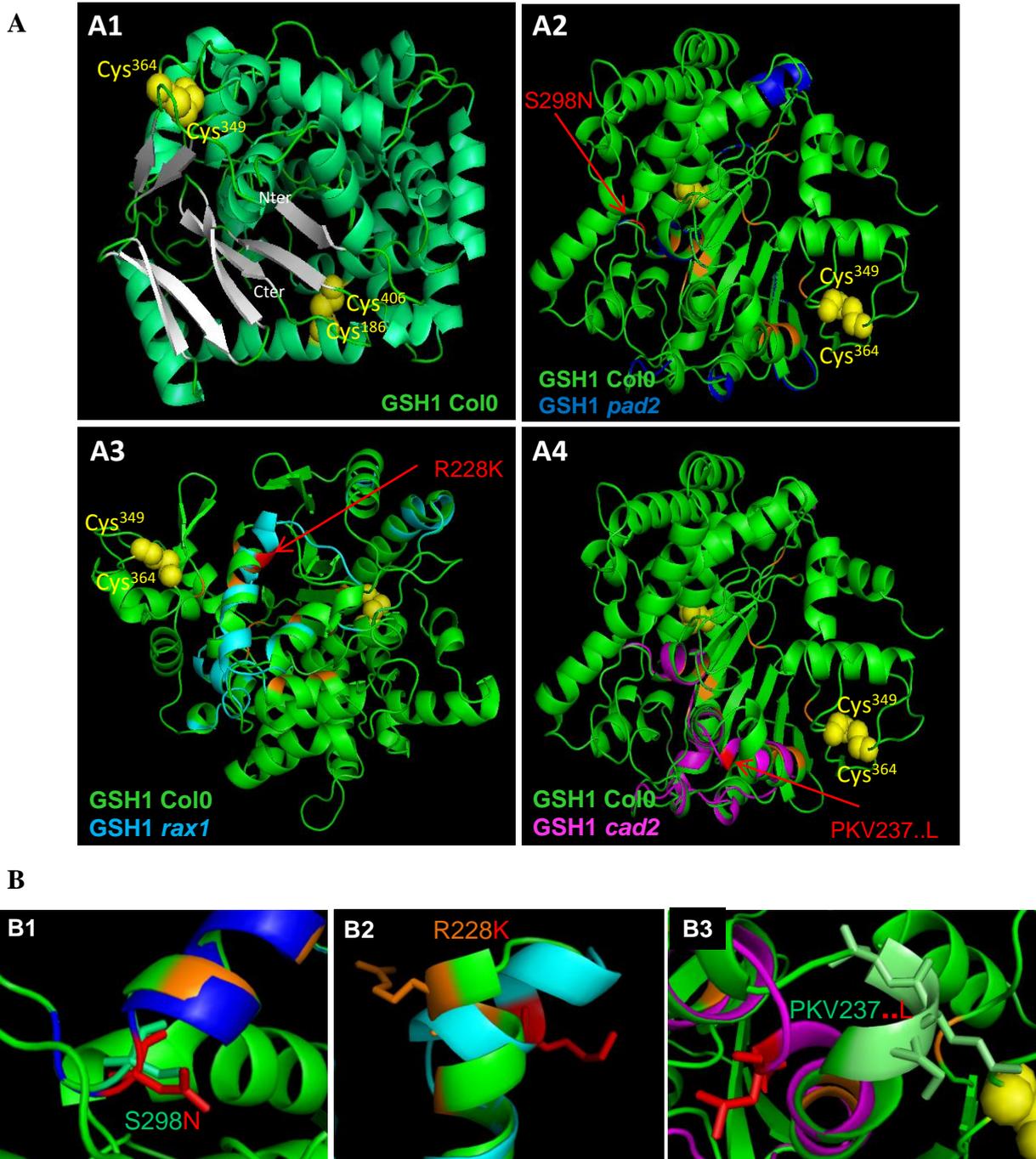


Figure 35. A Prédiction de la structure tridimensionnelle de GSH1 chez le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* d'*A. thaliana*.

A1. Structure de GSH1 chez le sauvage représentant les feuillets β (gris) et les hélices α (vert clair). Les résidus Nterminal et Cterminal sont notés respectivement par Nter et Cter.

A2, A3, A4. Superposition de GSH1 chez le sauvage (vert) et chez *pad2* (bleu foncé, A2), chez *rax1* (bleu clair, A3) ou chez *cad2* (rose, A4).

B Impact de la mutation de GSH1 sur sa structure tertiaire chez les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* d'*A. thaliana*.

Superposition de GSH1 chez le sauvage (vert) et chez *pad2* (bleu foncé, B1), chez *rax1* (bleu clair, B2) ou chez *cad2* (rose, B3) au niveau de la partie mutée de l'enzyme.

Les quatre résidus cystéines appartenant aux deux ponts disulfures impliqués dans la régulation enzymatique sont représentés en jaune (Cys¹⁸⁶-Cys⁴⁰⁶, Cys³⁴⁹-Cys³⁶⁴). La mutation des résidus d'acide aminé de GSH1 est représentée en rouge pour chaque mutant. Les parties colorées en orange représentent les résidus appartenant au site actif de l'enzyme déterminés chez *B. juncea* par Gromes *et al.* (2008).

3.1.2 Prédiction de la structure tertiaire de GSH1 chez le sauvage, *pad2*, *cad2* et *rax1*

Afin de définir si la mutation S298N de GSH1 chez le mutant *pad2* pouvait avoir un impact sur l'activité de l'enzyme en modifiant la structure du site catalytique, une prédiction de la structure tertiaire de la protéine a été réalisée chez le sauvage et les trois mutants à l'aide du serveur Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre>) et du logiciel PyMOL (Figure 35).

La prédiction de la structure secondaire de GSH1 chez le sauvage montre que la protéine est composée de 18 hélices α , 6 feuillets β antiparallèles et 2 feuillets β antiparallèles, en accord avec la structure obtenue par cristallographie chez *B. juncea* (Hothorn *et al.*, 2006 ; Figure 35A1). Chez *pad2*, la Ser²⁹⁸ mutée est localisée entre deux hélices α et ne semble pas modifier globalement la structure de GSH1 (Figure 35A2). Cependant, les acides aminés mutés Arg²²⁸ et ProLysVal²³⁷⁻²³⁸⁻²³⁹ respectivement chez *cad2* et *rax1* sont localisés aux extrémités de la 4^{ème} hélice α , modifiant localement la structure de l'hélice (Figure 35A3 et A4). De manière plus précise, nous observons que la Ser²⁹⁸ chez le sauvage et l'Asn²⁹⁸ chez *pad2* présentent le même positionnement dans l'espace et se superposent (Figure 35B1). Par contre, la Lys²²⁸ chez *rax1* et son Asn substituée présente une configuration spatiale complètement opposée (Figure 35B2). Il en est de même chez *cad2*, puisque la délétion et la substitution modifient fortement l'arrangement spatial de l'hélice α (Figure 35B3). En accord avec (Hothorn *et al.*, 2006), les mutants de GSH1 *cad2* et *rax1* montrent une modification de structure tertiaire très localisée qui serait à l'origine d'une altération de son activité enzymatique.

3.1.3 Prédiction de modifications post-traductionnelles de GSH1

L'analyse de la quantité de protéine GSH1 par western blotting chez le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* a mis en évidence que seul *pad2* présentait une faible accumulation de l'enzyme, de l'ordre de 48 % par rapport au sauvage. Parmi différentes hypothèses pouvant expliquer cette moindre accumulation de GSH1 chez *pad2*, il est envisageable que la mutation du résidu Ser²⁹⁸ (S → N) ait une incidence sur le turn-over de la protéine et favorise sa dégradation. Ce mécanisme pourrait être associé à des modifications de la régulation post-traductionnelle de la protéine. Pour valider, tout au moins en partie, cette hypothèse, des prédictions de modifications post-traductionnelles incluant l'ubiquitinylation, la glycosylation et la phosphorylation ont été réalisées à l'aide du serveur CBS (center for biological sequence analysis; <http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

A				B					
	Position du résidu	Contexte	Score		Position du résidu	Contexte	Score		
Sequence	5	MALLSQAGG	0.018	.	Sequence	12	GGSYTVVPS	0.214	.
Sequence	10	QAGGSYTVV	0.168	.	Sequence	24	SKAGTKAVV	0.492	.
Sequence	16	TVVPSGVCS	0.572	*S*	Sequence	54	RSLSTKSM	0.191	.
Sequence	20	SGVCSKAGT	0.223	.	Sequence	79	ASPTTEAV	0.094	.
Sequence	29	KAVVSGGVR	0.074	.	Sequence	86	AVVATEPLT	0.062	.
Sequence	46	EAFGSSYSR	0.043	.	Sequence	90	TEPLTREDL	0.241	.
Sequence	47	AFGSSYSRS	0.839	*S*	Sequence	104	SGCKTKDKY	0.484	.
Sequence	49	GSSYSRSL	0.203	.	Sequence	112	YRIGTEHEK	0.986	*T*
Sequence	51	SYSRSLSTK	0.046	.	Sequence	123	FEVNTLRPM	0.844	*T*
Sequence	53	SRSLSLKSM	0.996	*S*	Sequence	181	APLETLHQT	0.270	.
Sequence	56	LSTKSMLLH	0.149	.	Sequence	185	TLHQTCAEV	0.436	.
Sequence	61	MLLHVSVKRS	0.996	*S*	Sequence	241	PKVGTGLGD	0.283	.
Sequence	65	SVKRSKRGH	0.900	*S*	Sequence	250	MMLRCTVQ	0.014	.
Sequence	76	IVAASPPTE	0.510	*S*	Sequence	252	LRTCTVQVN	0.152	.
Sequence	100	AYLASGCKT	0.069	.	Sequence	280	QPIATALFA	0.020	.
Sequence	163	QKQSIISLE	0.749	*S*	Sequence	289	NSPFTGKPK	0.199	.
Sequence	165	KQISISLEPG	0.937	*S*	Sequence	305	SHIWTDDTK	0.066	.
Sequence	175	QFELSGAPL	0.245	.	Sequence	307	IWTDDTKDR	0.961	*T*
Sequence	191	AEVNSHLYQ	0.008	.	Sequence	312	DKDRTGMLP	0.069	.
Sequence	260	NLDFSSEAD	0.870	*S*	Sequence	350	YIDCTGMTF	0.029	.
Sequence	261	LDFSSEADM	0.328	.	Sequence	353	CTGMTFRQF	0.658	*T*
Sequence	286	LFANSFFTE	0.129	.	Sequence	380	ENHLTTIFP	0.021	.
Sequence	298	NGFLSMRSH	0.860	*S* => pad2	Sequence	381	NHLTTIFPE	0.605	*T*
Sequence	301	LSMRSHIWT	0.958	*S*	Sequence	429	ILDLTADWT	0.280	.
Sequence	322	VFDDSFGE	0.136	.	Sequence	433	TADWTPAER	0.715	*T*
Sequence	371	GELPSYNDW	0.937	*S*	Sequence	447	KVPVTGLKT	0.060	.
Sequence	421	YDDDSLQAI	0.038	.	Sequence	451	TGLKTPFRD	0.635	*T*
Sequence	512	EWGQSVDPV	0.018	.	Sequence	493	EVRTGVTP	0.050	.
					Sequence	496	RTGVTPAEK	0.901	*T*

C				
	Position du résidu	Contexte	Score	
Sequence	11	AGGSYTVVP	0.740	*Y*
Sequence	48	FGSSYSRSL	0.475	.
Sequence	97	DLIAYLAGS	0.095	.
Sequence	108	TKDKYRIGT	0.891	*Y*
Sequence	129	RPMKYDQIA	0.531	*Y*
Sequence	194	NSHLYQVKA	0.430	.
Sequence	229	PKGRYDIMR	0.885	*Y*
Sequence	235	IMRNYMPKV	0.018	.
Sequence	328	GFEQYVDYA	0.961	*Y*
Sequence	331	QYVDYALDV	0.027	.
Sequence	338	DVPMYFAYR	0.057	.
Sequence	341	MYFAYRKNK	0.027	.
Sequence	346	RKNKYIDCT	0.971	*Y*
Sequence	372	ELPSYNDWE	0.673	*Y*
Sequence	391	RLKRYLEMR	0.083	.
Sequence	417	VGLLYDDDS	0.133	.
Sequence	478	ERRGYKEAG	0.751	*Y*
Sequence	505	LLEMYNGEW	0.007	.
Sequence	522	EELLY----	0.875	*Y*

Figure 36. Prédiction de phosphorylation des résidus sérines (A), thréonines (B) et tyrosines (C) de la protéine GSH1 chez le sauvage d'*A. thaliana*.

Le score de prédiction de phosphorylation sur un site est compris entre 0 et 1. Le résidu est représenté dans la colonne de droite lorsque le score est supérieur au seuil établi à 0.5.

3.1.3.1 Prédictions d'ubiquitinylation, de N-glycosylation et de O-glycosylation de GSH1

Le processus d'ubiquitinylation d'une protéine suit une cascade enzymatique bien définie qui au final fixe de manière covalente un polypeptide, l'ubiquitine, sur la fonction amine ϵ d'une ou plusieurs Lys. La plupart des protéines ubiquitinylées sont conduites dans le protéasome 26S en vue de leur dégradation (Zeng *et al.*, 2006 ; Ciechanover, 2005 ; Dikic *et al.*, 2009). Les prédictions ne présentent aucun site probable d'ubiquitinylation de GSH1.

La N-glycosylation s'effectue sur les résidus de type asparagine sur la base de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr où X est un résidu d'acide aminé quelconque. Aucun site de N-glycosylation n'a été prédit par le serveur CBS au niveau de la protéine GSH1 chez le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1*.

Concernant la modification de type O-glycosylation, elle s'effectue sur les résidus Ser et Thr. Parmi les 29 Thr et 28 Ser identifiées dans GSH1, seule la Ser⁵¹² semble être la cible de l'addition (substitution) d'un groupement N-acétylglucosamine sur sa fonction alcool. Cependant, ce résidu Ser est très éloigné des sites de mutation chez tous les mutants, vérifié sur le modèle tridimensionnelle. Les mutations ne semblent donc pas avoir de répercussion sur cette modification post-traductionnelle. De plus, aucune prédiction n'a été observée dans le cas d'une addition d'un groupement N-acétylgalactosamine sur un résidu Ser. Il semble donc que les mutations n'aient pas un impact direct sur un site de glycosylation de GSH1.

3.1.3.2 Prédictions de phosphorylation de GSH1

Les sites de phosphorylation dans les protéines concernent les résidus de type Ser, Thr ou Tyr. La prédiction de phosphorylation a permis de mettre en évidence 12 Ser cibles parmi les 28 Ser présentes dans la protéine GSH1 (Figure 36A). De manière très intéressante, la Ser²⁹⁸ qui est remplacée par une Asn²⁹⁸ chez *pad2* est incluse dans des sites de phosphorylation prédits.

Concernant les résidus Thr et Tyr, 8 sur 29 Thr présentent une prédiction de phosphorylation et 9 sur 19 Tyr pourraient être la cible de phosphorylation (Figure 36B et C). Aucun de ces résidus prédits n'est muté au niveau de la protéine GSH1 dans les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1*. Seule la Tyr²²⁹ prédite est à proximité de l'Arg²²⁸ mutée chez *rax1*. Toutefois, GSH1 présente une accumulation similaire entre le sauvage et *rax1*, suggérant que la régulation potentielle de Tyr²²⁹ par phosphorylation n'est pas modifiée chez le mutant ou ne joue par un rôle majeur dans le turn-over de la protéine.

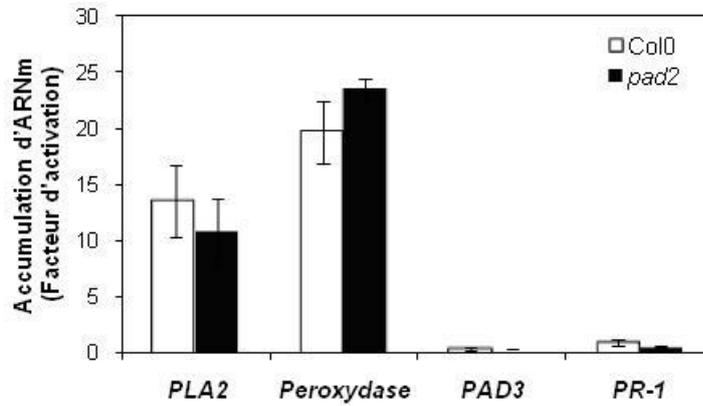


Figure 37. Expression de gènes de défense en réponse aux OG sur plantes Col-0 et *pad2* d'*A. thaliana*.

Des disques foliaires sont infiltrés sous vide avec une solution d'OG à 2,5 mg/ml puis les ARN totaux sont extraits après 1 h de traitement. L'accumulation des transcrits des gènes *PLA2* (*phospholipase A2*), *peroxydase*, *PAD3* (*phytoalexin-deficient 3*) et *PR-1* (*pathogenesis-related protein 1*) issus des mêmes ARN totaux extraits pour l'étude transcriptomique est analysée par RT-PCR quantitative. Après normalisation par le gène de référence *Elongation Factor 1 α* (*EF1 α*), les résultats sont exprimés selon le niveau d'expression par rapport au contrôle eau. La figure correspond à la valeur moyenne \pm ES de duplicats techniques de 3 expériences biologiques indépendantes (n = 6).

En conclusion, parmi les acides aminés mutés chez les trois mutants, seule la Ser²⁹⁸ mutée chez *pad2* est prédite comme site de phosphorylation.

3.2 Résultats complémentaires à l'analyse transcriptomique en réponse aux OG et à *P. brassicae* chez *pad2*

Afin d'analyser le transcriptome chez *pad2* en réponse aux OG et à une infection par *P. brassicae*, des feuilles ont été traitées par les OG ou inoculées par un disque d'agar contenant le mycélium. Avant de réaliser l'analyse transcriptomique, nous avons vérifié l'efficacité du traitement par les OG et l'infection du pathogène en étudiant par PCR quantitative l'expression de gènes préalablement décrits comme étant induits par ces deux stimuli.

3.2.1 Expression de gènes en réponse aux OG

Les gènes codant pour la phospholipase A2 (PLA2 ; At2g26560) et la peroxydase anionique (At1g14540) ont été décrits comme étant induits 1 h après traitement par les OG chez *A. thaliana* (Ferrari *et al.*, 2007). Les gènes *PAD3* (At3g26830) et *PR-1* (At2g14610) ont été choisis comme gènes non induits par les OG.

L'expression de ces quatre gènes a été étudiée 1 h après traitement par les OG chez le sauvage et le mutant *pad2* (Figure 37). Une moyenne de l'expression des gènes issue des trois réplicats biologiques a été réalisée. Les OG induisent une augmentation de l'accumulation des transcrits du gène *PLA2* chez le sauvage et *pad2* d'un facteur 13 et du gène *peroxydase* d'un facteur 20. Ce résultat est en accord avec celui de Ferrari *et al.* (2007) bien que l'ordre de grandeur du facteur d'activation soit différent, dû probablement aux conditions d'application du traitement et à la méthode d'étude de l'expression des gènes. Par contre, les gènes *PAD3* et *PR-1* ne sont pas induits par les OG chez le sauvage et le mutant.

Les résultats concernant l'expression de ces gènes a permis de valider l'efficacité du traitement par les OG.

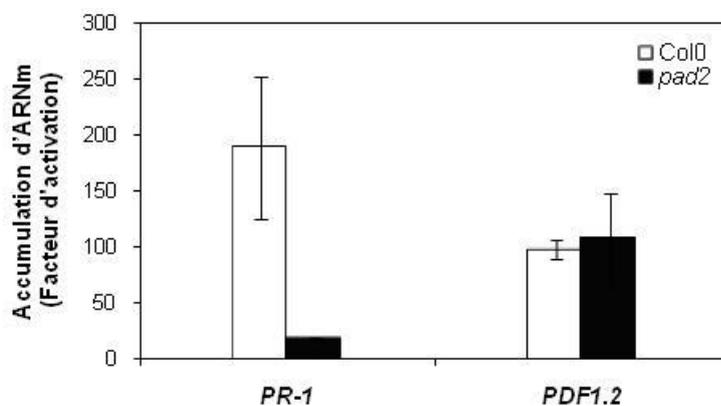


Figure 38. Expression de gènes de défense en réponse à *P. brassicae* sur plantes Col-0 et *pad2* d'*A. thaliana*.

Des plantes d'*A. thaliana* sont inoculées sur la face supérieure des feuilles par dépôt d'un disque d'agar contenant le mycélium de *P. brassicae* de 8 jours, à raison de 6 disques par plantes. 24 h après inoculation, des disques foliaires de la zone inoculée sont prélevés et les ARN totaux sont extraits. L'accumulation des transcrits des gènes *PR-1* et *PDF1.2* (*plant defensin protein 1.2*) issus des mêmes ARN totaux extraits pour l'étude transcriptomique est analysée par RT-PCR quantitative. Après normalisation par le gène de référence *EF1α*, les résultats sont exprimés selon le niveau d'expression par rapport au contrôle eau. La figure correspond à la valeur moyenne \pm ES de duplicats techniques de 3 expériences biologiques indépendantes (n = 6).

3.2.2 Expression de gènes en réponse à l'infection par *P. brassicae*

Lors d'une infection par *P. brassicae*, l'expression des gènes de défense *PR-1* et *PDF1.2* (At5g44420), respectivement marqueur des voies SA- et JA/éthylène-dépendantes, est induite 24 h après inoculation chez le sauvage, naturellement résistant. Par contre, l'expression du gène *PR-1* est fortement diminuée chez le mutant *pad2* (Roetschi *et al.*, 2001).

Dans notre expérience, l'expression du gène *PR-1* est fortement induite chez le sauvage 24 h après inoculation par *P. brassicae*, d'un facteur proche de 200, alors qu'elle est diminuée de 10 fois chez le mutant *pad2* (Figure 38). Par contre, bien que le gène *PDF1.2* soit induit 100 fois, aucune différence n'est observée entre le sauvage et le mutant *pad2*.

De la même manière que pour le traitement OG, l'infection par *P. brassicae* chez le mutant *pad2* et le sauvage est donc validée, permettant la réalisation de l'analyse transcriptomique des échantillons.

4 DISCUSSION

4.1 Etude de la protéine GSH1 pour comprendre le taux altéré de glutathion chez le mutant *pad2*

Le mutant *pad2* présente une substitution G en A sur l'exon 8 du gène At4g23100 qui code la première enzyme de la voie de biosynthèse du glutathion, GSH1. Cette mutation provoque au niveau de la protéine une substitution de la Ser²⁹⁸ en Asn (Parisy *et al.*, 2007). Le faible taux de glutathion observé chez ce mutant (22 % par rapport au sauvage) s'accompagne d'une suraccumulation des substrats de l'enzyme comme la cystéine (500 % par rapport au sauvage ; Parisy *et al.*, 2007). L'étude de l'expression du gène *GSH1* chez ce mutant montre qu'une dérégulation de la transcription n'est pas responsable de cette altération puisqu'il n'y a aucune corrélation entre le faible taux de glutathion et le taux de transcrits *GSH1* (Parisy *et al.*, 2007). Afin de déterminer quels événements post-transcriptionnels de GSH1 pourraient être responsables du faible taux de glutathion, nous avons analysé la protéine GSH1 à différents niveaux.

4.1.1 **La mutation de GSH1 chez *pad2* ne modifie pas la structure tertiaire de la protéine prédite *in silico***

Un alignement des séquences GSH1 entre le sauvage et les mutants *pad2*, *cad2* et *rax1* a permis, dans un premier temps, de combiner la localisation des résidus d'acides aminés mutés et des 12 résidus d'acides aminés appartenant au site catalytique de l'enzyme définis chez *B. juncea* par analyse cristallographique (Hothorn *et al.*, 2006 ; Gromes *et al.*, 2008). Chez *cad2*, les délétions/mutations de M²³⁶PKV en M²³⁶..L sont encadrées par 5 résidus d'acides aminés du site actif de l'enzyme (Arg²²⁸, Tyr²²⁹, Met²³², Thr²⁵⁰, Met²⁴⁷). Or, il a été montré que la délétion de la Pro²³⁷ et de la Lys²³⁸ modifiait la position des acides aminés Arg²²⁸ et Thr²⁵⁰, impliqués dans la fixation respective de la cystéine et du glutamate (Hothorn *et al.*, 2006 ; Gromes *et al.*, 2008). Chez *rax1*, l'Arg²²⁸ mutée (Arg228Leu) appartient au site actif puisqu'elle fixe la cystéine lors de la réaction enzymatique (Hothorn *et al.*, 2006). Afin d'analyser l'impact putatif des mutations sur la structure tertiaire de GSH1, nous avons tout d'abord vérifié que la modélisation tridimensionnelle obtenue à l'aide du serveur Phyre (logiciel PyMOL) était en corrélation avec la structure cristallographique présentée par

Hothorn *et al.* (2006), où GSH1 est composée de 18 hélices α , six feuillets β antiparallèles et deux feuillets β antiparallèles en épingle à cheveux. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que les résidus d'acides aminés mutés chez *cad2* étaient localisés à l'extrémité d'une hélice α et que leur mutation (surtout la délétion de la Pro et de la Lys) modifiait localement la structure secondaire de la protéine. Concernant *rax-1*, la mutation de l'Arg²²⁸ en Lys, présente à l'autre extrémité de la même hélice, provoque une altération dans la structure de cette hélice. L'affinité de l'enzyme pour le substrat cystéine diminuée de 5 fois chez *rax1* par rapport au sauvage s'expliquerait par l'appartenance de l'Arg²²⁸ au site actif de l'enzyme et sa localisation au niveau de la poche accueillant la cystéine, où son groupement guanidinium pourrait être important pour la reconnaissance du groupement thiol de la cystéine. Par contre, l'affinité de l'enzyme pour les substrats glutamate ou l'ATP n'est pas affectée (Hothorn *et al.*, 2006).

Chez *pad2*, l'alignement de séquence montre que la mutation S298N est également proche du site actif de l'enzyme, soit près de l'Arg³⁰⁰ et du Trp³⁰⁴, acides aminés impliqués dans le site de fixation du glutamate (Gromes *et al.*, 2008). La modélisation de GSH1 montre que la Ser est localisée entre deux hélices α et que sa substitution par l'Asn ne modifie pas localement la structure de GSH1. En effet, puisque la Ser et l'Asn sont tous deux des acides aminés polaires non chargés, la substitution d'un acide aminé par un autre de même nature a très peu d'impact sur les liaisons non covalentes entre acides aminés. Nous pouvons donc supposer que la structure tertiaire de la protéine n'est pas altérée chez *pad2* et que la mutation n'empêche pas la fixation des substrats sur l'enzyme. L'étude des paramètres de l'enzyme comme la constante d'affinité de l'enzyme pour chaque substrat, couplée à une analyse cristallographique, permettrait de vérifier que l'altération de la biosynthèse du glutathion chez *pad2* n'est probablement pas due à une modification de l'activité enzymatique de GSH1, observé chez *cad2* et *rax1*, mais vraisemblablement à d'autres paramètres.

4.1.2 Le mutant *pad2* présente une faible quantité de la protéine GSH1 ; étude préliminaire de l'origine de cette altération

L'étude de GSH1 détectée par western blotting montre que la quantité de protéine GSH1 chez le mutant *pad2* est réduite de moitié par rapport au sauvage ou aux autres mutants *cad2* et *rax1*. Deux processus peuvent être affectés et modifier la quantité d'une protéine : la traduction altérée ou la dégradation accrue de la protéine GSH1.

La dégradation de GSH1 est fortement suggérée puisqu'il a été rapporté lors de nombreux cas pathologiques chez l'homme que des mutations du gène codant la sous-unité catalytique de la glutamate-cystéine ligase (GCLC), correspondant à GSH1 chez les plantes, pouvaient être corrélées à une instabilité de la protéine (Ristoff *et al.*, 2000). Par exemple, une diminution de l'activité enzymatique mesurée chez un patient est la conséquence d'une faible quantité de protéine retrouvée dans les érythrocytes où la mutation du nucléotide A¹¹⁰⁹ en T conduit à une substitution de l'His³⁷⁰ par une Leu dans la protéine. Puisque l'expression du gène n'est pas altérée, cette faible quantité en protéine est probablement due à une instabilité de la protéine (Beutler *et al.*, 1999). Concernant GSH1 chez *pad2*, deux hypothèses pourraient expliquer sa dégradation :

- La première est basée sur le clivage de la protéine qui la conduirait dans le système de dégradation ubiquitine/protéasome. En effet, Franklin *et al.* (2009) proposent chez la souris que la GCLC, dont le clivage est associé à une apoptose dépendante des caspases, emprunterait le même processus de dégradation que la protéine Bid et une protéine kinase C dont le clivage dépendant des caspases est nécessaire et suffisant pour leur dégradation dans le système ubiquitine/protéasome. Le processus de clivage de GCLC agirait plutôt sur sa dégradation que sur son activité enzymatique puisqu'il a été montré *in vitro* qu'il ne modifiait pas les paramètres enzymatiques V_{max} et K_M, reflétant respectivement l'activité enzymatique et l'affinité de l'enzyme pour ses substrats (Franklin *et al.*, 2009). Toutefois, contrairement à la GCLC des animaux, aucun site de clivage protéolytique potentiel (séquence PEST), supposé dans la littérature comme peptide signal de la dégradation de protéine, n'a été prédit pour la protéine GSH1 d'*A. thaliana* (serveur epestfind ; résultat non montré). Enfin, rappelons que nous n'avons pas détecté de site potentiel d'ubiquitylation sur GSH1.

- La deuxième hypothèse prend en compte l'importance des modifications post-traductionnelles sur la stabilité des protéines (Huber & Hardin, 2004 ; Mann & Jensen, 2003). Nos résultats préliminaires sur l'étude des modifications post-traductionnelles de GSH1 révèlent une phosphorylation prédite sur la Ser²⁹⁸ mutée chez *pad2*. Nous pouvons supposer que la phosphorylation de cet acide aminé est nécessaire à la stabilité de la protéine et que son absence provoque un mauvais repliement de la protéine ou un signal de dégradation. Cependant, plusieurs travaux montrent plutôt un effet inverse de la phosphorylation sur la stabilité de la protéine puisque la phosphorylation d'un résidu acide aminé cible d'une protéine est plutôt considéré comme un signal de dégradation (Huber & Hardin, 2004). Par exemple, la phosphorylation de la pyruvate kinase sur les Ser²²⁰ et Ser⁴⁰⁷ dans les graines de soja et de la sucrose synthase sur la Ser¹⁷⁰ chez le maïs est clairement associée à leur

dégradation. Ceci pourrait aussi expliquer l'inhibition de l'activité enzymatique de la GCLC par des événements de phosphorylation dépendants de protéine kinases diverses observée chez le rat ou la drosophile (Franklin *et al.*, 2009 ; Toroser *et al.*, 2006). Bien que ces travaux s'opposent à notre hypothèse, l'étude plus détaillée de cette modification post-traductionnelle apportera éventuellement de nouveaux mécanismes quant à l'impact de la phosphorylation sur la stabilité des protéines et de GSH1 en particulier.

De plus, une autre modification post-traductionnelle semble intéressante à étudier : la myristoylation, où la N-myristoyltransférase catalyse la fixation d'un myristate (acide gras dont la chaîne contient 14 carbones) sur la Gly Nterminale de la protéine exposée après suppression de la Met initiale par une aminopeptidase (Stulemeijer & Joosten, 2008). En effet, la localisation des protéines myristoylées est membranaire. Notre hypothèse est que GSH1, qui pourrait être myristoylée et conduite à la membrane plasmique ou aux endomembranes, ne serait pas détectée par western blotting dans nos échantillons qui contiennent uniquement la fraction soluble des protéines. Ceci expliquerait la faible quantité de GSH1 détectée et peut être sa faible activité enzymatique puisqu'elle ne se trouverait plus dans l'environnement cellulaire optimal pour la synthèse du glutathion. Pour l'instant, nos prédictions ne montrent aucun site de myristoylation de GSH1 d'*Arabidopsis* (non montré) bien que la GCLC d'animaux présente cette modification post-traductionnelle qui lui confère une relocalisation au niveau des membranes internes lors de l'apoptose (Franklin *et al.*, 2009).

En conclusion, des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer l'impact des modifications post-traductionnelles sur la stabilité de la protéine GSH1.

4.2 L'état redox du glutathion est altéré chez le mutant *pad2*

Il est clairement établi que le glutathion est une des molécules fondamentales dans le processus de maintien de l'homéostasie de l'état redox de la cellule (Foyer & Noctor, 2005). Dans le but de se protéger d'un environnement oxydant pouvant conduire à des dommages cellulaires, la cellule maintient constamment un équilibre entre la forme réduite et la forme oxydée du glutathion, où 90 % du glutathion est présent sous forme réduite (Noctor, 2006 ; Meister & Anderson, 1983). Grâce à l'utilisation d'une GRX1-roGFP2 sensible à l'état redox du glutathion au niveau du cytosol, nous avons pu montrer que l'état redox du glutathion était réduit chez le sauvage, en corrélation avec les données de la littérature. Cependant, l'état redox basal du glutathion chez *pad2* s'est révélé beaucoup plus oxydé. Nous avons pu

confirmer ce résultat par des expériences biochimiques en analysant la protéine GSH1 dans des conditions non réductrices, où la forme oxydée de GSH1 est majoritairement détectée chez *pad2* alors que GSH1 est majoritairement présente sous forme réduite chez le sauvage. L'activité de GSH1 est régulée par l'environnement redox de la protéine grâce à la présence de deux ponts disulfures, dont l'oxydation conduit à une activation de l'enzyme (Hicks *et al.*, 2007 ; Jez *et al.*, 2004). Un traitement oxydant ou réducteur a été utilisé pour s'assurer du bon fonctionnement du système redox chez les deux génotypes par mesure de l'état redox de la GRX1-roGFP2. En réponse à un traitement par l' H_2O_2 , le pool de glutathion oxydé augmente et atteint la même proportion chez le sauvage et chez *pad2*, bien que le degré d'oxydation basal soit plus élevé chez *pad2*. Ceci s'explique par le fait que le niveau d'oxydation maximal de la cellule a été atteint avec 100 mM d' H_2O_2 (Marty *et al.*, 2009). Ceci est conforté par l'oxydation de GSH1 en réponse à l' H_2O_2 chez le sauvage alors que la proportion de forme oxydée de GSH1 chez *pad2* reste élevée. Puisque les cellules sauvages se trouvent dans un état redox déjà réduit à l'état basal, l'ajout d'un réducteur comme le DTT ne modifie pas la valeur du degré d'oxydation du glutathion. Par contre, chez *pad2*, le traitement par le DTT provoque une diminution du degré d'oxydation du glutathion jusqu'à atteindre le même niveau que celui observé chez le sauvage. Ces résultats sont confortés par les expériences de Meyer *et al.* (2007) menées sur des racines d'*A. thaliana*. La différence du potentiel redox du glutathion mesuré chez le sauvage et *pad2* ($E_{\text{GSH}}(\text{col0}) = -312 \text{ mV} \pm 10$ et $E_{\text{GSH}}(\text{pad2}) = -275 \text{ mV} \pm 5$) est justifiée par le fait que le potentiel redox du glutathion est dépendant de la concentration totale en glutathion mais aussi du degré d'oxydation du glutathion (Meyer *et al.*, 2007 ; Noctor, 2006). Puisque *pad2* présente un faible taux de glutathion et un degré d'oxydation plus élevé que chez le sauvage, son potentiel redox du glutathion est alors plus élevé.

Nos résultats montrant un degré d'oxydation du glutathion et un E_{GSH} plus élevés chez *pad2* sont confortés par les expériences réalisées chez le mutant *gr1* d'*A. thaliana* avec la GRX1-roGFP2 (état redox basal du glutathion oxydé et E_{GSH} élevé par rapport au sauvage ; Marty *et al.*, 2009). Les expériences réalisées chez ce mutant déficient en glutathion réductase 1 (GR1) suggèrent une hypothèse quant à l'origine du degré d'oxydation du glutathion élevé chez *pad2*. En effet, la GR1 catalyse la réduction de la forme oxydée du glutathion en forme réduite, en utilisant le NADPH. Deux GR sont dénombrées chez *A. thaliana*, avec GR1 localisée dans le cytosol et GR2 plutôt dans les mitochondries et les chloroplastes, en se basant sur les travaux réalisés chez le tabac et le pois (Stevens *et al.*, 1997 ; Creissen *et al.*, 1995). GR1 est principalement responsable de l'activité enzymatique GR

reportée chez *A. thaliana* puisque 65 % de l'activité totale GR lui est attribuée (Marty *et al.*, 2009). Ainsi, l'altération de la transcription ou de l'activité enzymatique d'une GR située dans le cytosol, en l'occurrence GR1, pourrait empêcher la régénération du glutathion réduit en forme oxydée du glutathion cytosolique qui pourrait expliquer le phénotype observé chez *pad2*. Dans ce sens, le mutant *gr1* présente un taux de glutathion oxydé 4 fois plus important que celui reporté chez le sauvage, bien que les concentrations en glutathion total chez les deux phénotypes soient similaires (Marty *et al.*, 2009). Il conviendrait donc de vérifier l'expression du gène *GRI* et l'activité enzymatique de GR1 chez *pad2* pour vérifier cette hypothèse quant à l'origine de la forte teneur en GSH oxydé. Nos données transcriptomiques, qui ne montrent pas de dérégulation significative de l'expression de *GRI* dans toutes les conditions testées (résultats non montrés), suggèrent plutôt une dérégulation au niveau de l'enzyme. De façon intéressante, il a été reporté que l'activité enzymatique de la GR humaine pouvait être inhibée par le S-nitrosoglutathion (GSNO ; Becker *et al.*, 1995). En effet, de structure proche du glutathion, le GSNO est capable d'agir en tant qu'inhibiteur compétitif du glutathion mais aussi en provoquant l'oxydation en acide sulfénique (R-SOH) d'une cystéine nécessaire au site actif de l'enzyme (Becker *et al.*, 1995 ; Becker *et al.*, 1998). Ceci suppose donc que le mutant *pad2* présenterait une quantité de GSNO supérieur à celle du sauvage, inhibant ainsi la GR1. Le GSNO est la molécule la plus abondante parmi les molécules S-nitrosothiols et participe en tant que donneur de NO au processus de S-nitrosylation observé notamment lors d'interaction plante-pathogène (Feechan *et al.*, 2005 ; Hess *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant de doser le GSNO chez *pad2* pour valider ou infirmer cette hypothèse. Néanmoins, les méthodes de dosages actuellement disponibles semblent peu fiables du fait de la forte instabilité du GSNO.

Le degré d'oxydation du glutathion chez *pad2* n'est certainement pas sans effet sur le système antioxydant de la cellule. Il est très bien défini que le glutathion joue un rôle important comme donneur d'électron dans le cycle ascorbate-glutathion (Noctor & Foyer, 1998). L'ascorbate est la molécule principale qui participe à la réduction de l' H_2O_2 , produit dans des conditions oxydantes, grâce à l'ascorbate peroxydase (APX) générant par la suite le monodéshydroascorbate (MDHA). Même si le MDHA peut être réduit directement en ascorbate, il est généralement transformé en déshydroascobate (DHA). Cette molécule est ensuite réduite pour régénérer l'ascorbate par la DHA réductase utilisant le glutathion réduit comme donneur d'électrons. Si la balance glutathion réduit/oxydé est modifiée, un dysfonctionnement du cycle ascorbate-glutathion pourrait conduire à une réponse biologique modifiée en réponse à un stress oxydant. L'état oxydé du glutathion chez *pad2* pourrait

empêcher d'autres réactions antioxydantes puisque la forme réduite du glutathion est normalement nécessaire à la réduction directe de molécules oxydées (H_2O_2 , lipide peroxydé, peroxydinitrite) par des glutathion peroxydases (Rahman *et al.*, 2005).

4.3 Impact de l'état redox du glutathion sur la transcription des gènes chez *pad2*

De nombreux travaux ont présenté un lien entre les variations de l'état redox cellulaire ou les composés antioxydants, comme le glutathion, et l'établissement de réponses de défense suite à des infections par différents pathogènes comme le TMV, *B. cinerea*, *P. syringae* chez plusieurs espèces végétales tels que le tabac, la tomate ou *A. thaliana* (Mullineaux & Rausch, 2005). Ainsi, chez la moutarde, le SA conduit à une augmentation de l'activité de l'enzyme antioxydante GR mais surtout à une accumulation du pool de glutathion oxydé (Dat *et al.*, 1998). Dans d'autres études il a été observé que l'état redox du glutathion influençait considérablement la régulation de l'expression des gènes. De nombreux travaux ont montré que l'ajout de glutathion chez différentes espèces régulaient l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant (*SOD*) ou plus généralement dans la défense (*PR-1*, *PAL*, *chalcone synthase* ; Gomez *et al.*, 2004 ; Hérouart *et al.*, 1993 ; Wingate *et al.*, 1988).

Nos analyses transcriptomiques réalisées sur le mutant *pad2* à l'état basal révèlent, de manière surprenante, une répression de l'expression de 63 gènes sur 64 significativement modulés par *pad2*. Parmi ces gènes, 13 % et 8 % sont respectivement classés dans les catégories de régulation de la transcription et de la machinerie protéique (incluant la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la dégradation des protéines). En comparant l'analyse transcriptomique réalisée par Ball *et al.* (2004) chez les autres mutants d'*A. thaliana* déficients en glutathion, *rax1* et *cad2*, nous notons que les gènes dont l'expression est affectée seulement chez *rax1* ou chez les deux mutants sont, pour la majorité, réprimés. L'implication du glutathion dans de nombreux processus cellulaires laisse supposer que le glutathion possède de nombreuses cibles moléculaires impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. L'exemple de la régulation de l'expression du gène *PR-1* est le plus détaillé. Mou *et al.* (2003) ont montré chez *A. thaliana* qu'un traitement de l'analogue fonctionnel du SA, l'INA, induit l'expression de *PR-1* via un changement de conformation du régulateur NPR1, concomitant à des variations du ratio glutathion réduit/oxydé et de la concentration en glutathion total. Le changement de l'état redox cellulaire provoque la réduction des ponts disulfures de la forme oxydée oligomérique de NPR1 cytosolique permettant sa translocation

au noyau sous forme monomérique réduite. L'interaction avec des facteurs de transcription TGA conduit alors à l'induction de l'expression du gène *PR-1* (Despres *et al.*, 2000).

Parmi les gènes réprimés, peu de gènes correspondent à ceux obtenus chez les mutants *rax1* et *cad2*. Les raisons peuvent être multiples. Tout d'abord, les conditions de croissance des plantes (lumière, photopériode, sol, température, humidité, ...) sont différentes puisque les expériences sur *rax1*, *cad2* (Ball *et al.*, 2004) et *pad2* n'ont pas été menées en simultanée. Bien que 13 gènes soient régulés de la même manière chez *rax1* et *cad2*, 7 gènes sont spécifiquement altérés chez le mutant *rax1* et 206 gènes le sont chez *cad2*. Ces données associées aux gènes spécifiquement obtenus chez *pad2* semblent montrer que ces trois mutants du même gène *GSH1* présentent un profil transcriptomique propre à chacun. Ceci pourrait être dû à la différence de leurs caractéristiques biochimiques à l'état basal elle-même corrélée à des réponses biologiques distinctes. Il semble toutefois nécessaire de réaliser une analyse transcriptomique commune sur ces trois mutants cultivés dans les mêmes conditions pour confirmer nos premières observations.

Plus en détail, Ball *et al.* (2004) ont montré qu'en plus du gène *APX2* qui est constitutivement induit chez *rax1*, les gènes codant des enzymes impliquées dans le système antioxydant comme *APX1*, *DHAR1*, *MDAR1* et *FSD1* (Fe-superoxyde dismutase1) sont fortement exprimés par rapport au sauvage. Nous n'avons pas retrouvé de gènes impliqués dans le système antioxydant dont l'expression est dérégulée chez *pad2*. Cependant, notre étude montre que le gène *CAX9* (*cation exchanger* ; At3g14070) est le gène dont l'expression est la plus réprimée. Dans la littérature, les transporteurs CAX sont qualifiés d'antiports cation/H⁺ présentant une haute capacité de transport mais une faible affinité envers les ions (Sze *et al.*, 2000). Cependant, une nouvelle sous-famille de transporteurs de cations chez *A. thaliana* regroupe désormais les transporteurs de type CCX (calcium cation exchanger) qui sont plutôt définis comme étant proches des échangeurs Na⁺/Ca²⁺ localisés à la membrane plasmique chez les mammifères (Morris *et al.*, 2008). Bien que peu de CCX de plantes aient été caractérisés jusqu'à maintenant, Morris *et al.* (2008) ont étudié AtCCX3, correspondant à CAX9, en expression hétérologue chez la levure. Ces études suggèrent qu'AtCCX3/CAX9 est un transporteur H⁺-dépendant de K⁺ localisé au niveau des endomembranes, plus particulièrement au niveau du tonoplaste, bien qu'une localisation au niveau de la membrane plasmique ne soit pas exclue. La complémentation de AtCCX3/CAX9 chez des mutants de levure déficients en transport d'ions rétablie notamment le transport de Na⁺, K⁺ et Mn²⁺. De manière intéressante, Ball *et al.* (2004) ont répertorié le gène *CAX1* comme étant réprimé chez *rax1*. La caractérisation fonctionnelle d'AtCAX1 chez la levure a permis de montrer la

localisation endomembranaire de ce transporteur et son implication dans le transport du Ca^{2+} à travers la membrane (Zhao *et al.*, 2009). Il a été montré en système hétérologue chez la levure que l'activation de ce transporteur localisé au niveau du tonoplaste nécessitait l'interaction entre CAX1 et la protéine CXIP1 (CAX interacting protein), un type de glutarédoxine (Cheng & Hirschi, 2003). Cependant, il est difficile à cet instant de conclure sur ces données transcriptomiques quant à l'implication des transporteurs CAX (CCX) dans le phénotype des mutants déficients en glutathion *pad2* et *rax1*. D'autres expériences sont nécessaires comme l'étude des mutants correspondant dans la résistance aux pathogènes.

Deux autres gènes ont retenu notre attention : *GLR2.1* et *CNGC18* où des études suggèrent que les protéines correspondantes seraient liées à un transport de Ca^{2+} à travers les membranes (Dodd *et al.*, 2010).

Le gène *GLR2.1* (At5g27100) code un homologue des récepteurs au glutamate ionotropiques (iGluR) des animaux (White *et al.*, 2002). Les iGluR sont perméables aux cations dont le Ca^{2+} . Si les GluR sont bien étudiés chez les animaux, leur caractérisation fonctionnelle chez les plantes doit encore être enrichie. Cependant, il a été montré que le traitement par le glutamate de plantes d'*A. thaliana* exprimant l'aequorine conduit à une augmentation transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, dont la signature calcique est similaire à celle induite par un choc froid (Dennison & Spalding, 2000). Des expériences utilisant un inhibiteur de canaux calciques de la membrane plasmique, le lanthane, suggèrent que ces variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ pourraient provenir d'un influx de Ca^{2+} véhiculé par des canaux localisés au niveau de la membrane plasmique. Il a clairement été démontré chez *A. thaliana* que la signature calcique observée après un traitement par le glutamate nécessitait un transport de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique impliquant GLR3.3 (Qi *et al.*, 2006). Il s'en suit une dépolarisation membranaire en réponse au glutamate, absente chez le mutant *glr3.3*. De manière très intéressante, le glutathion a été qualifié d'agoniste des réponses cellulaires déclenchées par le glutamate *via* GLR3.3. En effet, la forme réduite du GSH provoque une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transitoire et une dépolarisation membranaire au niveau des cellules racinaires, toutes deux dépendantes de GLR3.3. Bien que la forme oxydée induise également une dépolarisation membranaire abolie dans le mutant *glr3.3*, elle apparaît moins efficace sur les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

Concernant le gène *CNGC18* (At5g14870), il code un transporteur qui présente, comme chez les animaux, une perméabilité aux cations mono et bivalents incluant le Ca^{2+} et qui est plutôt localisé au niveau de la membrane plasmique (Talke *et al.*, 2003 ; White *et al.*, 2002). Pour l'instant, aucune étude n'a rapporté l'implication de CNGC18 dans les

interactions plantes-pathogènes mais une étude sur un autre membre de la famille des CNGC laisse entrevoir un rôle de ces transporteurs dans la résistance des plantes. En lien avec l'absence de RH observée chez *pad2* en réponse à *P. brassicae*, le mutant *cncg2* d'*A. thaliana*, aussi connu sous le nom de *dnd1* (*defense, no death1*), ne développe pas de RH en réponse à la bactérie avirulente *P. syringae* (Clough *et al.*, 2000). Ali *et al.* (2007) ont montré la perméabilité du transporteur CNGC2 aux ions Ca^{2+} et son implication dans la régulation de la production de NO. De plus, un modèle a été proposé où l'influx de Ca^{2+} en réponse à un pathogène avirulent et/ou le LPS conduit à la production de NO impliquée dans l'établissement de la RH. Ces données bibliographiques et l'étude des mutants correspondant aux gènes fortement réprimés chez *pad2* devraient nous permettre de comprendre par la suite le(s) événement(s) responsable(s) de l'absence de RH observée chez *pad2*.

Globalement, ces données montrent que l'état redox du glutathion joue un rôle très important dans l'expression des gènes puisque le mutant *pad2* ne présente quasiment que des gènes significativement réprimés.

4.4 L'altération d'événements précoces de signalisation expliquerait l'absence de RH chez *pad2* en réponse à *P. brassicae*

Nous avons pu mettre en évidence chez *pad2* une altération de certains événements précoces de signalisation en réponse aux OG sur suspensions cellulaires comme la dépolarisation membranaire ou la production d' H_2O_2 . Ceci pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses sachant que le Ca^{2+} fait partie des ions étroitement liés à la dépolarisation membranaire généralement placée en amont de la production d' H_2O_2 (Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Gauthier *et al.*, 2007 ; Qi *et al.*, 2006 ; Ward *et al.*, 2009).

Premièrement, les résultats transcriptomiques concernant les gènes *CAX9*, *CNGC18* et *GLR2.1* pourraient constituer une ébauche d'explication. L'état redox plus oxydé du glutathion conduit à la répression de ces gènes dont les protéines correspondantes pourraient être impliquées dans le transport du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique ou vacuolaire. Il en résulterait une réduction de variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse à un stress. Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier cet événement par faute de temps. Deuxièmement, les données recueillies sur *GLR3.3*, impliqué dans l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse au glutathion, nous laissent penser que le glutathion lui-même pourrait moduler l'activité de canaux ioniques localisés à la membrane plasmique. En conclusion, la dérégulation des canaux et transporteurs

chez *pad2* semble être à l'origine d'une profonde modification des événements appartenant à la cascade de signalisation dépendante du Ca^{2+} , comme la dépolarisation membranaire et la production d' H_2O_2 , observées chez *pad2*. Cependant, nous ne pouvons pas omettre que le flux de K^+ susceptible d'être véhiculé par CAX9 pourrait également jouer sur le potentiel membranaire.

En effet, nous avons également pu mettre en évidence une altération de la production d' H_2O_2 en réponse aux OG ou à *P. brassicae* chez *pad2*. Sur suspensions cellulaires, nous avons pu montrer que la faible quantité d' H_2O_2 observée ne résulte pas d'une activité de dégradation plus importante mais bien d'une production altérée puisque les activités catalase et peroxydase ne sont pas modifiées chez *pad2*. De plus, *pad2* présente une production de NO plus faible en réponse aux OG sur tissus foliaires. Cependant, nous n'avons pas pu mettre au point la méthode de détection de NO en réponse à *P. brassicae* puisque les expériences fournissaient des résultats très variables. Certaines études montrent une contribution de la production de l' H_2O_2 et du NO dans le mécanisme de mise en place de la RH (Lamb & Dixon, 1997 ; Levine *et al.*, 1994 ; Zaninotto *et al.*, 2006). Nous avons pu observer une absence de RH chez *pad2* en réponse à *P. brassicae* associée à un développement accru du pathogène. En s'appuyant sur la littérature, les événements de signalisation cellulaire reportés ci-dessus comme les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ médiées notamment par un influx de Ca^{2+} dépendant de transporteurs tels que CAX, CNGC, GLR, la dépolarisation membranaire, la production d' H_2O_2 et de NO, sont impliqués dans la plupart des cas dans l'établissement de la RH (Ma & Berkowitz, 2007).

Ainsi, notre hypothèse est que la mutation *pad2* conduit *in fine* à une altération de la signalisation cellulaire induite par la reconnaissance du pathogène provoquant alors une absence ou une diminution des réponses de défense telles que celles observées en réponse à *P. brassicae*. Ceci est supporté par les résultats de l'analyse transcriptomique qui montrent que le nombre de gènes surexprimés de la catégorie fonctionnelle « signalisation cellulaire » est fortement diminué chez *pad2* en réponse aux OG et à *P. brassicae*. De plus, le turn-over des protéines semble également dérégulé chez *pad2* puisque le nombre de gènes regroupés dans la catégorie fonctionnelle « machinerie protéique » (incluant la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la dégradation des protéines) varie fortement entre *pad2* et le sauvage. Parmi les gènes dont l'expression est affectée en réponse aux OG et à *P. brassicae*, certains sont impliqués dans le processus protéolytique dépendant du protéasome. Ainsi, les protéines impliquées dans la signalisation pourraient être la cible d'une dégradation importante chez *pad2*, empêchant une signalisation cellulaire appropriée à

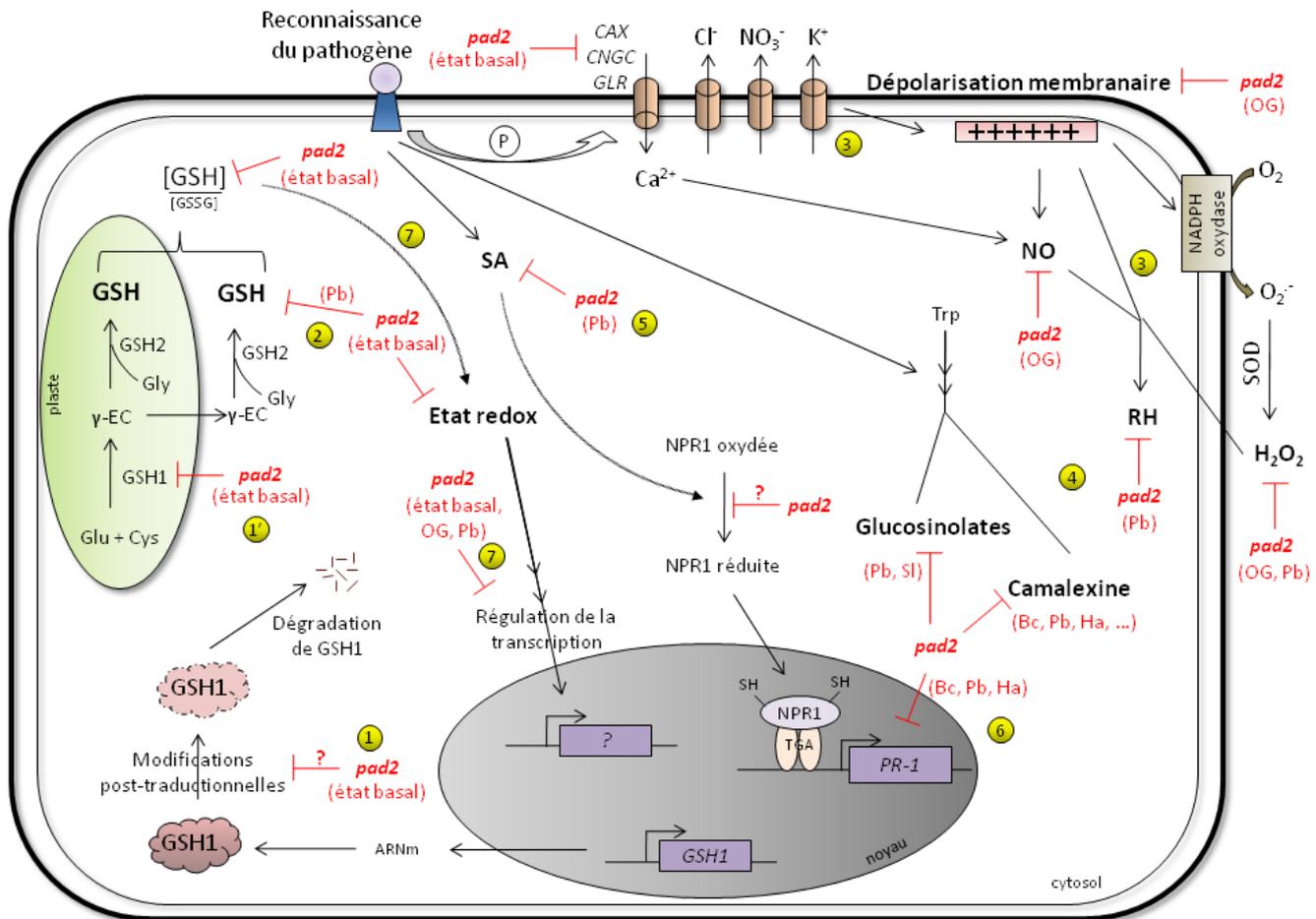


Figure 39. Schéma récapitulatif et hypothétique sur les événements cellulaires altérés chez le mutant *pad2* d'*A. thaliana*.

Les interconnexions entre les événements n'ont pas toutes été matérialisées sur ce schéma par souci de clarté. Un symbole d'inhibition rouge accompagné de «*pad2*» représente les événements altérés chez le mutant et les conditions expérimentales sont indiquées entre parenthèses (éliciteur, pathogène, à l'état basal). (1) Un changement des modifications post-traductionnelles de la protéine GSH1 due à la mutation Ser298Asn constituerait un signal de dégradation ou conférerait une instabilité à la protéine. (1') Sa dégradation est proposée par une faible quantité protéique observée chez *pad2*. (2) La faible quantité de GSH1 conduit à une altération de la biosynthèse du glutathion à l'état basal et lors d'infection. (3) La reconnaissance du pathogène (ou éliciteur) induit une cascade d'événements précoces de signalisation tels que des flux d'ions, une dépolarisation membranaire, des événements de phosphorylation (P), la production d'H₂O₂, la production de NO, altérés chez *pad2*. (4) Puis, les réponses de défense se développent comme la production de glucosinolates ou de camalexine ainsi que l'établissement de la RH au point d'infection du pathogène, faibles ou absentes chez *pad2*. (5) En parallèle, l'accumulation du SA, absente chez *pad2*, est accompagnée d'un changement de l'état redox cellulaire qui entraîne la translocation de NPR1 par sa réduction dans le noyau. (6) Il en résulte une activation de l'expression du gène *PR-1*, faible chez *pad2*. (7) Le degré d'oxydation du glutathion joue un rôle important dans la régulation de l'état redox de la cellule qui contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes de défense. CAX : cation exchanger, CNCG : cyclic nucleotide-gated channel, GLR : récepteur au glutamate, OG : oligogalacturonates, SA : acide salicylique, SOD : superoxyde dismutase, Bc : *B. cinerea*, Ha : *H. arabidopsidis*, Pb : *P. brassicae*, Sl : *S. littoralis*.

l'établissement des réactions de défense en réponse à un pathogène. Cette hypothèse est basée sur la connaissance des mécanismes mis en place en réponse à un processus inflammatoire chez les animaux. En effet, l'expression du gène codant la cytokine inflammatoire TNF α (tumor necrosis factor) est induite *via* l'activation de son facteur de transcription NF- κ B par un changement de l'état redox cellulaire plus oxydé (Droge, 2006). Suite à son activation, TNF α stimule le processus de protéolyse dépendant de l'ubiquitine/protéasome dans les cellules musculaires (Droge, 2006). En conditions oxydantes, certaines protéines subissent une oxydation apparaissant généralement au niveau des résidus cystéines. En fonction du degré d'oxydation, les protéines sont réparées ou conduites dans le processus protéolytique (Friguet, 2006 ; Squier, 2006). L'état redox du glutathion mais aussi la concentration en glutathion semblent être des facteurs non négligeables du processus protéolytique détecté dans certaines maladies comme la maladie de Parkinson (Martin & Teismann, 2009). En effet, la déplétion du glutathion diminue l'activité de l'ubiquitine ligase E1 qui fixe un monomère d'ubiquitine sur la protéine à dégrader. Il en résulte une accumulation de protéines oxydées qui présentent un mauvais repliement à l'origine des plaques amyloïdes neurodégénératives observées dans cette maladie.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le glutathion joue un rôle important dans la dégradation correcte de protéines, dont certaines pourraient être impliquées dans la signalisation cellulaire induite par des stress biotiques ou abiotiques.

4.5 La mutation du gène *GSH1* confère à *pad2* une sensibilité aux pathogènes *via* l'altération de la signalisation cellulaire

Les données obtenues au cours de ce travail de thèse associées aux travaux antérieurs réalisés sur le mutant *pad2* nous conduisent à proposer un schéma récapitulatif et hypothétique qui expose les événements cellulaires modifiés résultant d'une mutation située sur le gène *GSH1* d'*A. thaliana* (Figure 39).

La transition de la base G en A située sur l'exon 8 du gène *GSH1* conduit à une substitution de la Ser²⁹⁸ en Asn au niveau protéique (Parizy *et al.*, 2007). Cette mutation provoquerait un changement de modification post-traductionnelle de la protéine, qui conférerait une instabilité de cette dernière ou constituerait un signal de dégradation, conduisant la protéine dans le système de dégradation ubiquitine/protéasome. La faible quantité en protéine GSH1 qui en résulte serait la cause d'une réduction du processus de

biosynthèse du glutathion puisque la transcription du gène *GSH1* n'est pas altérée chez *pad2* (Parisy *et al.*, 2007). Seulement 22 % de la quantité en glutathion est synthétisé, associé à une accumulation en cystéine 5 fois supérieure (Parisy *et al.*, 2007). Le degré d'oxydation du glutathion élevé et la faible quantité de glutathion total conduisent à un potentiel redox du glutathion plus élevé. L'état redox oxydé agit sur la régulation de l'expression des gènes essentiellement en les réprimant. Certains de ces gènes (par exemple *CAX9*, *CNCG18*, *GLR2.1*) coderaient des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire activée par la reconnaissance d'un pathogène. De plus, l'altération de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la dégradation modifierait le turn-over des protéines de signalisation. Ainsi, les événements précoces de signalisation seraient modifiés comme les flux d'ions conduisant à une dépolarisation membranaire plus faible en réponse à un éliciteur (OG). Des modifications d'autres événements précoces de signalisation comme les variations de la $[Ca^{2+}]$, la phosphorylation de MAPK seraient observées. Concernant la production d' H_2O_2 et de NO, elle est diminuée en réponse aux OG et/ou à *P. brassicae*. Ceci empêcherait l'établissement de la RH en réponse à *P. brassicae* (Parisy *et al.*, 2007). De plus, la voie du SA est altérée puisque aucune accumulation de SA n'est observée en réponse à *P. brassicae*, empêchant l'expression du gène *PR-1* en réponse à *B. cinerea*, *H. arabidopsidis* et *P. brassicae* (Ferrari *et al.*, 2003 ; Roetschi *et al.*, 2001). Enfin, la voie de synthèse à partir du tryptophane conduisant à la camalexine ou aux glucosinolates est aussi altérée en réponse à différents pathogènes (van Wees *et al.*, 2003 ; Glazebrook *et al.*, 1997 ; Roetschi *et al.*, 2001 ; Ferrari *et al.*, 2003 ; Parisy *et al.*, 2007 ; Glazebrook & Ausubel, 1994 ; Schlaeppli *et al.*, 2008 ; Schlaeppli *et al.*, 2010). La diminution ou l'absence de plusieurs réponses de défense (H_2O_2 , camalexine, glucosinolates, protéines PR SA-dépendantes et RH) conduit à une sensibilité accrue du mutant *pad2* à un grand nombre de pathogènes (Tableau II §2.3.5).

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a permis de caractériser certains des processus biochimiques et moléculaires affectés chez le mutant *pad2* et pouvant être associés à son hypersensibilité. La poursuite de ce travail permettra de mieux comprendre l'origine de la déficience en glutathion, les mécanismes impliqués dans la sensibilité de *pad2* à différents pathogènes, et l'interconnexion entre ces événements cellulaires.

Afin de déterminer la cause du faible taux de glutathion observé chez *pad2*, des prédictions structurales de la protéine GSH1, enzyme catalysant la première étape de la biosynthèse du glutathion, ont suggéré dans un premier temps que la mutation S298N dans la protéine n'altérerait pas sa structure tertiaire et éventuellement son activité enzymatique. Une approche biochimique permettra de déterminer les paramètres de l'enzyme mutée (activité enzymatique et son affinité pour les substrats). Dans l'hypothèse où GSH1 chez *pad2* présente une activité enzymatique modifiée, des analyses cristallographiques seront entreprises afin de mieux cerner l'impact de la mutation sur l'activité catalytique. Ensemble, ces données devraient permettre de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité enzymatique de GSH1 est normale chez *pad2* contrairement aux mutations *cad2* et *rax1* qui perturbent l'affinité de l'enzyme pour au moins un substrat (Hothorn *et al.*, 2006).

La prédiction des sites de modifications post-traductionnelles de GSH1 devra être confirmée expérimentalement, par exemple, *via* une analyse par spectrométrie de masse (phosphorylation et glycosylation), ou par microscopie (myristoylation). Une fois les modifications post-traductionnelles caractérisées, une mutagénèse dirigée sur chaque acide aminé cible donnera des informations sur l'importance de celles-ci au niveau de l'activité enzymatique de GSH1 mais aussi au niveau de la stabilité de la protéine puisque nous avons montré une faible quantité protéique de GSH1 chez *pad2*. La transformation de cellules exprimant la GSH1, mutée ou non, fusionnée avec la GFP montrera l'impact de la mutation sur la localisation subcellulaire de la protéine liée à d'éventuelles modifications post-traductionnelles comme la myristoylation.

Les résultats obtenus menant à la conclusion d'un état redox du glutathion plus oxydé chez *pad2* nous encouragent à déterminer les éléments impliqués dans l'effondrement du maintien de l'état réduit du glutathion dans le cytosol. Tout d'abord, l'analyse chez *pad2* de l'état redox du glutathion par roGFP2 dans d'autres compartiments cellulaires tels que les

chloroplastes, les mitochondries ou le noyau et de sa concentration dans le noyau par immunocytochimie apportera des informations sur la dynamique cellulaire du glutathion observée lors de la sensibilité du mutant *pad2*. En effet, la modification de la concentration du glutathion ou de l'état redox dans le noyau pourrait moduler l'activité de certains facteurs de transcription empêchant l'expression de gènes de défense. De plus, puisque le glutathion est impliqué dans le cycle ascorbate-glutathion, le dosage des composants du cycle donnera des informations sur le fonctionnement de celui-ci. En parallèle, la suggestion d'une GR défaillante, comme cause éventuelle d'un déséquilibre glutathion réduit/oxydé, sera vérifiée par analyse de son activité enzymatique puisque l'analyse transcriptomique montre que l'expression des gènes *GRI* et *GR2* n'est pas significativement différente entre *pad2* et Col-0. Une dégradation de la protéine GR1 pourrait être une autre hypothèse, qui sera vérifiée en analysant sa quantité chez *pad2*.

Afin de confirmer ou d'infirmer l'implication du GSNO dans l'inhibition éventuelle de la GR, la S-nitrosylation potentielle de cette dernière pourrait être appréhendée grâce à l'utilisation de la technique biotin-switch. Dans l'affirmatif, l'étude des effets du NO sur la protéine recombinante apportera des informations sur l'incidence de la S-nitrosylation sur l'activité de l'enzyme. En parallèle, une estimation de la concentration et de la localisation cellulaire du GSNO chez *pad2* pourrait être réalisée *via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre le GSNO.

Concernant l'expression des gènes altérée chez *pad2* à l'état basal (notamment *CAX9*, *CNCG18* et *GLR2.1*) et en réponse au stress, une analyse de la sensibilité à *P. brassicae* des mutants correspondant sera réalisée. Si un mutant sensible est identifié, il sera étudié plus en détail afin de positionner la protéine correspondante dans la cascade de signalisation cellulaire induite en réponse à *P. brassicae*. Puisque la mutation de *pad2* semble déréguler l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans le turn-over des protéines, nous pourrons comparer le protéome obtenu chez *pad2* à celui du sauvage, expliquant éventuellement l'altération de la cascade de signalisation cellulaire et par conséquent les réponses de défense.

Puisque la dépolarisation membranaire, la production d' H_2O_2 et la production de NO sont altérées en réponse aux stress chez le mutant *pad2*, d'autres événements précoces de signalisation seront également analysés. En l'occurrence, l'influx de Ca^{2+} pourra être étudié en utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ comme traceur radioactif. Les variations de la concentration en calcium libre dans la cellule pourront aussi être suivies en obtenant des cellules *pad2* transformées par le gène codant l'apocaequorine. Par ailleurs, la phosphorylation de MAPK chez *pad2* et le sauvage pourra être étudiée par western blotting. Pour tous ces événements, l'impact du taux

de glutathion pourra être confirmé par approche pharmacologique en utilisant un inhibiteur de GSH1, le BSO. Enfin, puisque la voie du SA semble jouer un rôle important dans la sensibilité de *pad2* à certains pathogènes, nous étudierons à quel niveau cette voie est altérée. En effet, les faibles teneurs en SA et la quasi absence de l'expression du gène marqueur *PR-1* suggèrent une dérégulation forte de la voie de signalisation ou de biosynthèse du SA. Cette étude pourra être réalisée en suivant l'expression de gènes et la quantité de protéines correspondantes des différents acteurs de cette voie (ICS1, EDS1, PAD4, NPR1, PR-1...). De la même façon, les événements responsables de la diminution de la production de camalexine, de glucosinolates et de l'absence de RH seront étudiés tout d'abord au niveau des gènes puis des protéines impliquées dans ces processus (ASA1, CYP79B2, CYP79B3, CYP71A13, PAD3, MYB51, CYP81F2, PEN2...).

Enfin, la différence de réponses biologiques entre chacun des 4 mutants du gène *GSH1* est très intrigante. Il serait donc très intéressant de réaliser chaque étude sur les 4 mutants *gsh1* en comparant leurs phénotypes dans des conditions de stress biotiques et abiotiques similaires afin d'en étudier les mécanismes moléculaires détaillés ci-dessus.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis, d'une part, de contribuer à la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance induite par le BABA chez la vigne, et d'autre part, de déterminer des événements moléculaires impliqués dans la sensibilité du mutant *pad2* aux pathogènes. En se plaçant à l'interface de ces deux sujets, de nouvelles voies d'exploration apparaîtront probablement, permettant ainsi d'apporter des éléments utiles à la compréhension de chacun des deux sujets.

En effet, il a été montré récemment chez *A. thaliana* que la résistance induite par la blessure à *B. cinerea* nécessitait un taux de glutathion semblable au sauvage puisque le mutant *pad2* perd complètement la résistance induite (Chassot *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant d'étudier la résistance induite à différents pathogènes par le BABA chez le mutant *pad2* afin d'apporter des données sur l'importance du taux de glutathion dans cette résistance induite. De plus, la quantification du glutathion avant et après stress dans des plantes traitées par le BABA apporterait peut être une piste supplémentaire quant à la compréhension du phénomène de potentialisation. En retour, les éléments moléculaires caractérisés dans la résistance induite par le BABA pourront être étudiés dans la sensibilité du mutant *pad2* aux pathogènes, apportant de nouvelles données qui permettront d'établir un lien entre la mutation du gène *GSH1* et la sensibilité aux pathogènes.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE I. Composition du milieu de culture Nitsch-Nitsch, Gamborg B5 et Murashige and Skoog

	Concentration (mg/L)		
	Nitsch-Nitsch	Gamborg B5	Murashige and Skoog
Macroéléments			
CaCl ₂		113.29	332.02
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	166		
KH ₂ PO ₄	68		170
KNO ₃	950	2500	1900
MgSO ₄		121.56	180.54
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	185		
NaH ₂ PO ₄		130.44	
NH ₄ NO ₃	720		1650
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	
Microéléments			
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.025	0.025	0.025
H ₃ BO ₃	10	3	6.2
KI	0.83	0.75	0.83
MnSO ₄ , 1 H ₂ O		10	16.9
MnSO ₄ , 2 H ₂ O	19.5		
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.25	0.25	0.25
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	10	2	8.6
Fe-EDTA			
FeNa-EDTA		36.7	36.7
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	27.85		
Na ₂ -EDTA	37.25		
Vitamines			
Acide folique	0.5		
Acide nicotinique	5	1	
Biotine	0.05		
Glycine	2		
Myo-inositol	100	100	
Panthénoate de calcium	3		
Pyridoxine HCl	0.5	1	
Thiamine HCl	0.5	10	

Autoclavage 40 min à 115°C

ANNEXE II. Supplemental Table I (Publication 2)

Table I. Genes significantly regulated at basal level in <i>pad2</i> as compared to Col0			
Locus identifier ^a	Description ^b	Functional category ^c	<i>pad2</i> /Col0 ^d
At3g14070	CAX9 (CATION EXCHANGER 9); cation:cation antiporter	transport.calcium	-142.9
At5g43500	ATARP9 (ACTIN-RELATED PROTEIN 9)	RNA	-47.8
At3g59530	strictosidine synthase family protein	secondary metabolism	-27.0
At3g27070	TOM20-1 (TRANSLOCASE OUTER MEMBRANE 20-1)	protein	-18.0
At1g29630	nuclease, similar to exonuclease	DNA	-16.6
At5g01470	unknown protein; similar to Os03g0826700 [Oryza sativa]	not assigned	-12.2
At2g21770	CESA9 (CELLULOSE SYNTHASE 9); transferase	cell wall	-9.3
At1g51690	ATB α (protein phosphatase 2A regulatory subunit B α isoform)	protein	-8.6
At1g51960	IQD27 (IQ-domain 27); calmodulin binding protein	signalling	-8.5
At1g21240	WAK3 (WALL ASSOCIATED KINASE 3)	signalling	-8.1
At2g06390	unknown protein	protein	-7.3
At1g80730	ZFP1 (ZINC-FINGER PROTEIN 1); transcription factor	RNA	-7.0
At1g50580	glycosyltransferase family protein	hormone.auxin	-6.7
At1g65450	transferase family protein	not assigned	-6.3
At2g14110	unknown protein; similar to HAD-superfamily phosphatase subfamily IIIC	not assigned	-6.2
At1g07730	disease resistance-responsive family protein	stress.biotic.PR-proteins	-6.0
At5g46720	unknown protein; similar to Os03g0854000 [Oryza sativa]	not assigned	-5.3
At4g08040	ACS11 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 11)	hormone.ethylene	-5.2
At2g38530	LTP2 (LIPID TRANSFER PROTEIN 2)	lipid metabolism	-2.0
At1g13680	phospholipase C	lipid metabolism	-2.0
At1g67980	CCoAMT (caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase)	secondary metabolism	-2.0
At1g49830	ethylene-responsive protein	hormone.ethylene	-2.0
At4g09360	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	stress.biotic.PR-proteins	-2.0
At3g61040	CYP76C7 (cytochrome P450)	misc	-2.0
At1g60530	dynamamin family protein	misc	-2.0
At5g62080	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc	-2.0
At1g32490	EMB2733/ESP3 (EMBRYO DEFECTIVE 2733); RNA helicase	RNA	-2.0
At2g12900	DNA binding / transcription factor	RNA	-2.0
At2g19820	LOB (lateral organ boundaries) domain family protein	RNA	-2.0
At1g67710	ARR11 (RESPONSE REGULATOR 11); transcription factor	RNA	-2.0
At2g42940	DNA-binding family protein	RNA	-2.0
At3g54810	BME3/BME3-ZF (BLUE MICROPLYLAR END3); transcription factor	RNA	-2.0
At1g67500	ATREV3 (Arabidopsis thaliana recovery protein 3); DNA binding protein	DNA	-2.0
At3g15950	TSA1 (TSK-associating protein 1)-like protein	DNA	-2.0
At1g18950	aminoacyl-tRNA synthetase family	protein	-2.0
At4g24550	clathrin adaptor complexes medium subunit family protein	protein	-2.0
At5g27100	ATGLR2.1 (glutamate receptor 2.1)	signalling	-2.0
At5g18270	ANAC087; transcription factor	development	-2.0
At5g62310	IRE (INCOMPLETE ROOT HAIR ELONGATION); kinase	development	-2.0
At5g14870	ATCNGC18 (cyclic nucleotide-gated ion channel 18)	transport	-2.0
At1g03230	EDGP (extracellular dermal glycoprotein) putative protein	not assigned	-2.0
At1g58320	unknown protein; similar to Os02g0579800 [Oryza sativa]	not assigned	-2.0
At1g15240	phox (PX) domain-containing protein	not assigned	-2.0
At1g32840	Ulp1 protease family protein	not assigned	-2.0
At2g04430	ATNUDT5 (Nudix hydrolase homolog 5)	not assigned	-2.0
At3g44190	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein	not assigned	-2.0
At5g23430	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	not assigned	-2.0
At1g77765	unknown protein	not assigned	-2.0
At1g11230	unknown protein; similar to cotton fiber expressed protein 1 [Gossypium hirsutum]	not assigned	-2.0
At2g24440	selenium binding protein	not assigned	-2.0
At3g07150	unknown protein	not assigned	-2.0
At3g19895	unknown protein; similar to Os02g0829600 [Oryza sativa]	not assigned	-2.0
At3g10320	unknown protein; similar to glycosyltransferase [Medicago truncatula]	not assigned	-2.0
At3g12420	pseudogene of 3'-5' exonuclease containing protein	not assigned	-2.0
At4g04360	unknown protein	not assigned	-2.0
At4g09630	similar to EMB2756 (EMBRYO DEFECTIVE 2756), hydrolase	not assigned	-2.0
At5g26910	unknown protein; similar to srpA [Streptococcus cristatus]	not assigned	-2.0
At5g56250	unknown protein; similar to Os04g0471400 [Oryza sativa]	not assigned	-2.0
At5g16160	unknown protein	not assigned	-2.0
At5g28480	unknown protein; similar to Ulp1 protease family protein	not assigned	-2.0
At5g22680	unknown protein; similar to F-box family protein	not assigned	-2.0
At5g35510	unknown protein	not assigned	-2.0
At5g10750	unknown protein; similar to Os10g0455900 [Oryza sativa]	not assigned	-2.0
At1g23840	unknown protein	not assigned	3.0

a,b Annotations of genes based on The Arabidopsis Information Resource. c Functional categories described from Mapman software (<http://mapman.gabipd.org>). d Fold-change of gene expression in *pad2*, only genes significantly regulated ($P \leq 0.01$; ≥ 2.0 -fold induction or repression in *pad2* as compared to Col0) are indicated in the table. -2.0 ≥ 2.0 -fold repression but non determined.

ANNEXE III. Supplemental Table II (Publication 2)

Genes significantly regulated in Col0 and pac2 plants treated by OG from Venn diagram

genes significantly up- or down-regulated (≥ 2.0 -fold induction or repression in treated plants as compared to control, respectively), with P value ≤ 0.01 +/- 2.0 ; ≥ 2.0 -fold induction or repression, but non determined.

Genes significantly regulated by OG in Col0			Genes significantly regulated by OG in pac2		
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description
cell wall modification	A13g44990	XTR8 (xyloglucan:xyloglucosyl transferase 8); hydrolase	cell wall, cell wall proteins, AGPs	A15g64310	AGP1 (ARABINOGALACTAN-PROTEIN 1) Encodes proline-rich family protein
cell cycle	A11g53720	ATCYP59/CYP59 (CYCLOPHILIN 59); RNA binding, catalytic	cell wall, cell wall proteins, HRGP	A15g12880	proline-rich family protein
vesicle transport	A15g61210	SNAP33 (synaptosome-associated protein 33); t-SNAP	cell wall, pectin esterases, PME	A12g47040	VGD1 (VANGUARD1); pectinesterase
development, unspecified	A13g15270	SPL5 (SQUAMOSIA PROMOTER BINDING PROTEIN 5)	development, unspecified	A15g55770	SAP (STERILE APETALA); transcription factor
hormone metabolism, auxin, induced-regulation	A12g33310	IAA13 (indoleacetic acid-induced protein 13); transcrit	development, unspecified	A13g45600	TET3 (TETRASPANIN3) Member of TETRASPANIN family
hormone metabolism, auxin, induced-regulation	A13g03840	auxin-responsive protein, putative similar to auxin-re	DNA synthesis/chromatin structure	A15g57450	XRCC3 (Arabidopsis thaliana homolog of XRCC3); A
lipid metabolism, exotics' (steroids, squa	A12g03770	sulfotransferase family protein similar to ST (steroid	DNA, unspecified	A13g05740	RECQ1 (Arabidopsis RecQ helicase 1); ATP-depen
lipid metabolism, lipid degradation, lipases	A12g31100	lipase, putative similar to lipase class 3 family prote	hormone metabolism, auxin, induced-regul	A14g17280	auxin-responsive family protein similar to auxin-resp
misc, glutathione S transferases	A12g02380	ATGSTZ2 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transfe	hormone metabolism, auxin, induced-regul	A15g13380	auxin-responsive GH3 family protein similar to auxin
not assigned, no ontology	A11g59590	ZCF37 ZCF37 mRNA, complete cds similar to unkn	lipid metabolism, Phospholipid synthesis, i	A11g62430	ATCDS1 (CDP-diacylglycerol synthase 1); phosphat
not assigned, no ontology	A15g33406	hAT dimerisation domain-containing protein similar t	not assigned, no ontology	A13g23940	dehydratase family similar to dihydroxy-acid dehydr
not assigned, no ontology	A14g24930	thylakoid lumenal 17.9 kDa protein, chloroplast iden	not assigned, no ontology	A14g03130	BRCT domain-containing protein similar to unknown
not assigned, no ontology	A11g73540	ATNUDT21 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase hc	not assigned, no ontology	A11g64610	WD-40 repeat family protein similar to WD-40 repea
not assigned, no ontology	A12g33205	TMS membrane family protein / tumour differentially	not assigned, no ontology	A11g18300	ATNUJ14 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase hor
not assigned, no ontology	A12g46060	transmembrane protein-related similar to Os10g044	not assigned, no ontology	A13g21560	UGT84A2: UDP-glycosyltransferase/ sinapate 1-glyc
not assigned, no ontology	A13g52350	D111/G-patch domain-containing protein similar to L	not assigned, no ontology	A14g17800	DNA-binding protein-related similar to DNA-binding f
not assigned, no ontology	A15g28310	oxidoreductase-related similar to oxidoreductase lar	not assigned, no ontology	A14g18905	transducin family protein / WD-40 repeat family prote
not assigned, no ontology	A11g24200	paired amphipathic helix repeat-containing protein s	not assigned, no ontology	A15g45700	NLI interacting factor (NIF) family protein similar to N
not assigned, no ontology, paired amphip	A15g27270	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein si	not assigned, no ontology, glycine rich pro	A13g04640	glycine-rich protein similar to glycine-rich protein [A
not assigned, no ontology, pentatricopeptid	A11g78160	APUM7 (ARABIDOPSIS PUMILIO 7); RNA binding ;	not assigned, no ontology, pentatricopeptid	A15g39710	EMB2745 (EMBRYO DEFECTIVE 2745); binding si
not assigned, no ontology, pumilio/Puf RN	A11g69900	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, no ontology, Toll-Interleukin-	A15g44910	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing p
not assigned, unknown	A15g64905	PROPEP3 (Elicitor peptide 3 precursor) identical to	not assigned, unknown	A12g18680	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A14g27652	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g70420	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A14g39420	unknown protein	not assigned, unknown	A15g11140	similar to pEARL4 [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2
not assigned, unknown	A14g39190	similar to oxysterol-binding family protein [Arabidops	not assigned, unknown	A15g47900	Symbols: similar to unknown protein [Arabidopsi
not assigned, unknown	A11g15320	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A14g39670	similar to ACD11 (ACCELERATED CELL DEATH 11
not assigned, unknown	A12g31035	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A14g18660	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A13g14190	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g32920	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A13g43910	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A15g19230	identical to Uncharacterized GPI-anchored protein A
not assigned, unknown	A13g46750	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g35210	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, FB	A13g20710	F-box protein-related similar to F-box protein-relatec	not assigned, unknown	A15g19240	identical to Putative GPI-anchored protein At5g1924
redox, ascorbate and glutathione, glutathio	A12g48150	ATGPX4 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 4); glutathio	not assigned, unknown	A11g53970	unknown protein
RNA processing, ribonucleases	A15g22250	CCR4-NOT transcription complex component, putative	not assigned, unknown	A11g14630	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
RNA, regulation of transcription, bZIP trans	A11g42990	ATBZIP60 (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOT	not assigned, unknown	A13g03650	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
RNA, regulation of transcription, MYB dom	A15g61420	MYB28 (myb domain protein 28); DNA binding / tran	not assigned, unknown	A11g14770	similar to PHD finger protein-related [Arabidopsis the
RNA, regulation of transcription, Orphan fa	A11g48380	RHL1 (ROOT HAIRLESS 1) Encodes a novel nuclea	not assigned, unknown	A11g19140	similar to PREDICTED: similar to Coenzyme Q9 hon
RNA, regulation of transcription, putative tr	A15g55600	agenet domain-containing protein / bromo-adjacent h	not assigned, unknown	A11g36940	unknown protein
secondary metabolism, phenylpropanoids	A15g38130	transferase family protein similar to transferase fami	not assigned, unknown	A11g78110	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
signalling, G-proteins	A11g60860	ARF GTPase-activating domain-containing protein s	not assigned, unknown	A13g19340	sodium:dicarboxylate symporter similar to unknown
signalling, MAP kinases	A11g01560	ATMPK11 (Arabidopsis thaliana MAP kinase 11); M	not assigned, unknown	A14g10845	unknown protein
signalling, phosphoinositides, phosphatidyli	A11g34260	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family pr	not assigned, unknown	A14g11760	LCR17 (Low-molecular-weight cysteine-rich 17) Encc
signalling, receptor kinases, leucine rich r	A11g08590	GLAVATA1 receptor kinase (CLV1) similar to CLV1-1	protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A15g65030	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
signalling, receptor kinases, misc	A15g46080	protein kinase family protein similar to ACR4 (ARAE	protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A15g01830	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box c
stress, abiotic, cold	A11g04540	C2 domain-containing protein similar to C2 domain-c	protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, FB	A13g06140	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein ;
stress, abiotic, heat	A13g12170	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing prote	protein, posttranslational modification	A13g62430	F-box family protein similar to syntaxin-related famil
				A13g46920	protein kinase family protein similar to protein kinase

Genes significantly regulated by OG in Col0				Genes significantly regulated by OG in pad2			
Functional category	TAIR locus Identifier	TAIR8 Description	Col0 OG/ctrl	Functional category	TAIR locus Identifier	TAIR8 Description	pad2 OG/ctrl
stress.biotic.PR-proteins	A14g27220	disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	2.0	protein.posttranslational modification.kinase	A15g02290	NAK: Kinase Encodes a candidate protein kinase NAK	5.2
stress.biotic.signalling	A11g61560	MLO6 (MILDEW RESISTANCE LOCUS O 6), calmo	5.0	protein.posttranslational modification.kinase	A12g17220	protein kinase, putative similar to CONNEXIN 32, kin	2.3
transport.amino acids	A12g34960	CAT5 (CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 5);	17.7	protein.posttranslational modification.kinase	A15g18610	protein kinase family protein similar to PBS1 (AVRF	2.0
transport.misc	A14g21910	MATE efflux factor similar to MATE efflux fa	2.0	PS.photorepiration.hydroxypyruvate red	A12g45630	oxidoreductase family protein similar to oxidoreduc	3.3
transport.nucleotides	A11g57990	ATPUP18 (Arabidopsis thaliana purine permease 18	4.5	RNA-processing	A14g04885	pre-mRNA cleavage complex-related similar to S-loc	2.0
cell.wall.degradation.cellulases and beta	A14g09740	glycosyl hydrolase family 9 protein. Identical to Endc	-2.0	RNA-processing.ribonucleases	A15g22250	CCR4-NOT transcription complex protein, putative s	3.0
cell.wall.degradation.pectate lyases and p	A12g43870	polygalacturonase, putative / pectinase, putative sir	-6.2	RNA.regulation of transcription.AP2/ERF1	A11g28210	AP2 domain-containing transcription factor, putative	5.8
cell.cycle	A13g24810	ICK3 (kip-related protein 5); cyclin-dependent protein	-12.7	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn)	A12g28510	DoF-type zinc finger domain-containing protein. Ident	2.0
cell.organisation	A15g54280	ATM2 (ARABIDOPSIS THALIANA MYOSIN 4) Type	-2.8	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc	A13g19580	AZF2 (ARABIDOPSIS ZINC-FINGER PROTEIN 2); n	6.5
cell.vehicle transport	A14g06520	clathrin adaptor complex small chain family protein	-3.2	RNA.regulation of transcription.G2-like tra	A13g04030	myb family transcription factor similar to MYR1 (MY	2.0
development.storage proteins	A15g04040	SDP1 (SUGAR-DEPENDENT1); triacylglycerol lipas	-3.3	RNA.regulation of transcription.WRKY do	A14g31805	WRKY family transcription factor similar to myosin	2.2
development.unspecified	A13g13870	RHD3 (ROOT HAIR DEFECTIVE 3) required for regul	-2.0	signalling.in sugar and nutrient physiology	A15g64260	phosphatase-responsive protein, putative similar to ph	2.4
development.unspecified	A15g48850	male sterility MS5 family protein. similar to male ste	-2.0	signalling.receptor.kinases.leucine rich re	A11g16670	protein kinase family protein. similar to protein kinas	2.7
hormone.metabolism.auxin.induced-regul	A15g51470	auxin-responsive GH3 family protein. similar to auxin	-2.0	signalling.receptor.kinases.misc	A11g10130	lectin protein kinase, putative similar to lectin protei	15.5
lipid.metabolism.FA synthesis and FA eld	A11g75960	AMP-binding protein, putative similar to AMP-bindin	-2.0	stress.biotic	A13g20600	NDRI (NON RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTAN	11.1
misc.gluco-, galacto- and mannosidases	A12g20680	glycosyl hydrolase family 5 protein / cellulase family	-5.1	stress.biotic	A12g35520	defender against cell death 2 (DAD2) identical to De	7.0
misc.glutathione S transferases	A15g62480	ATGSTU9 (GLUTA THIONE S-TRANSFERASE TAU	-2.0	stress.biotic.PR-proteins	A15g36930	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), put	7.4
misc.short chain dehydrogenase/reductas	A11g24470	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family f	-3.6	transport.metal	A11g49810	ATNH2 (Arabidopsis thaliana Na/H antiporter 2); sc	3.0
misc.UDP glucosyl and glucoronyl transfe	A14g27560	glycosyltransferase family protein. similar to glycosy	-2.3	transport.NDP-sugars at the ER	A12g13650	GONST1 (GOLGI NUCLEOTIDE SUGAR TRANSPO	3.5
mitochondrial electron transport / ATP sy	A14g38640	choline transporter-related similar to choline transp	-2.0	cell.wall.hemicellulose synthesis	A12g03220	FT1 (FUCOSYLTRANSFERASE 1); fucosyltransfer	-3.6
not assigned.no ontology	A15g54670	ATK3 (ARABIDOPSIS THALIANA KINESIN 3); micro	-2.0	cell.division	A11g69400	transducin family protein / WD-40 repeat family prote	-37.0
not assigned.no ontology	A15g55950	transporter-related similar to transporter-related [Ara	-2.0	cell.division.plastid	A15g24020	MIND (ACCUMULATION AND REPLICATION OF CH	-30.7
not assigned.no ontology	A15g21950	hydrolyase, alpha/beta fold family protein similar to h	-2.2	DNA.repair	A12g24420	DNA repair ATPase-related similar to myosin heavy	-2.7
not assigned.no ontology, proline rich lam	A15g35190	proline-rich extensin-like family protein similar to pro	-2.0	DNA.repair	A15g61390	exonuclease family protein similar to exonuclease f	-6.9
not assigned.unknown	A11g72490	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0	metal handling.binding, chelation and stor	A14g38580	ATFP6 (FARNESYLATED PROTEIN 6); metal ion bi	-2.7
not assigned.unknown	A14g18310	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0	minor CHO metabolism.trehalose.potentia	A14g17770	ATP-S5 (Arabidopsis thaliana trehalase phosphatas	-2.0
not assigned.unknown	A14g23870	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0	misc.beta 1,3 glucan hydrolases	A13g13560	oxidoreductase family 17 protein. Identical to Put	-117.0
not assigned.unknown	A15g15880	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0	misc.oxidases - copper, flavone etc.	A14g36090	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-2.5
not assigned.unknown	A15g54420	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0	misc.protease.inhibitor/seed storage/lipid	A14g12480	PEARL1; lipid binding a putative lipid transfer protein	-2.0
not assigned.unknown	A11g01430	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-3.7	not assigned.no ontology	A11g55150	meprin and TRAF homology domain-containing prote	-2.0
not assigned.unknown	A11g23850	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-4.3	not assigned.no ontology	A12g47970	NPL4 family protein. Identical to NPL4-like protein 2	-2.1
not assigned.unknown	A15g61820	similar to hypothetical protein [Trifolium pratense] (G	-4.6	not assigned.no ontology	A11g16990	ACR3 (ACT Domain Repeat 3) similar to ACR4 (AC	-2.3
not assigned.unknown	A15g35540	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-4.9	not assigned.no ontology	A12g23830	vesicle-associated membrane protein, putative / VAN	-2.3
not assigned.unknown	A15g21170	contains domain ENGULFMENT AND CELL MOTILIT	-6.9	not assigned.no ontology	A15g55180	glycosyl hydrolase family 17 protein. similar to hydr	-3.6
not assigned.unknown	A15g25475	DNA binding similar to DNA binding [Arabidopsis th	-8.5	not assigned.no ontology	A12g33060	leucine-rich repeat family protein similar to leucine-r	-3.6
not assigned.unknown	A13g28240	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-16.2	not assigned.no ontology	A15g06570	tetrafratricopeptide repeat (TPR)-containing protein. Ide	-2.0
not assigned.unknown	A13g58660	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-34.0	not assigned.no ontology	A14g22670	transferase, transferring glycosyl groups similar to U	-2.0
not assigned.unknown	A11g4045	similar to unnamed protein product [Tetradon nigrov	-47.7	not assigned.unknown	A14g14100	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-2.0
nucleotide metabolism.phosphotransfer a	A15g35170	adenylate kinase family protein. similar to adenylate	-2.0	not assigned.unknown	A14g23950	similar to Os06g0573800 [Oryza sativa (japonica cu	-2.0
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	A11g05880	zinc ion binding similar to IBR domain-containing pr	-2.2	not assigned.unknown	A14g29560	similar to conserved hypothetical protein [Medicago	-2.1
protein.posttranslational modification	A13g02750	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family	-2.1	not assigned.unknown	A15g17460	similar to conserved hypothetical protein [Medicago	-2.1
protein.posttranslational modification	A12g43700	lectin protein kinase family protein. similar to ATHLE	-2.6	not assigned.unknown	A12g46900	similar to PREDICTED: similar to CG7927-PA [Tribol	-2.2
protein.posttranslational modification.kinase	A13g60250	CKB3 (Casein kinase II beta chain 3); protein kinase	-2.4	not assigned.unknown	A15g59080	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	-4.4
protein.synthesis.elongation	A14g26310	elongation factor P (EF-P) family protein similar to e	-2.0	nucleotide metabolism.synthesis.pyrimid	A15g11750	AAA-type ATPase family protein similar to AAA-type	-3.1
protein.targeting.secretory pathway.unspe	A13g23620	brix domain-containing protein. Identical to Brix dom	-2.0	protein.degradation.serine protease	A11g17320	SCLP5 (serine carboxypeptidase-like 5); serine carb	-2.3
protein.synthesis.elongation	A15g14670	ATARF1B (ADP-ribosylation factor A1B); GTP bind	-2.0	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	A13g47180	zinc finger (C3HCA-type RING finger) family protein	-3.1
redox.thioredoxin	A13g53220	thioredoxin family protein. similar to A1TRX2 (Arabid	-15.0	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBC	A11g76920	F-box family protein (FBX3) similar to F-box family F	-2.0
RNA.regulation of transcription.bZIP trans	A12g18160	GBF5 (G-box binding factor 5); DNA binding / transcr	-2.4	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBC	A13g06570	Kelch family protein similar	-2.0
RNA.regulation of transcription.C3H zinc	A12g19360	zinc finger (CCCH-type) family protein similar to zinc	-2.0				

Genes significantly regulated by OG in Col0				Genes significantly regulated by OG in pad2			
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Col0 OG/ctrl	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	pad2 OG/ctrl
RNA, regulation of transcription, G2-like transition	A13g19070	cell wall protein-related, similar to leucine-rich repeat	-2.0	protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, F-box	A11g51370	F-box family protein, similar to F-box family protein	-6.2
RNA, regulation of transcription, MADS box	A15g65070	MAF4 (MADS AFFECTING FLOWERING 4); transcribed	-2.0	protein, degradation, ubiquitin, proteasome	A15g38650	proteasome maturation factor UMP1 family protein	-1.3
RNA, regulation of transcription, MADS box	A11g01530	AGL28 (AGAMOUS-LIKE 28); DNA binding / transcribed	-2.8	protein, degradation, ubiquitin, ubiquitin	A12g30100	ubiquitin family protein, similar to leucine-rich repeat	-2.5
RNA, regulation of transcription, NIN-like box	A14g24020	RWP-RK domain-containing protein, similar to RWP	-3.6	protein, posttranslational modification	A13g02750	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family	-2.1
RNA, regulation of transcription, putative transcription factor	A15g53960	ATP binding / DNA binding / DNA topoisomerase (ATPase)	-2.4	RNA, regulation of transcription, bHLH, basic helix-loop-helix	A14g20970	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein, similar to	-2.9
RNA, regulation of transcription, putative transcription factor	A14g04840	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein	-2.6	RNA, regulation of transcription, bHLH, basic helix-loop-helix	A12g42280	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein, similar to	-35.1
RNA, transcription	A15g10070	RNase L inhibitor protein-related, similar to 80A08_4	-2.0	RNA, regulation of transcription, MYB domain	A14g21040	Dof-type zinc finger domain-containing protein, identical	-4.0
signalling, G-proteins	A12g46710	rac GTPase activating protein, putative, similar to rac	-2.0	RNA, regulation of transcription, unclassified	A15g02320	MYB3R-5 (myb domain protein 3R-5); DNA binding /	-2.2
signalling, G-proteins	A14g35860	ATGB2 (GTP-BINDING 2); GTP binding GTP-binding	-2.0	signalling, calcium	A15g42290	transcription activator-related, similar to Os03g01331	-2.2
signalling, G-proteins	A15g02040	prenylated rab acceptor (PRA1) family protein, similar	-2.1	signalling, receptor, kinases, leucine rich repeat	A12g31500	CPK24 (calcium-dependent protein kinase 24); calcium	-2.1
signalling, light	A11g02340	HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED); DNA binding	-13.0	stress, abiotic, unspecified	A15g50270	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family	-2.0
signalling, light	A13g22170	FHY3 (far-red elongated hypocotyls 3); zinc ion binding	-3.9	stress, biotic, PR-proteins, plant defensins	A13g50980	dehydrin, putative, identical to Dehydrin Xero 1 (XER1)	-3.0
signalling, receptor, kinases, leucine rich repeat	A13g50230	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-3.3	stress, biotic, PR-proteins, proteinase inhibitor	A12g43520	ATT2 (ARABIDOPSIS THALIANA TRYPSIN INHIBITOR)	-9.4
stress, abiotic, drought/salt	A11g78240	dehydration-responsive protein-related, similar to dehydrin	-2.0		A13g04320	endopeptidase inhibitor, similar to trypsin and protease	-4.0
stress, abiotic, unspecified	A14g25790	allergen V5/Tpx-1-related family protein, similar to all	-2.0				
TCA / org. transformation, TCA, CS	A13g60100	CSY5 (CITRATE SYNTHASE 5); citrate (S)-synthase	-2.0				
transport, metal	A12g47600	ATMHX (MAGNESIUM/PROTON EXCHANGER); calcium	-2.0				
transport, metal	A11g47240	NRAMP2 (NRAMP metal ion transporter 2); metal ion	-3.6				
transport, potassium	A14g19960	potassium ion transporter, similar to KUP11 (K+ uptake)	-5.7				
transport, sugars, sucrose	A11g71880	SUC1 (SUCROSE-PROTON SYMPORTER 1); carbohydrate	-3.2				

Genes significantly regulated by OG in both Col0 and pad2

Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Col0 OG/ctrl	pad2 OG/ctrl
RNA, processing, ribonucleases	A15g02250	CCR4-NOT transcription complex protein, putative subunit	2.4	3.0
protein, posttranslational modification	A13g02750	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family	-2.1	-2.1

Genes significantly regulated in Col0 and *pad2* plants inoculated with *P. brassicae* from Venn diagram

gene significantly up- or down-regulated (≥ 2.0 -fold induction or repression in treated plants as compared to control, respectively), with P value ≤ 0.01 +/- 2.0 : ≥ 2.0 -fold induction or repression, but not determined.

Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in Col0			Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in <i>pad2</i>				
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Col0 Pb/ctr	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	<i>pad2</i> Pb/ctr
amino acid metabolism, degradation, arom	A12g20610	SUR1 (SUPERROOT 1); transaminase Confers auxin	5.50	amino acid metabolism, degradation, serin	A12g26080	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative /	245.3
amino acid metabolism, synthesis, arom	A14g23690	COR13 (CORONATINE INDUCED 1), JASMONIC ACI	3.1	amino acid metabolism, synthesis, arom	A11g48850	EMB1144 (EMBRYO DEFECTIVE 1144); chorismat	5.0
amino acid metabolism, synthesis, arom	A11g11790	prephenate dehydrogenase family protein similar to pre	2.9	amino acid metabolism, synthesis, arom	A15g05730	ASA1 (ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBU	35.8
amino acid metabolism, synthesis, arom	A15g17990	TRP1 (TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS 1); anthranilic	4.0	amino acid metabolism, synthesis, serine	A11g17745	PGDH (3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENA	8.3
amino acid metabolism, synthesis, central	A12g02010	glutamate decarboxylase, putative similar to GAD (8.4	cell wall, degradation, pectate lyases and p	A15g48140	polygalacturonase, putative / pectinase, putative sir	8.7
cell wall, cell wall proteins, RGP	A13g02230	RGP1 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEP	4.6	cell wall, degradation, pectate lyases and p	A12g15460	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalactur	4.8
cell wall, hemicellulose synthesis	A12g15390	FUT4 (fucosyltransferase 4); fucosyltransferase/ tran	9.8	cell wall, degradation, pectate lyases and p	A11g11920	pectate lyase family protein identical to Putative pec	3.4
cell wall, pectin*esterases, acetyl*esterase	A13g09410	pectinacetyl/esterase family protein similar to pectin	5.2	cell wall, pectin synthesis	A14g01750	RGX22 (RHAMNOGALACTURONAN XYLOSYLTRAI	2.6
cell wall, pectin*esterases, misc	A12g45220	pectinesterase family protein similar to pectinestera	38.2	cell wall, precursor synthesis, RHM	A11g78570	RHM1/ROL1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS1); UDP	3.0
cell, cycle	A11g25882	cell cycle control protein-related similar to unknown	2.1	cell wall, precursor synthesis, UGD	A13g01010	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family f	6.3
cell, division	A13g19180	kinesin motor protein-related similar to ARC6 (ACCUN	2.7	cell wall, precursor synthesis, UXS	A12g47650	UXS4 (UDP-XYLOSE SYNTHASE 4); catalytic enco	4.5
cell, organisation	A12g28620	kinesin motor protein-related similar to kinesin mot	18.1	cell cycle	A11g47220	CYCA3.3 (CYCLIN A3.3); cyclin-dependent protein k	3.6
cell, organisation	A14g37010	caltractin, putative / centrin, putative similar to ATC	10.9	cell, division	A11g15850	transducin family protein / WD-40 repeat family prote	3.3
cell, organisation	A12g01750	ATMAP70-3 (microtubule-associated proteins 70-3);	2.6	cell, organisation	A13g23280	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein /	2.2
cell, vesicle transport	A11g76970	VHS domain-containing protein / GAT domain-contai	4.1	cell, vesicle transport	A13g11820	SYP121 (syntaxin 121); t-SNARE Encodes plasma	4.5
cell, vesicle transport	A15g02100	UNE18 (unfertilized embryo sac 18); oxysterol bindi	3.5	Co-factor and vitamin metabolism, molyb	A15g55130	CNX5 (SIRTINOL RESISTANT 1); Mo-molybdopterin	2.8
cell, vesicle transport	A13g08530	clathrin heavy chain, putative similar to clathrin heav	2.1	development, unspecified	A11g69170	squamosa promoter-binding protein-like 6 (SP.L6) lcl	25.3
development, unspecified	A12g17040	ANAC036 (Arabidopsis NAC domain containing prot	5.1	development, unspecified	A12g41380	embryo-abundant protein-related similar to embryo-a	18.6
development, unspecified	A15g21150	PAZ domain-containing protein / piwi domain-contain	3.0	development, unspecified	A15g08790	ATAF2 (Arabidopsis NAC domain containing protein	13.9
development, unspecified	A11g34190	ANAC017 (Arabidopsis NAC domain containing prot	2.4	development, unspecified	A15g63790	ANAC102 (Arabidopsis NAC domain containing prot	5.4
development, unspecified	A15g50670	squamosa promoter-binding protein, putative identic	2.4	development, unspecified	A15g54200	WD-40 repeat family protein similar to WD-40 repea	3.6
DNA, synthesis, chromatin structure	A12g07690	minichromosome maintenance family protein / MCM1	2.1	development, unspecified	A15g50670	squamosa promoter-binding protein, putative identic	2.8
DNA, synthesis, chromatin structure	A15g04980	endonuclease/exonuclease/phosphatase family prot	2.1	development, unspecified	A15g13180	ANA.C083 (Arabidopsis NAC domain containing prot	2.6
DNA, unspecified	A12g36110	3'-5' exonuclease domain-containing protein similar	2.1	development, unspecified	A12g34040	apoptosis inhibitor 5 (API5) family protein similar to	2.0
fermentation, PDC	A15g17380	pyruvate decarboxylase family protein similar to CS	10.8	development, unspecified	A13g45870	integral membrane family protein / nodulin MN21-rel	2.0
glycolysis, PK	A13g49160	pyruvate kinase family protein similar to pyruvate kin	4.5	DNA, repair	A13g26680	SNM1 (SENSITIVE TO NITROGEN MUSTARD 1) inv	5.2
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A11g60730	aldo/keto reductase family protein similar to ATB2, 1	4.3	DNA, unspecified	A12g24170	endomembrane protein 70, putative similar to endom	2.0
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A11g60690	aldo/keto reductase family protein similar to ATB2, 1	2.9	gluconogenesis/ glyoxylate cycle, pyruva	A14g15530	PPDK (PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE	6.5
hormone metabolism, ethylene, induced-re	A13g24500	ATMBF1C (MULTIPROTEIN BRIDGING FAC	9.2	hormone metabolism, auxin, induced-regul	A14g26080	ABI1 (ABA INSENSITIVE 1); calcium ion binding / pi	4.1
hormone metabolism, ethylene, signal tran	A13g15210	ATERF-4/A TERF4/ERF4/RAP2.5 (ETHYLENE RESI	6.6	hormone metabolism, auxin, induced-regul	A15g35735	auxin-responsive family protein similar to auxin-resp	4.7
hormone metabolism, jasmonate, synthesis	A13g25780	AOC3 (ALLENE OXIDE CYCLASE 3) Encodes allen	89.8	hormone metabolism, ethylene, induced-re	A13g12830	auxin-responsive family protein similar to auxin-resp	2.2
hormone metabolism, salicylic acid, synth	A11g66690	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase	2.0	hormone metabolism, ethylene, induced-re	A13g16050	A37 (PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.2); protein het	2.3
hormone metabolism, salicylic acid, synth	A15g38780	TA T3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3); trans	332.8	hormone metabolism, ethylene, induced-re	A12g20100	ethylene-responsive family protein similar to ethylen	2.0
metal handling, chelation and stor	A12g24850	ATAP14/PAP14; acid phosphatase/ protein serine/ t	2.0	hormone metabolism, ethylene, signal tran	A14g17500	ATERF-1 (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BI	51.7
minor CHO metabolism, galactose, alpha-d	A13g56310	alpha-galactosidase, putative / melibiase, putative /	2.3	hormone metabolism, ethylene, signal tran	A13g15210	ATERF-4/ATERF4/ERF4/RAP2.5 (ETHYLENE RESI	8.8
minor CHO metabolism, others	A15g37850	SOSA (SALT OVERLY SENSITIVE 4); kinase Encod	2.7	hormone metabolism, ethylene, signal tran	A12g48480	ATERF13/EREBP (ETHYLENE-RESPONSIVE ELEI	2.4
misc, calineurin-like phosphoesterase far	A12g46880	CYP705A18 (cytochrome P450, family 705, subfam	5.9	lipid metabolism, FA synthesis and FA el	A13g19260	LAG1 HOMOLOG 2 (LONGEVITY ASSURANCE GE	8.1
misc, cytochrome P450	A12g22330	CYP79B3 (cytochrome P450, family 79, subfamily B	4.1	lipid metabolism, lipid degradation, lipases	A15g36880	acetyl-CoA synthetase, putative / acetate-CoA ligas	7.3
misc, cytochrome P450	A13g20090	CYP705A18 (cytochrome P450, family 705, subfam	3.6	lipid metabolism, phospholipid synthesis	A13g55190	esterase/lipase/thioesterase family protein similar to	3.8
misc, cytochrome P450	A12g24850	CYP71B20 (cytochrome P450, family 71, subfamily	4.1	metal handling, regulation	A14g14710	ATARD2; acireductone dioxygenase (Fe2+-requir	2.7
misc, gluco-, galacto- and mannosidases	A15g48375	TGG3 (THIOGLUCOSIDE GLUCOSIDASE 3); hydro	3.8	misc, alcohol dehydrogenases	A11g64710	alcohol dehydrogenase, putative similar to alcohol d	5.9
misc, glutathione S transferases	A11g02920	ATGSTF7 (GLUTA THIONE S-TRANSFERASE 11); G	15.5	misc, alcohol dehydrogenases	A11g09500	(cinnamyl)-alcohol dehydrogenase family / CAD family	2.0
misc, glutathione S transferases	A12g02930	ATGSTF3 (GLUTA THIONE S-TRANSFERASE 16); G	5.7	misc, GDSL-motif lipase	A11g28610	GDSL-motif lipase, putative similar to carboxylic est	2.3
misc, myrosinases-lectin-jacalin	A13g16530	legume lectin family protein Lectin like protein whose	28.4	misc, gluco-, galacto- and mannosidases	A11g67490	GC51 (GLUCOSIDASE 1); alpha-glucosidase Encod	2.4
misc, myrosinases-lectin-jacalin	A14g54010	myrosinase-associated protein, putative similar to m	7.1	misc, gluco-, galacto- and mannosidases	A13g23570	dieneolone hydrolase family protein similar to dien	7.3
misc, oxidases - copper, flavone etc.	A14g12290	copper amine oxidase, putative similar to copper an	3.8	misc, misc2	A11g21120	O-methyltransferase, putative similar to O-methyltra	5.9
misc, oxidases - copper, flavone etc.	A14g38540	monoxygenase, putative (MO2) similar to monooxy	2.9				

Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in Col0			Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in pad2		
TAIR locus identifier	Functional category	TAIR8 Description	Col0 Pb/ctr	TAIR8 Description	pad2 Pb/ctr
A15g18900	misc.oxidases - copper, flavone etc.	oxidoreductase, ZOG-Fe(II) oxygenase family protein	2.9	oxidoreductase, ZOG-Fe(II) oxygenase family protein	2.3
A14g08770	misc.peroxidases	peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2) identical to f	4.6	peroxidase, putative identical to Peroxidase 37 prec	97.6
A11g33660	misc.peroxidases	peroxidase family protein similar to APX1 (ASCORE	3.8	peroxidase, putative identical to Peroxidase 28 prec	3.8
A15g11610	misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	exostosin family protein similar to exostosin family	2.4	peroxidase family protein similar to APX1 (ASCORE	3.5
A12g26060	not assigned.no ontology	EMB1345 (EMBRYO DEFECTIVE 1345); nucleotide	46.5	peroxidase, putative identical to Peroxidase 44 prec	3.3
A14g21850	not assigned.no ontology	methionine sulfoxide reductase domain-containing pr	36.4	plastocyanin-like domain-containing protein. Identica	2.1
A15g52760	not assigned.no ontology	heavy-metal-associated domain-containing protein s	15.1	EDA4 (embryo sac development arrest 4); lipid bindi	2.4
A11g74100	not assigned.no ontology	sulfotransferase family protein similar to sulfotransf	10.4	ALG6, ALG8 glycosyltransferase family protein. Ident	4.3
A15g04930	not assigned.no ontology	ALA1 (AMINOPHOSPHOLIPID ATPASE 1); ATPase.	9.3	glycosyltransferase family 14 protein / core-2/4-bran	3.2
A11g78210	not assigned.no ontology	hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to h	8.7	exostosin family protein similar to exostosin family	2.8
A13g01290	not assigned.no ontology	band 7 family protein similar to band 7 family protein	8.2	UGT73B2; UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltr	2.4
A15g11650	not assigned.no ontology	hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to h	6.0	cytochrome c oxidase subunit 3 similar to Cytochro	2.0
A15g18480	not assigned.no ontology	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	5.0	defense protein-related similar to proline-rich family	40.3
A12g23680	not assigned.no ontology	stress-responsive protein, putative similar to stress-	4.7	DSBA oxidoreductase family protein similar to DSBA	39.7
A12g40600	not assigned.no ontology	app1-p processing enzyme family protein similar to	3.9	methionine sulfoxide reductase domain-containing pr	25.2
A15g61900	not assigned.no ontology	BON1 (BONZA11); calcium-dependent phospholipid l	3.9	S-locus protein-related similar to zinc finger (C2H2-t	13.6
A11g54130	not assigned.no ontology	RSH3 (RELA/SPO1 HOMOLOG 3); catalytic similar	3.4	sulfotransferase family protein similar to sulfotransf	11.1
A14g14310	not assigned.no ontology	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	3.2	WD-40 repeat family protein similar to WD-40 repea	7.8
A14g16765	not assigned.no ontology	oxidoreductase, ZOG-Fe(II) oxygenase family protein	3.0	sulfotransferase family protein similar to sulfotransf	7.4
A14g03410	not assigned.no ontology	peroxisomal membrane protein-related similar to pe	2.4	NADK1 (NAD kinase 1); NAD+ kinase/ NADH kinase	6.8
A15g05590	not assigned.no ontology	PA1Z (PHOSPHORIBOSYLANTHRANILATE ISOMER	2.4	band 7 family protein similar to band 7 family protein	5.7
A15g45550	not assigned.no ontology	mob1/phocin family protein similar to mob1/phocin	2.2	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	4.5
A12g39970	not assigned.no ontology	peroxisomal membrane protein (PMP36) similar to /	2.1	A TELC-LIKE/E1LC-LIKE similar to A TELC/E1LC, ubiq	4.3
A11g55250	not assigned.no ontology	HISTONE MONO-UBIQUITINATION 2/HUBZ AT1G55	2.0	fringe-related protein similar to fringe-related protein	4.2
A12g02630	not assigned.no ontology	metal ion binding similar to heavy-metal-associated	2.0	hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to h	4.1
A15g52720	not assigned.no ontology	ABC1 family protein similar to ATATH13 (ABC2 hom	67.0	DREPP plasma membrane polypeptide-related Encc	4.1
A15g24810	not assigned.no ontology. ABC1 family pr	BSD domain-containing protein similar to BSD dom	3.6	frimboid family protein similar to A TRBL1 (ARABID	3.4
A14g13110	not assigned.no ontology. BSD domain-co	C2 domain-containing protein identical to C2 domain	2.6	lesion inducing protein-related similar to unknown pr	3.2
A11g63220	not assigned.no ontology. C2 domain-cont	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein simi	7.9	A TOFP3/OFP3 (Arabidopsis thaliana ovate family pr	3.2
A15g19800	not assigned.no ontology. hydroxyproline	pentatricopeptide (P-PR) repeat-containing protein s	2.3	prolamine P1 family protein similar to unknown pro	3.1
A15g46810	not assigned.no ontology. pentatricopeptid	pentatricopeptide (P-PR) repeat-containing protein s	2.0	RNA binding similar to RNA binding [Arabidopsis thi	3.0
A15g19810	not assigned.no ontology. proline rich fam	proline-rich extensin-like family protein similar to pr	7.2	SYN3 (Sister chromatid cohesion 1 protein 3) Cohes	3.0
A11g55850	not assigned.no ontology. pumilio/P1 of RNA	APUM17 (ARABIDOPSIS PUMILIO 17); RNA bindin	20.1	RabGAP7/TBC domain-containing protein similar to f	2.9
A13g22240	not assigned.unknown	unknown protein	32.3	lesion inducing protein-related similar to lesion indu	2.6
A11g05730	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	27.2	peroxisomal membrane protein-related similar to pe	2.6
A15g19230	not assigned.unknown	identical to Uncharacterized GPI-anchored protein A	14.1	UBA1A; AU-specific RNA binding / RNA binding enc	2.5
A15g08240	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	11.1	esterase/lipase/thioesterase family protein similar to	2.4
A15g10200	not assigned.unknown	binding similar to tetrairicopeptide repeat (TPR)-con	11.0	sulfotransferase family protein similar to sulfotransf	2.1
A14g35110	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	10.2	similar to NtRap protein, expressed [Oryza sativa (jap	2.1
A13g05685	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	8.0	similar to ESP4 (ENHANCED SILENCING PHENOT	2.1
A11g41920	not assigned.unknown	similar to hAT dimerisation domain-containing protei	7.6	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	2.1
A11g32920	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	7.3	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	2.0
A14g16670	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	6.7	LEM3 (ligand-effect modulator 3) family protein / CD	2.0
A14g17070	not assigned.unknown	similar to Os03g0100300 [Oryza sativa (japonica cul	6.1	DC1 domain-containing protein similar to DC1 doma	2.0
A12g30430	not assigned.unknown	unknown protein	5.9	BSD domain-containing protein similar to BSD doma	6.0
A12g45135	not assigned.unknown	protein binding / zinc ion binding contains InterPro c	5.5	formin homology 2 domain-containing protein / FH2 c	4.5
A12g40095	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	5.5	glycine-rich protein similar to ATGRP7 (COLD, CIR	2.7
A12g41230	not assigned.unknown	similar to ARL (ARGOS-LIKE) [Arabidopsis thaliana]	5.2	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein simi	4.4
A11g10140	not assigned.unknown	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	5.2	pentatricopeptide (P-PR) repeat-containing protein s	3.1
				pentatricopeptide (P-PR) repeat-containing protein s	3.0

Genes significantly regulated by <i>P.brassicae</i> in <i>Col0</i>			Genes significantly regulated by <i>P.brassicae</i> in <i>pad2</i>		
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description
not assigned, unknown	A15g16170	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, no ontology, pentatricopeptide	A11g29710	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein s
not assigned, unknown	A13g48020	similar to F-box family protein-related [Arabidopsis th	not assigned, no ontology, pentatricopeptide	A15g67570	EMB17408 (EMBRYO DEFECTIVE 1408); binding si
not assigned, unknown	A13g57450	similar to Hypothetical protein [Oryza sativa] [GB-AA	not assigned, no ontology, proline rich fam	A15g62640	ELF5 (EARLY FLOWERING 5) nuclear targeted prot
not assigned, unknown	A15g44060	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, no ontology, pumilio/Pu1 RN	A11g78160	APUM7 (ARABIDOPSIS PUMILLO 7); RNA binding
not assigned, unknown	A11g29060	Identical to Bert1-like protein A11g29060 [Arabidopsis	not assigned, unknown	A15g61930	unknown protein
not assigned, unknown	A12g45830	DTA2 (DOWNSTREAM TARGET OF AFL15 2) simi	not assigned, unknown	A11g10710	Encodes a maternally expressed gene (MEG) family
not assigned, unknown	A11g68440	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g67230	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A14g24290	similar to NSL1 (NECROTIC SPOTTED LESIONS 1)	not assigned, unknown	A11g06540	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A12g20010	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A13g45460	zinc ion binding, similar to protein binding / zinc ion
not assigned, unknown	A15g08400	similar to oxidoreductase/ transition metal ion bindi	not assigned, unknown	A12g40095	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A15g17280	similar to oxidoreductase [Typanosoma cruzi strain	not assigned, unknown	A15g10625	similar to FFP1 (FLOWERING PROMOTING FACTO
not assigned, unknown	A15g49410	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A14g30390	unknown protein
not assigned, unknown	A15g49710	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g66480	PM12 (plastid movement impaired 2), similar to unkn
not assigned, unknown	A15g65950	binding, similar to hypothetical protein Os_J07863 [not assigned, unknown	A12g41230	similar to ARL (ARGOS-LIKE) [Arabidopsis thaliana]
not assigned, unknown	A13g14430	similar to hypothetical protein [Oryza sativa (japonic	not assigned, unknown	A12g42370	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A14g10810	similar to Os10g0502100 [Oryza sativa (japonica cul	not assigned, unknown	A15g23510	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A15g11600	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A11g10990	unknown protein
not assigned, unknown	A12g20820	similar to hypothetical protein [Capsicum chinense]	not assigned, unknown	A14g26240	similar to Os01g0559300 [Oryza sativa (japonica cul
not assigned, unknown	A12g37530	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A14g07485	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A12g36680	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A15g42150	electron carrier/ protein disulfide oxidoreductase sir
not assigned, unknown	A11g29640	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A13g57090	binding, similar to binding [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A11g22140	contains domain ZINC FINGER-CONTAINING PROT	not assigned, unknown	A15g18490	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A11g24267	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A12g44110	similar to unknown protein [Oryza sativa (japonic
not assigned, unknown	A11g10150	ATPP2-A10 (Phloem protein 2-A10) similar to CF9 [not assigned, unknown	A12g43320	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A13g48860	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A15g68375	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A14g08013	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A13g30500	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
not assigned, unknown	A11g29640	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A15g33360	nucleic acid binding / ribonuclease H, similar to nucl
not assigned, unknown	A11g50910	similar to Os09g0504900 [Oryza sativa (japonica cul	not assigned, unknown	A15g19380	similar to Ulp1, protease family protein [Arabidopsi
nucleotide metabolism, degradation	A15g53232	DVL20/RTFL1 (ROTUNDIFOLIA 1) similar to ROT4 [not assigned, unknown	A13g05570	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
nucleotide metabolism, degradation	A13g17810	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	not assigned, unknown	A15g46380	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
nucleotide metabolism, phosphotransfer a	A15g35250	BETA-UP (BETA-UREIDOPROPIONASE); beta-urei	not assigned, unknown	A15g2975	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
OPP, oxidative P, 6-phosphogluconate de	A15g26667	uridylylate kinase / uridine monophosphate kinase / U	not assigned, unknown	A15g51090	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation	A13g02360	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein s	not assigned, unknown	A11g57610	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation	A14g30920	cytosol aminopeptidase family protein, identical to L1	not assigned, unknown	A13g09430	similar to Os07g0695700 [Oryza sativa (japonica cul
protein, degradation, AAA type	A11g78660	ATGGH1; gamma-glutamyl hydrolase The Arabidops	not assigned, unknown	A15g12300	similar to Protein of unknown function DUF667 [Medi
protein, degradation, autophagy	A15g17760	AAA-type ATPase family protein, similar to AAA-ty	not assigned, unknown	A15g6070	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, autophagy	A15g61500	autophagy_3 (APG3) similar to autophagy cytosol p	not assigned, unknown	A15g44860	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, autophagy	A15g17290	APG5/ATG5 (AUTOPHAGY 5); transporter Autophag	not assigned, unknown	A15g564870	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, cysteine protease	A15g05110	cysteine protease inhibitor, putative / cystatin, puta	not assigned, unknown	A13g31310	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, serine protease	A12g26390	serpin, putative / serine protease inhibitor, putative	not assigned, unknown	A12g19850	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, serine protease	A11g63280	serpin-related / serine protease inhibitor-related, simi	not assigned, unknown	A15g60410	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A15g27420	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	not assigned, unknown	A11g19950	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A12g19610	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	not assigned, unknown	A11g07040	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A15g41440	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	not assigned, unknown	A11g15640	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A14g25230	RIN2 (RPM1 INTERACTING PROTEIN 2); protein bin	not assigned, unknown	A11g24267	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A13g06330	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	not assigned, unknown	A12g20950	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, RING	A11g76390	armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box c	not assigned, unknown	A15g30690	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, FBC	A11g14330	kelch repeat-containing F-box family protein similar	not assigned, unknown	A11g30690	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, FBC	A12g29820	kelch repeat-containing F-box family protein similar	not assigned, unknown	A11g74710	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein, degradation, ubiquitin, E3, SCF, FBC	A15g67140	F-box family protein, similar to F-box family protein [not assigned, unknown	A11g79270	ECT8 (evolutionarily conserved C-terminal region 8)

Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in <i>Colo</i>			Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in <i>pad2</i>		
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR Description	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR Description
protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A11930920	F-box family protein similar to F-box family protein [ASK11 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 11); ubiquitin-pro	not assigned,unknown	A12912110	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,SKP1	A14934210	RPT3 (root phototropism 3); ATPase 26S proteasom	not assigned,unknown	A13905830	Encodes alpha-helical IF (intermediate filament)-like
protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A15958290	PBF1 (20S proteasome beta subunit F1); peptidase	not assigned,unknown	A13947240	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A13960820	PBD1 (PROTEASOME SUBUNIT PRGB); peptidase	not assigned,unknown	A15923482	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA
protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A13922630	proteasome maturation factor UMP1 family protein s	nucleotide metabolism,degradation	A15964370	BETA-UJ (BETA-UJ-EIFDOPROPIONASE); beta-ureic
protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A15938660	polyubiquitin-related similar to ubiquitin family pro	nucleotide metabolism,degradation	A149239610	cytidine deaminase, putative / cytidine aminohydro
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A11953980	ubiquitin family protein identical to Ubiquitin-like pro	nucleotide metabolism,phosphotransferase	A15925667	uridylylate kinase / uridine monophosphate kinase / U
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A15942300	UBP6 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 6); ubiquit	protein.degradation	A14930920	cytosol aminopeptidase family protein identical to L
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A11951710	protein kinase family protein similar to protein kinas	protein.degradation	A14907670	protease-associated (PA) domain-containing protein
protein.posttranslational modification	A13905050	MAPKKK10 (Mitogen-activated protein kinase kinase	protein.degradation	A12914260	PIP (proline iminopeptidase); prolyl aminopeptidase
protein.posttranslational modification	A14908470	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative s	protein.degradation	A11935340	ATP-dependent protease La (LON) domain-containin
protein.posttranslational modification	A11922280	seirine/threonine protein kinase, putative similar to s	protein.degradation,metalloprotease	A11907510	FTSH10 (FtsH protease 10); ATPase encodes an Ft
protein.synthesis,initiation	A13917410	LSP1 (LOSS OF SUSCEPTIBILITY TO POTYVIRUS	protein.degradation,ubiquitin	A12917200	ubiquitin family protein similar to ubiquitin family pro
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A15935620	clathrin adaptor complex medium subunit family p	protein.degradation,ubiquitin,E3,RING	A15955970	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A15914030	nucleoporin family protein similar to transporter [Ara	protein.degradation,ubiquitin,E3,RING	A11965040	protein binding / zinc ion binding similar to zinc finger
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A11959680	importin alpha-2 subunit, putative similar to importin	protein.degradation,ubiquitin,E3,RING	A14914220	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A11902690	ER lumen protein retaining receptor family protein s	protein.degradation,ubiquitin,E3,RING	A14930370	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A14938790	ER lumen protein retaining receptor family protein s	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A11914260	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A12921190	SEC22 (secretion 22); transporter member of SEC22	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A15939250	F-box family protein similar to F-box family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A11911890	clathrin adaptor complex medium subunit family p	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A11969090	F-box family protein similar to F-box family protein
protein.degradation,ubiquitin,ubiquitin	A15946630	LHB1B2 (Photosystem II light harvesting complex ge	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A12926030	F-box family protein similar to F-box family protein
RNA,regulation of transcription,AP2/ERE	A12934420	ATERF-8/ATERF8 (ETHYLENE RESPONSE ELEM	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A11949790	F-box family protein-related similar to F-box family p
RNA,regulation of transcription,bHLH,Bas	A11953170	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein similar t	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A15935995	F-box family protein similar to F-box family protein
RNA,regulation of transcription,bHLH,Bas	A11912540	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein similar t	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,FBC	A15960610	F-box family protein similar to F-box family protein
RNA,regulation of transcription,bZIP trans	A14936600	ATBZIP60 (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOT	protein.degradation,ubiquitin,E3,SCF,SKP1	A11975950	SKP1 (ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE); ubiqui
RNA,regulation of transcription,C2H2 zinc	A13946090	ZAT1; nucleic acid binding / transcription factor / zinc	protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A14931300	PBA1 (20S proteasome beta subunit A 1); peptidase
RNA,regulation of transcription,C3H zinc	A12940140	CZF1/ZCFAR1; transcription factor similar to zinc fing	protein.degradation,ubiquitin,proteasom	A14924820	26S proteasome regulatory subunit, putative (RPN7)
RNA,regulation of transcription,C3H zinc	A13955980	zinc finger (CCC-type) family protein similar to CZF	protein.folding	A13918190	chaperonin, putative similar to T-complex protein 1 e
RNA,regulation of transcription,CCAAT b	A13912480	transcription factor, putative similar to repressor pro	protein.posttranslational modification	A14919110	protein kinase, putative similar to protein kinase, pu
RNA,regulation of transcription,OPP(Zn),C	A13922760	SOL1 (TSO1-Like); transcription factor CXC domain	protein.posttranslational modification	A15947080	CKB1 (casein kinase II beta chain 1); protein kinase
RNA,regulation of transcription,Histone ac	A15909740	histone acetyltransferase, putative identical to Proba	protein.posttranslational modification	A15943320	CKL8 (Casein Kinase Like 8); casein kinase I/kinase
RNA,regulation of transcription,IMADS bo	A11977080	MADS domain protein - flowering regulator that is clic	protein.posttranslational modification	A15903730	CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1); kina
RNA,regulation of transcription,MYB dom	A12936890	ATMYB38/MYB38/RA-X2 (myb domain protein 38); D	protein.synthesis,initiation	A15940030	euukaryotic translation initiation factor SUJ1, putative
RNA,regulation of transcription,putative tr	A13949410	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	protein.synthesis,ribosomal protein,eukar	A15954760	similar to 60s acidic ribosomal protein P1, putative I/
RNA,regulation of transcription,unclassified	A13959080	asparlyl protease family protein similar to asparlyl p	protein.targeting,nucleus	A13949460	NITL (NIT-2-LIKE); protein transporter similar to NTF
RNA,regulation of transcription,unclassified	A15958430	ATEX070B1 (exocyst subunit EXO70 family protein	protein.targeting,secretory pathway,unsp	A1191570	SEC61 BETA (suppressors of secretion-defective 61
RNA,regulation of transcription,unclassified	A15959730	ATEX070H7 (EXOCYST SUBUNIT EXO70 FAMILY F	protein.targeting,secretory pathway,unsp	A12945070	signal recognition particle 14 kDa family protein / SR
RNA,regulation of transcription,unclassified	A11908690	ZIGA4 (ARF GAP-LIKE ZINC FINGER-CONTAINING	PS,lightreacction,photosystem II,LHC-II	A12943640	chlorophyll A-B binding family protein similar to LHC
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A15964810	WRKY51 (WRKY DNA-binding protein 51); transcrip	redox,ascorbate and glutathione	A11976570	B5 #1 (cytochrome b5 family protein #1); heme bindi
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A14931805	WRKY family transcription factor similar to myosin	redox,glutaredoxins	A13924170	ATGR1; glutathione-disulfide reductase Encodes a c
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A13956400	WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcrip	redox,glutaredoxins	A14933040	glutaredoxin family protein identical to Glutaredoxin-
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A14904450	WRKY42 (WRKY DNA-binding protein 42); transcrip	redox,glutaredoxins	A11908830	glutaredoxin family protein identical to Monothiol glu
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A14910610	WRKY18 (WRKY DNA-binding protein 18); transcrip	RNA,processing	A11980670	transducin family protein / WD-40 repeat family prote
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A14931800	RBP37 (RNA-BINDING PROTEIN 37); RNA binding f	RNA,processing	A15963120	ethylene-responsive DEAD box RNA helicase, putati
RNA,regulation of transcription,WRKY do	A14918375	KH domain-containing protein identical to Probable	RNA,processing,ribonucleases	A11927890	CCR4-NOT transcription complex protein, putative s
S-assimilation;-AKN	A14939940	AKN2 (AFS-KINASE 2); ATP binding / kinase/ trans	RNA,regulation of transcription,ABI3/VP1	A13911580	RNA-binding protein, putative similar to transcrip
secondary metabolism; flavonoids,anthoc	A15961160	AACT1 (ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANS	RNA,regulation of transcription,AP2/ERE	A11964380	AP2 domain-containing transcription factor, putative
secondary metabolism; flavonoids,anthoc	A15905600	oxidoreductase, 2OG-F6(II) oxygenase family protein	RNA,regulation of transcription,ARR	A11949190	ARR19 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
secondary metabolism; flavonoids,anthoc	A15939050	transferase family protein similar to transferase fami	RNA,regulation of transcription,bHLH,Bas	A14928800	transcription factor similar to transcription regulator

Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in Col0			Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in pad2		
Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description
secondary metabolism: flavonoids, dihydro	At4g01070	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family I	RNA, regulation of transcription; C2H2 zinc	At1g29570	zinc finger protein-related similar to unknown protein
secondary metabolism: N misc, alkaloid-like	At3g51450	strictosidine synthase family protein similar to YLS2	RNA, regulation of transcription; CCAAT box	At2g37060	CCAAT-box binding transcription factor, putative
secondary metabolism: phenylpropanoids	At5g10820	integral membrane transporter family protein similar	RNA, regulation of transcription; High mobility	At2g34450	high mobility group (HMGB1/2) family protein similar
secondary metabolism: phenylpropanoids	At3g21240	CL2 (4-coumarate:CoA ligase 2); 4-coumarate-CoA	RNA, regulation of transcription; PHO1	At3g19380	U-box domain-containing protein similar to U-box d
secondary metabolism: phenylpropanoids	At4g36220	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1); ferulate 5-	RNA, regulation of transcription; Trihelix, T	At2g38250	DNA-binding protein-related similar to transcription f
signalling: calcium	At3g63380	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-ty	RNA, regulation of transcription; unclassified	At1g07130	OB-fold nucleic acid binding domain-containing prote
signalling: calcium	At5g26920	calmodulin binding similar to calmodulin-binding pro	RNA, regulation of transcription; unclassified	At3g24680	zinc finger protein, putative similar to zinc finger pro
signalling: calcium	At4g33050	EDA39 (embryo sac development arrest 39); calmod	RNA, regulation of transcription; WRKY do	At1g13960	WRKY4 (WRKY DNA-binding protein 4); transcriptio
signalling: calcium	At4g37640	ACA2 (CALCIUM ATPASE 2); calmodulin binding Ef	RNA, RNA binding	At5g59860	RNA recognition motif (RRM)-containing protein, sim
signalling: calcium	At4g20780	calcium-binding EF hand family protein similar to PE	S-assimilation; AKN	At2g14750	APK (AP5 KINASE); ATP binding / kinase/ transfer
signalling: calcium	At4g27280	calcium-binding EF hand family protein similar to PE	secondary metabolism: flavonoids, anthoc	At5g39090	transferase family protein similar to transferase fami
signalling: calcium	At1g18530	calmodulin, putative similar to calmodulin, putative I	secondary metabolism: flavonoids, flavonol	At2g36790	UGT73C6 (UDP-glucosyl transferase 73C6); UDP-gluc
signalling: calcium	At1g56340	CRT1 (CALRETTICULIN 1); calcium ion binding Encod	secondary metabolism: phenylpropanoids	At4g36220	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1); ferulate 5-
signalling: G-proteins	At5g47960	SMG1 (SMALL MOLECULAR WEIGHT G-PROTEIN	secondary metabolism: wax	At1g02190	CER1 protein, putative similar to CER1 protein, puta
signalling: G-proteins	At5g4780	RAB GTPase activator similar to RAB GTPase activ	secondary metabolism: wax	At5g55380	membrane bound O-acyl transferase (MBOAT) fami
signalling: G-proteins	At1g09630	ATRA11C (ARABIDOPSIS RAB GTPase HOMOL	signalling: calcium	At3g63380	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-ty
signalling: G-proteins	At3g62090	PIL2 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-L	signalling: calcium	At4g27280	calcium-binding EF hand family protein similar to PE
signalling: MAP kinases	At1g73500	ATMKK9 (Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 9	signalling: calcium	At1g50700	calcium-binding EF hand family protein similar to PE
signalling: MAP kinases	At1g01560	ATWPK11 (Arabidopsis thaliana MAP kinase 11); M	signalling: G-proteins	At1g28550	ARAB11 (Arabidopsis Rab GTPase homolog A11);
signalling: MAP kinases	At1g53570	MAP3KA (Mitogen-activated protein kinase kinase k	signalling: G-proteins	At4g02730	transducin family protein / WD-40 repeat family prote
signalling: receptor kinases; DUF 26	At4g21400	protein kinase family protein similar to protein kinase	signalling: light	At2g27440	pseudogene of rac GTPase activating protein
signalling: receptor kinases; DUF 26	At4g11890	protein kinase family protein similar to EMB1290 (E	signalling: light	At1g25540	PF11 (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1)
signalling: receptor kinases; leucine rich re	At4g11530	leucine-rich repeat family protein / protein kinase fan	signalling: light	At3g49970	phototropic-responsive protein, putative similar to sic
signalling: receptor kinases; leucine rich re	At4g30520	leucine-rich repeat family protein / protein kinase fan	signalling: light	At1g14720	ATMPK19 (Arabidopsis thaliana MAP kinase 19); M
signalling: receptor kinases; leucine rich re	At5g25930	leucine-rich repeat family protein / protein kinase fan	signalling: light	At1g73500	ATMKK9 (Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 9
signalling: receptor kinases; lysine motif	At3g21630	protein kinase family protein similar to protein kinase	signalling: MAP kinases	At4g04500	protein kinase family protein similar to protein kinase 9
signalling: receptor kinases; DUF 26	At3g22060	receptor protein kinase-related contains Pfam profile	signalling: receptor kinases; wall associat	At1g16160	WAK15 (WALL ASSOCIATED KINASE-LIKE 5); kin
signalling: receptor kinases; DUF 26	At1g79670	RFO1 (RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM	signalling: receptor kinases; wall associat	At4g31110	kinase identical to Wall-associated receptor kinase
stress	At3g10980	SAG20 (WOUND-INDUCED PROTEIN 12) A senesc	stress: abiotic; drought/salt	At3g25760	AOCT1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1) encodes allen
stress	At4g00860	ATOZ1 (Arabidopsis thaliana ozone-induced protein	stress: abiotic; drought/salt	At1g14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing prot
stress: abiotic; drought/salt	At5g04060	dehydration-responsive protein-related similar to def	stress: abiotic; heat	At1g17240	leucine-rich repeat family protein similar to leucine-r
stress: abiotic; heat	At5g22060	ATJ2 (Arabidopsis thaliana DnaJ homologue 2) Co-c	stress: abiotic; heat	At2g14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1) PR1 ge
stress: abiotic; heat	At5g28540	luminal binding protein 1 (BIP-1) (BIP1) identical to L	stress: biotic; PR-proteins	At5g41750	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), put
stress: abiotic; heat	At3g13310	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing prot	stress: biotic; PR-proteins	At1g52900	disease resistance protein (TIR class), putative simi
stress: abiotic; touch/wounding	At3g10985	wound-responsive protein-related similar to unknow	stress: biotic; PR-proteins	At3g05370	disease resistance family protein similar to disease
stress: biotic	At2g14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1) PR1 ge	stress: biotic; PR-proteins, plant defensins	At5g33355	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein, simi
stress: biotic	At5g04720	ADR1-L2 (ADR1-LIKE 2); ATP binding / nucleoside-t	stress: biotic; receptors	At1g65390	ATPP2-A5; transmembrane receptor similar to trans
stress: biotic	At3g28940	avirulence-responsive protein, putative / avirulence in	TCA / org. transformation; TCA; pyruvate D	At1g67240	LPD2 (LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 2); FAD bir
stress: biotic; PR-proteins	At1g66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	TCA / org. transformation; TCA; succinyl-Co	At5g08300	succinyl-CoA ligase (GDP-forming) alpha-chain, mitc
stress: biotic; PR-proteins	At1g56807	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), put	transport; ABC transporters and multidrug	At4g28620	ATM2 (Arabidopsis thaliana ABC transporter of the r
TCA / org. transformation; other organic at	At3g09810	isocitrate dehydrogenase, putative / NAD+ isocitrate	transport; cyclic nucleotide or calcium reg	At2g46430	ATCNCG3 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNE
TCA / org. transformation; TCA; succinyl-Co	At5g08300	succinyl-CoA ligase (GDP-forming) alpha-chain, mitc	transport; metal	At3g46300	high-affinity nickel-transport family protein similar to
tetrapyrrole synthesis; ferrochelatase	At5g26030	ferrochelatase 1 identical to Ferrochelatase-1, chlor	transport; misc	At1g56340	ZF14; transporter similar to MATE efflux protein-rela
transport; amino acids	At3g11900	ANT1 (AROMATIC AND NEUTRAL TRANSPORTER	transport; misc	At1g79360	aminomethyltransferase similar to organic cation transp
transport; metabolite transporters at the m	At5g01500	heavy-metal-associated domain-containing protein s	amino acid metabolism; degradation; senin	At1g11860	aminomethyltransferase, putative identical to Amino
transport; metal	At5g03380	MYE1 (MYOELININ-1) MYOELININ-1 domain-containi	amino acid metabolism; synthesis; asparta	At5g14060	CARAB-AK-LYS (Lysine-sensitive aspartate kinase)
transport; misc	At3g23550	MATE efflux family protein similar to ALF5 (ABERR	cell wall; modification	At5g65730	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xylog
transport; misc	At1g61250	SC3 (SECRETORY CARRIER 3); carrier Encodes a	cell wall; modification	At2g06850	EXGT-A1 (ENDO-XYLOGLUCAN TRANSFERASE);
transport; misc	At5g54860	integral membrane transporter family protein similar	cell wall; pectin esterases; misc	At4g33220	pectinesterase family protein similar to pectinestera
transport; nucleotides	At1g57990	ATPUP18 (Arabidopsis thaliana purine permease 18	cell; organisation	At2g31200	ADF6 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 6); actin

Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in <i>Col0</i>		Genes significantly regulated by <i>P. brassicae</i> in <i>pad2</i>	
Functional category	TAIR locus identifier	Functional category	TAIR locus identifier
transport, peptides and oligopeptides	A15g62680	glycolysis, glyceroldehyde 3-phosphate dehydrogenase	A1g13440
transport, sugars, sucrose	A1g171880	hormone metabolism, auxin, induced-regul	A1g303810
amino acid metabolism, degradation, serin	A1g111860	hormone metabolism, brassinosteroid syn	A15g05690
amino acid metabolism, synthesis, glutam	A1g39890	lipid metabolism, FA synthesis and FA elc	A1g25050
cell wall modification	A1g403210	lipid metabolism, lipid degradation, lipase	A1g242690
cell organisation	A15g15970	lipid metabolism, lipid transfer proteins etc	A1g27990
development, unspecified	A1g26370	misc. cytochrome P450	A1g33370
DNA repair	A1g20475	misc. invertase/pectin methyl/esterase inh	A15g62350
DNA, synthesis/chromatin structure	A15g04130	misc. nitrilases, nitrile lyases, berberine	A1g22330
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A1g35270	misc. protease inhibitor/seed storage/lipid	A1g212500
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A15g08330	not assigned, no ontology	A15g11110
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A1g34750	not assigned, no ontology	A15g48545
hormone metabolism, auxin, induced-regul	A1g34790	not assigned, no ontology	A1g247400
hormone metabolism, ethylene, induced-re	A15g18020	not assigned, no ontology	A1g232600
lipid metabolism, lipid transfer proteins etc	A1g362550	not assigned, no ontology	A1g64720
major CHO metabolism, degradation, sucro	A1g27950	integral membrane family protein similar to	A1g35760
misc. GCN5-related N-acetyltransferase	A1g231390	not assigned, no ontology	A1g12420
misc. peroxidases	A1g39000	not assigned, no ontology, C2 domain-cont	A1g01200
misc. rhodanese	A15g64120	not assigned, unknown	A1g321400
not assigned, no ontology	A1g15800	not assigned, unknown	A15g45020
not assigned, no ontology	A1g217740	not assigned, unknown	A1g16240
not assigned, no ontology	A1g22170	not assigned, unknown	A15g11890
not assigned, no ontology	A1g07060	not assigned, unknown	A1g307460
not assigned, no ontology, pentatricopep	A15g22640	not assigned, unknown	A1g73885
not assigned, no ontology	A1g36680	not assigned, unknown	A1g23560
not assigned, no ontology, unknown	A1g32900	not assigned, unknown	A1g25460
not assigned, unknown	A1g37300	not assigned, unknown	A1g22890
not assigned, unknown	A1g16410	not assigned, unknown	A15g44650
not assigned, unknown	A1g35850	not assigned, unknown	A15g44575
not assigned, unknown	A1g33666	protein assembly and cofactor ligatio	A1g54500
not assigned, unknown	A15g39530	protein, folding	A15g06130
not assigned, unknown	A15g41050	protein, synthesis, elongation	A1g20360
not assigned, unknown	A1g38820	PS, calvin cycle, rubisco small subunit	A15g38430
not assigned, unknown	A1g65230	PS, lightreacation, other electron carrier (ox	A1g60950
not assigned, unknown	A1g242870	PS, lightreacation, other electron carrier (ox	A1g20340
not assigned, unknown	A1g37300	PS, lightreacation, photosystem II, LH-C-II	A1g308940
not assigned, unknown	A1g18370	PS, lightreacation, photosystem II, LH-C-II	A15g54270
protein, degradation	A1g23390	PS, lightreacation, photosystem II, PSII poly	A1g410340
protein, folding	A1g75690	PS, lightreacation, photosystem II, PSII poly	A1g67740
protein, posttranslational modification	A15g06130	PS, photorespiration, photosynghycolate ph	A15g63790
protein, synthesis, ribosomal protein, proka	A15g24940	redox, ascorbate and glutathione, ascorba	A1g09010
PS, lightreacation, other electron carrier (ox	A1g20340	RNA, processing	A1g37040
PS, lightreacation, photosystem II, PSII poly	A1g14150	RNA, processing RNA helicase	A15g60530
RNA, regulation of transcription, SE T-dom	A1g04050	RNA, regulation of transcription, C2C2(Zn)	A1g307650
RNA, regulation of transcription, Transcript	A15g67480	RNA, regulation of transcription, C2C2(Zn)	A15g60530
RNA, regulation of transcription, unclassified	A1g09750	RNA, regulation of transcription, putative tr	A1g1902150
		RNA, regulation of transcription, unclassified	A15g53460
		secondary metabolism, N misc. alkaloid-lig	A1g351420

Genes significantly regulated by *P. brassicae* in *Colo*

Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Colo Pb/ctr	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	pad2 Pb/ctr
RNA regulation of transcription, unclassified	A15g33340	CDR1 (CONSTITUTIVE DISEASE RESISTANCE 1); WRKY3 (WRKY DNA-binding protein 3); transcriptio	-2.0	secondary metabolism, phenylpropanoids	A13g19450	CAD4 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE	-6.6
RNA regulation of transcription, WRKY do	A12g03340	WRKY3 (WRKY DNA-binding protein 3); transcriptio	-2.6	signalling, receptor kinases, DJF 26	A14g23210	protein kinase family protein similar to protein kinas	-2.2
signalling, calcium	A13g49260	IQD21 (IQ-domain 21); calmodulin binding similar to	-12.7	signalling, receptor kinases, leucine rich re	A11g53730	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, p	-3.3
signalling, G-proteins	A12g38840	guanylate-binding family protein similar to GTP bind	-20.1	stress, abiotic, cold	A12g15970	COR413-PM1 (cold regulated 413 plasma membran	-3.4
stress, abiotic, cold	A12g15970	COR413-PM1 (cold regulated 413 plasma membran	-2.9	stress, abiotic, drought/salt	A15g25610	RD22 (RESPONSIVE TO DESSICATION 22) respon	-9.1
stress, abiotic, drought/salt	A13g05880	RC2A (RARE-COLD-INDUCIBLE 2A) Induced by low	-3.1	stress, abiotic, unspecified	A14g23670	major latex protein-related / MLP-related similar to r	-3.0
stress, abiotic, drought/salt	A14g30660	hydrophobic protein, putative / low temperature and s	-3.8	stress, abiotic, unspecified	A11g72610	GLP1 (GERMIN-LIKE PROTEIN 1); manganese ion	-15.3
stress, abiotic, drought/salt	A14g30650	hydrophobic protein, putative / low temperature and s	-12.1	stress, biotic	A12g02100	LCR69/PDF2.2 (Low-molecular-weight cysteine-rich	-2.9
TCA / org. transformation, carbonic anhyd	A11g70410	carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratas	-2.2	stress, biotic, PR-proteins	A12g26380	disease resistance protein-related / LRR protein-rela	-2.0
tetrapyrrole synthesis, glu-tRNA reductas	A11g58290	HEMA1; glutamyl-tRNA reductase Encodes a protei	-7.4	tetrapyrrole synthesis, magnesium chelate	A15g13630	GUNS (GENOMES UNCOUPLED 5) Encodes magn	-5.9
tetrapyrrole synthesis, WRKY do	A14g18480	CHL1 (CHLORINA 42); magnesium chelatae Encod	-3.4	tetrapyrrole synthesis, protochlorophyllide	A14g27440	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCT	-7.5
tetrapyrrole synthesis, magnesium chelate	A14g27440	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCT	-2.4				
tetrapyrrole synthesis, protochlorophyllide	A14g23400	PIP1; 5/PIP1D (plasma membrane intrinsic protein 1;	-2.5				
transport, Major Intrinsic Proteins, PIP	A14g35100	PIP3 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 3;	-3.7				
transport, Major Intrinsic Proteins, PIP	A14g00430	TMP-C (plasma membrane intrinsic protein 1,4); wat	-3.7				

Genes significantly regulated by *P. brassicae* in both *Colo* and *pad2*

Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Colo Pb/ctr	Functional category	TAIR locus identifier	TAIR8 Description	Colo Pb/ctr	pad2 Pb/ctr
signalling, calcium	A13g63380	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-ty	78.1	secondary metabolism, phenylpropanoids	A13g19450	CAD4 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE	30.6	-6.6
not assigned, no ontology	A14g21850	methionine sulfoxide reductase domain-containing pr	36.4	signalling, receptor kinases, DJF 26	A14g23210	protein kinase family protein similar to protein kinas	25.2	-2.2
stress, biotic	A12g14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1) PR1 ge	12.7	signalling, receptor kinases, leucine rich re	A11g53730	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, p	2.0	-3.3
not assigned, no ontology	A11g74100	sulfotransferase family protein similar to sulfotransf	10.4	stress, abiotic, cold	A12g15970	COR413-PM1 (cold regulated 413 plasma membran	11.1	-3.4
not assigned, no ontology	A13g01290	band 7 family protein similar to band 7 family protei	8.2	stress, abiotic, drought/salt	A15g25610	RD22 (RESPONSIVE TO DESSICATION 22) respon	5.7	-9.1
signalling, calcium	A14g27280	calcium-binding EF hand family protein similar to Pf	7.4	stress, abiotic, unspecified	A14g23670	major latex protein-related / MLP-related similar to r	9.9	-3.0
hormone metabolism, ethylene, signal tran	A13g15210	ATERF-4/ATERF4/ERF4/RAP2.5 (ETHYLENE RESI	6.6	stress, biotic	A12g02100	LCR69/PDF2.2 (Low-molecular-weight cysteine-rich	8.8	-2.9
not assigned, no ontology	A15g11650	hydrolase, alpha/beta fold family protein similar to h	6.0	stress, biotic, PR-proteins	A12g26380	disease resistance protein-related / LRR protein-rela	4.1	-2.0
secondary metabolism, phenylpropanoids	A14g36220	FAH1 (FERULATE-5-HYDROXYLASE 1); ferulate 5-h	5.5	tetrapyrrole synthesis, magnesium chelate	A15g13630	GUNS (GENOMES UNCOUPLED 5) Encodes magn	4.7	-5.9
not assigned, unknown	A12g40095	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	5.5	tetrapyrrole synthesis, protochlorophyllide	A14g27440	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCT	13.4	-7.5
signalling, MAP kinases	A12g41230	similar to ARL (ARGOS-LIKE) [Arabidopsis thaliana]	5.2				8.6	
TCA / org. transformation, TCA, succinyl-C	A11g73500	ATMKK9 (Arabidopsis thaliana MAP kinase kinase 9	4.6				4.4	
protein, degradation	A15g08300	succinyl-CoA ligase (GDP-forming) alpha-chain, mit	4.6				5.2	
nucleotide metabolism, degradation	A14g30920	cytosol aminopeptidase family protein identical to L	4.2				3.6	
misc, peroxidases	A15g64370	BETA-UP (BETA-UREIDOPROPIONASE); beta-ureic	4.1				3.3	
misc, oxidases - copper, flavone etc.	A11g33860	peroxidase family protein similar to APX1 (ASCORE	3.8				3.5	
not assigned, no ontology, BSD domain-co	A14g13110	BSD domain-containing protein similar to BSD dom	3.6				6.0	
nucleotide metabolism, phosphotransfer a	A15g18900	oxidoreductase, ZOG-Fe(II) oxygenase family protei	2.9				2.3	
not assigned, no ontology	A15g26667	uridylyate kinase / uridine monophosphate kinase / U	2.6				2.6	
development, unspecified	A14g03410	peroxisomal membrane protein-related similar to per	2.4				2.6	
not assigned, unknown	A15g50670	squamosa promoter-binding protein, putative. Identic	2.4				2.8	
PS, lightreaction, other electron carrier (ox	A11g24267	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TA	2.1				2.1	
amino acid metabolism, degradation, sefin	A11g20340	DRT112 (DNA-damage-repair/tolerance protein 112);	-2.0				-4.7	
lipid metabolism, lipid transfer, proteins etc	A11g11860	aminomethyltransferase, putative. Identical to Amino	-2.0				-5.0	
tetrapyrrole synthesis, protochlorophyllide	A11g27950	lipid transfer protein-related. Identical to Uncharact	-2.1				-2.1	
stress, abiotic, cold	A14g27440	PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCT	-2.4				-7.5	
protein, folding	A12g15970	COR413-PM1 (cold regulated 413 plasma membran	-2.9				-3.4	
	A15g06130	chaperone protein dnaJ-related similar to unknown f	-3.9				-6.7	

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahn, I-P., Kim, S., Lee, Y-H. and Suh, S-C (2007) Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143** (2): 838-848.

Alamillo, JM. and Garcia-Olmedo, F (2001) Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* **25** (5): 529-540.

Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S. and Berkowitz, GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis cyclic nucleotide gated channel2 and innate immunity. *Plant Cell.* **19** (3): 1081-1095.

Allen, DG., Blinks, JR. and Prendergast, FG (1977) Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration-a calcium-independent component. *Science.* **195** (4282): 996-998.

Alpert, M (2005) The diverse benefits of glutathione: a key antioxidant for reversing chronic illness. *Alternative and Complementary Therapies.* **11** (5): 241-245.

Apel, K. and Hirt, H (2004) Reactive Oxygen Species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55** (1): 373-399.

Apontowiel, P. and Berends, W (1975) Mapping of *gshA*, a gene for the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* **141** (2): 91-95.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, MR., Chiu, W-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, FM. and Sheen, J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature.* **415** (6875): 977-983.

Aziz, A., Heyraud, A. and Lambert, B (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta.* **218** (5): 767-774.

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, JM. and Pugin, A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact.* **16** (12): 1118-1128.

Ball, L., Accotto, G-P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S. and Mullineaux, PM (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* **16** (9): 2448-2462.

Ballatori, N., Krance, SM., Marchan, R. and Hammond, CL (2009) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med.* **30** (1-2): 13-28.

Bari, R. and Jones, JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* **69** (4): 473-488.

- Bashandy, T., Guilleminot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y. and Reichheld, J-P** (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell*. **22** (2): 376-391.
- Bechinger, C., Giebel, K-F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, HB. and Bastmeyer, M** (1999) Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*. **285** (5435): 1896-1899.
- Becker, K., Gui, M. and Schirmer, RH** (1995) Inhibition of human glutathione-reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur J Biochem*. **234** (2): 472-478.
- Becker, K., Savvides, SN., Keese, M., Schirmer, RH. and Karplus, PA** (1998) Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nature Structural Biology*. **5** (4): 267-271.
- Beckers, GJM., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, WR., He, SY., Zhang, S. and Conrath, U** (2009) Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. **21** (3): 944-953.
- Bent, AF., Innes, RW., Ecker, JR. and Staskawicz, BJ** (1992) Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent pseudomonas and Xanthomonas pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact*. **5** (5): 372-378.
- Bergelson, J., Dwyer, G. and Emerson, JJ** (2001) Models and data on plant-enemy coevolution. *Annu Rev Genet*. **35** (1): 469-499.
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. and Wendehenne, D** (2008) Nitric oxide in plants: Production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Molecular Plant*. **1** (2): 218-228.
- Beutler, E., Gelbart, T., Kondo, T. and Matsunaga, AT** (1999) The molecular basis of a case of gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood*. **94** (8): 2890-2894.
- Bindschedler, LV., Dewdney, J., Blee, KA., Stone, JM., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, DR., Ausubel, FM. and Bolwell, GP** (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J*. **47** (6): 851-863.
- Binet, MN., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M. and Pugin, A** (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol*. **125** (2): 564-572.
- Boller, T** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann Rev Plant Phy Plant Mol Biol*. **46** (1): 189-214.
- Boller, T** (2005) Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Curr Opin Cell Biol*. **17** (2): 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. *Annu Rev Plant Biol*. **60**: 379-406.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Lipton, SA** (1995) Apoptosis and necrosis - 2 distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with n-methyl-d-aspartate or nitric-oxide superoxide in cortical cell-cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92** (16): 7162-7166.

- Bouche, N. and Fromm, H** (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* **9** (3): 110-115.
- Bradford, MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- Broekaert, WF. and Peumans, WJ** (1988) Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. *Physiol plantarum.* **74** (4): 740-744.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, JJ., 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 J.* **21** (24): 6681-6688.
- Cairns, NG., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, CS. and Meyer, AJ** (2006) Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.* **141** (2): 446-455.
- Chang, C-W., Moseley, JL., Wykoff, D. and Grossman, AR** (2005) The *LPB1* gene is important for acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to phosphorus and sulfur deprivation. *Plant Physiol.* **138** (1): 319-329.
- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, HJ., Metraux, JP. and Lamotte, O** (2008) Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against Botrytis infection. *Plant J.* **55** (4): 555-567.
- Cheng, N-H. and Hirschi, KD** (2003) Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1. *J Biol Chem.* **278** (8): 6503-6509.
- Chisholm, ST., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, BJ** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* **124** (4): 803-814.
- Choi, HW., Kim, YJ., Lee, SC., Hong, JK. and Hwang, BK** (2007) Hydrogen peroxide generation by the Pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* **145** (3): 890-904.
- Ciechanover, A** (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6** (1): 79-87.
- Clay, NK., Adio, AM., Denoux, C., Jander, G. and Ausubel, FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science.* **323** (5910): 95-101.
- Clough, SJ. and Bent, AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** (6): 735-743.
- Clough, SJ., Fengler, KA., Yu, Ic., Lippok, B., Smith, RK. and Bent, AF** (2000) The Arabidopsis *dnd1* (defense, no death) gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97** (16): 9323-9328.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol.* **53** (1): 159-182.
- Cobbett, CS** (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol.* **3** (3): 211-216.

- Cobbett, CS., May, MJ., Howden, R. and Rolls, B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J.* **16** (1): 73-78.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mösinger, E. and Fluhr, R** (1994) β -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **104**: 59-66.
- Cohen, Y., Reuveni, M. and Baider, A** (1999) Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *Eur J Plant Pathol.* **105** (4): 351-361.
- Cohen, Y., Rubin, AE. and Kilfin, G** (2010) Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-beta-amino-butyric acid (BABA). *Eur J Plant Pathol.* **126** (4): 553-573.
- Colcombet, J. and Hirt, H** (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* **413** (2): 217-226.
- Conklin, PL., Williams, EH. and Last, RL** (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93** (18): 9970-9974.
- Conrath, U., Pieterse, CMJ. and Mauch-Mani, B** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7** (5): 210-216.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. and Kohler, A** (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur J Plant Pathol.* **107** (1): 113-119.
- Cordier, C., Pozo, MJ., Barea, JM., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V** (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant-Microbe Interact.* **11** (10): 1017-1028.
- Cotgreave, IA. and Gerdes, RG** (1998) Recent trends in glutathione biochemistry: glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun.* **242** (1): 1-9.
- Coutos-Thevenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. and Boulay, M** (2001) In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot.* **52** (358): 901-910.
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A. and Mullineaux, P** (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell.* **11** (7): 1277-1292.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, YB. and Mullineaux, P** (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione-reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* **8** (2): 167-175.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A. and Bourque, S** (2009) Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem J.* **418**: 191-200.

- Dalle-Donne, I., Milzani, A., Gagliano, N., Colombo, R., Giustarini, D. and Rossi, R** (2008) Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Sign.* **10** (3): 445-473.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R. and Milzani, A** (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* **43** (6): 883-898.
- Dangl, JL., Dietrich, RA. and Richberg, MH** (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell.* **8** (10): 1793-1807.
- Dangl, JL. and Jones, JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411** (6839): 826-833.
- Dat, JF., Foyer, CH. and Scott, IM** (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* **118** (4): 1455-1461.
- Davis, KR. and Hahlbrock, K** (1987) Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.* **84** (4): 1286-1290.
- De Gara, L., de Pinto, MC. and Tommasi, F** (2003) The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol Biochem.* **41** (10): 863-870.
- De Lorenzo, G. and Ferrari, S** (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol.* **5** (4): 295-299.
- De Pinto, MC., Tommasi, F. and De Gara, L** (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol.* **130** (2): 698-708.
- De Vos, M., Van Oosten, VR., Van Poecke, RMP., Van Pelt, JA., Pozo, MJ., Mueller, MJ., Buchala, AJ., Mettraux, JP., Van Loon, LC., Dicke, M. and Pieterse, CMJ** (2005) Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant-Microbe Interact.* **18** (9): 923-937.
- De Vos, M., Van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, JP., Dicke, M., Van Loon, LC. and Pieterse, CMJ** (2006) Herbivore-Induced Resistance against Microbial Pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **142** (1): 352-363.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. and Lamb, C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (23): 13454-13459.
- Dennison, KL. and Spalding, EP** (2000) Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **124** (4): 1511-1514.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. and Fobert, PR** (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell.* **15** (9): 2181-2191.
- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. and Fobert, PR** (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell.* **12** (2): 279-290.

- Dikic, I., Wakatsuki, S. and Walters, KJ** (2009) Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10** (10): 659-671.
- Dixon, DP., Cummins, I., Cole, DJ. and Edwards, R** (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **1** (3): 258-266.
- Dixon, DP., Skipsey, M., Grundy, NM. and Edwards, R** (2005) Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **138** (4): 2233-2244.
- Dixon, RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature.* **411** (6839): 843-847.
- Dodd, AN., Kudla, Jr. and Sanders, D** (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol.* **61** (1): 593-620.
- Droge, W** (2006) Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **9** (3): 190-195.
- Durrant, WE. and Dong, X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* **42**: 185-209.
- Edwards, R., Dixon, DP. and Walbot, V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5** (5): 193-198.
- Engelberth, J., Alborn, HT., Schmelz, EA. and Tumlinson, JH** (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101** (6): 1781-1785.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, MA. and Cooper, RM** (2008) Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: Structure and activity. *Chem Biol.* **15** (5): 438-448.
- Eschen-Lippold, L., Altmann, S. and Rosahl, S** (2010) Beta-aminobutyric acid induced resistance of potato against *Phytophthora infestans* requires salicylic acid but not oxylipins. *Mol Plant-Microbe Interact.* **23** (5): 585-592.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B-W., Wang, Y., Pallas, JA. and Loake, GJ** (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102** (22): 8054-8059.
- Felix, G. and Boller, T** (2003) Molecular sensing of bacteria in plants - The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem.* **278** (8): 6201-6208.
- Felix, G., Duran, JD., Volko, S. and Boller, T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18** (3): 265-276.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, FM. and Dewdney, J** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires Phytoalexin Deficient3. *Plant Physiol.* **144** (1): 367-379.
- Ferrari, S., Plotnikova, JM., De Lorenzo, G. and Ausubel, FM** (2003) Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* **35** (2): 193-205.
- Ferry, N., Edwards, MG., Gatehouse, JA. and Gatehouse, AM** (2004) Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr Opin Biotech.* **15** (2): 155-161.

- Flor, HH** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol.* **9**: 275-296.
- Flors, V., Ton, J., van Doorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P. and Mauch-Mani, B** (2008) Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **54** (1): 81-92.
- Foyer, CH. and Halliwell, B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta.* **133** (1): 21-25.
- Foyer, CH. and Noctor, G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* **17** (7): 1866-1875.
- Foyer, CH. and Noctor, G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Sign.* **11** (4): 861-905.
- Francia, D., Demaria, D., Calderini, O., Ferraris, L., Valentino, D., Arcioni, S., Tamietti, G. and Cardinale, F** (2007) Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. *Plant Cell Environ.* **30**: 1357-1365.
- Franklin, CC., Backos, DS., Mohar, I., White, CC., Forman, HJ. and Kavanagh, TJ** (2009) Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* **30** (1-2): 86-98.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Jiménez, MJH., Van de Sype, G., Gilabert, A. and Puppo, A** (2005) Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact.* **18** (3): 254-259.
- Friguet, B** (2006) Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* **580** (12): 2910-2916.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, FM., De Lorenzo, G. and Ferrari, S** (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **148** (3): 1695-1706.
- Gamborg, OL., Miller, RA and Ojima, K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research.* **50** (1): 151-158.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. and Pugin, A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact.* **19** (7): 711-724.
- Gauthier, A** (2009) *Thèse*. Comparaison de différents éliciteurs des réactions de défense de la vigne. Etude du mode d'action de la laminarine sulfatée, un inducteur de résistance à *P. viticola*. UMR INRA1088/CNRS5184/UB Plante-Microbe-Environnement Université de Bourgogne, Dijon
- Gauthier, A., Lamotte, O., Reboutier, D., Bouteau, F., Pugin, A. and Wendehenne, D** (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signaling Behav.* **2** (2): 86-95.
- Ghezzi, P., Bonetto, V. and Fratelli, M** (2005) Thiol-disulfide balance: From the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Sign.* **7** (7-8): 964-972.

- Glazebrook, J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **43** (1): 205-227.
- Glazebrook, J. and Ausubel, FM** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91** (19): 8955-8959.
- Glazebrook, J., Rogers, EE. and Ausubel, FM** (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics.* **143** (2): 973-982.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, EE., Crute, IR., Holub, EB., Hammerschmidt, R. and 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** (1): 381-392.
- Gohre, V. and Robatzek, S** (2008) Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.* **46**: 189-215.
- 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** (6): 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7** (6): 251-256.
- Gomez, LD., Noctor, G., Knight, MR. and Foyer, CH** (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J Exp Bot.* **55** (404): 1851-1859.
- Govrin, EM. and Levine, A** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol.* **10** (13): 751-757.
- Granado, J., Felix, G. and Boller, T** (1995) Perception of fungal sterols in plants - subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *Plant Physiol.* **107** (2): 485-490.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. and Mansfield, J** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **23** (4): 441-450.
- Greenberg, JT. and Yao, N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6** (3): 201-211.
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, ED., Rybin, V., Scheffzek, K. and Rausch, T** (2008) The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants. *Plant J.* **54** (6): 1063-1075.
- Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot.* **57** (3): 507-516.
- Guo, H. and Ecker, JR** (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol.* **7** (1): 40-49.
- Guo, J., Dai, X., Xu, W. and Ma, M** (2008) Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere.* **72** (7): 1020-1026.

- Gutjahr, C. and Paszkowski, U** (2009) Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Mol Plant-Microbe Interact.* **22** (7): 763-772.
- Hahn, MG., Darvill, AG. and Albersheim, P** (1981) Host-pathogen interactions . The endogenous elicitor, a fragment of a plant-cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* **68** (5): 1161-1169.
- Halkier, BA. and Gershenzon, J** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol.* **57**: 303-333.
- Hamiduzzaman, MM., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, JM. and Mauch-Mani, B** (2005) Beta-aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant-Microbe Interact.* **18** (8): 819-829.
- Hammerschmidt, R** (1999) Phytoalexins : What have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol.* **37** (1): 285-306.
- Hann, DR. and Rathjen, JP** (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **49** (4): 607-618.
- Hanson, GT., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, RA., Tsien, RY. and Remington, SJ** (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem.* **279** (13): 13044-13053.
- Hayashi, F., Smith, KD., Ozinsky, A., Hawn, TR., Yi, EC., Goodlett, DR., Eng, JK., Akira, S., Underhill, DM. and Aderem, A** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* **410** (6832): 1099-1103.
- Hayes, MP., Enterline, JC., Gerrard, TL. and Zoon, KC** (1991) Regulation of interferon production by human monocytes: requirements for priming for lipopolysaccharide-induced production. *J Leukoc Biol.* **50** (2): 176-181.
- Heath, MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol.* **44** (3): 321-334.
- Hérouart, D., Van Montagu, M. and Inzé, D** (1993) Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90** (7): 3108-3112.
- Herschbach, C., van der Zalm, E., Schneider, A., Jouanin, L., De Kok, LJ. and Rennenberg, H** (2000) Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing gamma-glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H₂S. *Plant Physiol.* **124** (1): 461-474.
- Hess, DT., Matsumoto, A., Kim, S-O., Marshall, HE. and Stamler, JS** (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6** (2): 150-166.
- Hicks, LM., Cahoon, RE., Bonner, ER., Rivard, RS., Sheffield, J. and Jez, JM** (2007) Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **19** (8): 2653-2661.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, DI., Jones, JDG. and Mundy, J** (2007) Inducible cell death in plant immunity. *Semin Cancer Biol.* **17** (2): 166-187.

- Hothorn, M., Wachter, A., Gromes, R., Stuwe, T., Rausch, T. and Scheffzek, K** (2006) Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *J Biol Chem.* **281** (37): 27557-27565.
- Howden, R., Andersen, CR., Goldsbrough, PB. and Cobbett, CS** (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107** (4): 1067-1073.
- Huber, SC. and Hardin, SC** (2004) Numerous posttranslational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. *Curr Opin Plant Biol.* **7** (3): 318-322.
- Huckelhoven, R** (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol.* **45**: 101-127.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, CA** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103** (26): 10098-10103.
- Hugouvieux, V., Dutilleul, C., Jourdain, A., Reynaud, F., Lopez, V. and Bourguignon, J** (2009) *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol.* **151** (2): 768-781.
- Iriti, M. and Faoro, F** (2007) Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia.* **164** (2): 57-64.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94** (9): 4800-4805.
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Mettraux, JP. and Mauch-Mani, B** (2001) Beta-aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur J Plant Pathol.* **107** (1): 29-37.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Mettraux, J-P. and Mauch-Mani, B** (2005) Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.* **139** (1): 267-274.
- Jez, JM., Cahoon, RE. and Chen, S** (2004) *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase. *J Biol Chem.* **279** (32): 33463-33470.
- Jia, Y., McAdams, SA., Bryan, GT., Hershey, HP. and Valent, B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J.* **19** (15): 4004-4014.
- Jones, JDG. and Dangl, JL** (2006) The plant immune system. *Nature.* **444** (7117): 323-329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103** (29): 11086-11091.
- Katz, V., Thulke, O. and Conrath, U** (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* **117** (4): 1333-1339.
- Kazan, K. and Manners, JM** (2008) Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* **146** (4): 1459-1468.

- Keller, T., Damude, HG., Werner, D., Doerner, P., Dixon, RA. and Lamb, C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^(phox) subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell*. **10** (2): 255-266.
- Kim, HS., Desveaux, D., Singer, AU., Patel, P., Sondek, J. and Dangl, JL** (2005) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102** (18): 6496-6501.
- Klapheck, S** (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol plantarum*. **74** (4): 727-732.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H** (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*. **19** (3): 1065-1080.
- Kunkel, BN. and Brooks, DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*. **5** (4): 325-331.
- 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** (12): 3496-3507.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, HP., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, BPHJ., Staskawicz, B., Jones, JDG. and Zipfel, C** (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotech*. **28** (4): 365-369.
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** (5259): 680-685.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*. **411** (6839): 848-853.
- Lamb, C. and Dixon, RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Phy Mol Biol*. **48** (1): 251-275.
- Lambeth, JD** (2004) Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. **4** (3): 181-189.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A. and Wendehenne, D** (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radic Biol Med*. **40** (8): 1369-1376.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-LeGrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D** (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol*. **135** (1): 516-529.
- Laquitaine, L., Gomes, E., Francois, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S. and Coutos-Thevenot, P** (2006) Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: Induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant-Microbe Interact*. **19** (10): 1103-1112.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A. and Pugin, A** (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J*. **15** (6): 773-781.

- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact.* **13** (8): 821-829.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R. and Pugin, A** (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium.* **38** (6): 527-538.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. and Pugin, A** (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell.* **14** (10): 2627-2641.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* **171** (2): 249-269.
- Leustek, T., Martin, MN., Bick, J-A. and Davies, JP** (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu Rev Plant Phy Plant Mol Biol.* **51** (1): 141-165.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* **79** (4): 583-593.
- Lherminier, J., Elmayan, T., Fromentin, J., Elaraqui, KT., Vesa, S., Morel, J., Verrier, J-L., Cailleteau, B., Blein, J-P. and Simon-Plas, F** (2009) NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Mol Plant-Microbe Interact.* **22** (7): 868-881.
- Li, Y., Dankher, OP., Carreira, L., Smith, AP. and Meagher, RB** (2006) The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiol.* **141** (1): 288-298.
- Livak, KJ. and Schmittgen, TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25** (4): 402-408.
- Lochman, J. and Mikes, V** (2006) Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Mol Biol.* **62** (1-2): 43-51.
- Lotze, MT., Zeh, HJ., Rubartelli, A., Sparvero, LJ., Amoscato, AA., Washburn, NR., DeVera, ME., Liang, X., Tor, M. and Billiar, T** (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* **220**: 60-81.
- Lu, H** (2009) Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signal Behav.* **4** (8): 713-717.
- Ma, W. and Berkowitz, GA** (2007) The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol.* **9** (11): 2571-2585.
- Mackey, D. and McFall, AJ** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol Microbiol.* **61** (6): 1365-1371.
- Mann, M. and Jensen, ON** (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotech.* **21** (3): 255-261.

- MAPK group** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7** (7): 301-308.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C. and Fernandez-Checa, JC** (2009) Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Sign.* **11** (11): 2685-2700.
- Markovic, J., Borrás, C., Ortega, A., Sastre, J., Vina, J. and Pallardo, FV** (2007) Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J Biol Chem.* **282** (28): 20416-20424.
- Martin, HL. and Teismann, P** (2009) Glutathione-a review on its role and significance in Parkinson's disease. *Faseb J.* **23** (10): 3263-3272.
- Marty, L., Siala, W., Schwarzländer, M., Fricker, MD., Wirtz, M., Sweetlove, LJ., Meyer, Y., Meyer, AJ., Reichheld, J-P. and Hell, R** (2009) The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106** (22): 9109-9114.
- Masip, L., Veeravalli, K. and Georgiou, G** (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Sign.* **8** (5-6): 753-762.
- Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, MD., O'Neill, M., Albersheim, P. and Darvill, A** (1991) Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J.* **1** (3): 333-343.
- Mauch-Mani, B. and Métraux, J-P** (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Ann Bot.* **82** (5): 535-540.
- Maughan, SC., Pasternak, M., Cairns, N., Kiddle, G., Brach, T., Jarvis, R., Haas, F., Nieuwland, J., Lim, B., Müller, C., Salcedo-Sora, E., Kruse, C., Orsel, M., Hell, R., Miller, AJ., Bray, P., Foyer, CH., Murray, JAH., Meyer, AJ. and Cobbett, CS** (2010) Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107** (5): 2331-2336.
- May, MJ., Hammond-Kosack, KE. and Jones, JDG** (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* **110** (4): 1367-1379.
- May, MJ. and Leaver, CJ** (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* **103** (2): 621-627.
- May, MJ. and Leaver, CJ** (1994) *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91** (21): 10059-10063.
- May, MJ., Vernoux, T., Sanchez-Fernandez, R., Van Montagu, M. and Inzé, D** (1998) Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (20): 12049-12054.
- Meister, A** (1973) On the enzymology of amino acid transport. *Science.* **180** (4081): 33-39.
- Meister, A. and Anderson, ME** (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem.* **52** (1): 711-760.
- Meister, A. and Lester, P** (1995) [3] Glutathione biosynthesis and its inhibition. In *Method Enzymol.* Vol. 252, pp 26-30.

Menard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Yvin, J-C. and Kauffmann, S (2004) beta-1,3 glucan sulfate, but not beta-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and Arabidopsis. *Plant Cell*. **16** (11): 3020-3032.

Menard, R., de Ruffray, P., Fritig, B., Yvin, JC. and Kauffmann, S (2005) Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated beta-1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. *Plant Cell Physiol*. **46** (12): 1964-1972.

Meuwly, P., Thibault, P. and Rauser, WE (1993) gamma-glutamylcysteinylglutamic acid-a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett*. **336** (3): 472-476.

Meyer, AJ (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol*. **165** (13): 1390-1403.

Meyer, AJ., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, JP. and Hell, R (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J*. **52** (5): 973-986.

Meyer, AJ. and Hell, R (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res*. **86** (3): 435-457.

Meyer, AJ., May, MJ. and Fricker, M (2001) Quantitative in vivo measurement of glutathione in Arabidopsis cells. *Plant J*. **27** (1): 67-78.

Meyers, BC., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*. **15** (4): 809-834.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Lancelin, JM., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G. and Lemaire, S (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102** (45): 16478-16483.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Lemaire, S (2006) Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res*. **89** (2): 225-245.

Moller, IM., Jensen, PE. and Hansson, A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol*. **58**: 459-481.

Montillet, J-L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J-P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. and Triantaphylides, C (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol*. **138** (3): 1516-1526.

Montillet, JL., Cacas, JL., Garnier, L., Montane, MH., Douki, T., Bessoule, JJ., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, JP., Vial, A. and Triantaphylides, C (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant J*. **40** (3): 439-451.

Moran, JF., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, MA., Rubio, MC., Clemente, MR., Brewin, NJ. and Becana, M (2000) Glutathione and homogluthathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiol*. **124** (3): 1381-1392.

Morris, J., Tian, H., Park, S., Sreevidya, CS., Ward, JM. and Hirschi, KD (2008) AtCCX3 is an Arabidopsis endomembrane H⁺-dependent K⁺ transporter. *Plant Physiol*. **148** (3): 1474-1486.

- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. **113** (7): 935-944.
- Mullineaux, P. and Rausch, T** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth Res*. **86** (3): 459-474.
- Mur, LA., Kenton, P., Lloyd, AJ., Ougham, H. and Prats, E** (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*. **59** (3): 501-520.
- Murashige, T. and Skoog, F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol plantarum*. **15** (3): 473-497.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, CJ., Glawischnig, E., Olsen, CE., Halkier, BA. and Glazebrook, J** (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell*. **19** (6): 2039-2052.
- Naton, B., Hahlbrock, K. and Schmelzer, E** (1996) Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol*. **112** (1): 433-444.
- Newman, MA., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, MJ. and Dow, JM** (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J*. **29** (4): 487-495.
- Nitsch, JP. and Nitsch, C** (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*. **163** (3862): 85-87.
- Noctor, G** (2006) Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ*. **29** (3): 409-425.
- Noctor, G. and Foyer, CH** (1998) Ascorbate and glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Phy Plant Mol Biol*. **49** (1): 249-279.
- Nürnbergger, T. and Brunner, F** (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*. **5** (4): 318-324.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*. **198**: 249-266.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, WR., Hahlbrock, K. and Scheel, D** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*. **78** (3): 449-460.
- Nürnbergger, T. and Scheel, D** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*. **6** (8): 372-379.
- Nuhse, TS., Bottrill, AR., Jones, AME. and Peck, SC** (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J*. **51** (5): 931-940.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M. and Kuchitsu, K** (2008) Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem*. **283** (14): 8885-8892.

- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K. and Oliver, DJ** (2008) A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **148** (3): 1603-1613.
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, AF., Xiang, C. and Oliver, DJ** (2007a) Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant J.* **49** (5): 865-877.
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C. and J. Oliver, D** (2007b) Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. *Plant J.* **49** (5): 878-888.
- Ortmann, I., Conrath, U. and Moerschbacher, BM** (2006) Exopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Lett.* **580** (18): 4491-4494.
- Palmieri, MC., Lindermayr, C., Bauwe, H., Steinhäuser, C. and Durner, J** (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol.* **152** (3): 1514-1528.
- Papavizas, GC. and Davey, CB** (1963) Effect of sulfur-containing amino compounds and related substances on aphanomyces root rot of peas. *Phytopathology.* **53** (1): 109-&.
- Pare, PW. and Tumlinson, JH** (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores *Plant Physiol.* **121** (2): 325-332.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J. and Mauch, F** (2007) Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *Plant J.* **49** (1): 159-172.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, CS. and Meyer, AJ** (2008) Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J.* **53** (6): 999-1012.
- Pedley, KF. and Martin, GB** (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* **8** (5): 541-547.
- Pieterse, CMJ., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, SCM** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol.* **5** (5): 308-316.
- Pieterse, CMJ., Van Wees, SCM., Hoffland, E., Van Pelt, JA. and Van Loon, LC** (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell.* **8** (8): 1225-1237.
- Pieterse, CMJ., van Wees, SCM., van Pelt, JA., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, PJ. and van Loon, LC** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell.* **10** (9): 1571-1580.
- Pilon-Smits, E** (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* **56** (1): 15-39.
- Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol.* **12** (4): 421-426.

- Pogany, M., von Rad, U., Grun, S., Dongo, A., Pintye, A., Simoneau, P., Bahnweg, G., Kiss, L., Barna, B. and Durner, J** (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-Alternaria pathosystem. *Plant Physiol.* **151** (3): 1459-1475.
- Poinsot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P. and Pugin, A** (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant-Microbe Interact.* **16** (6): 553-564.
- Pozo, MJ. and Azcón-Aguilar, C** (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol.* **10** (4): 393-398.
- Pozo, MJ., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, JM. and Azcon-Aguilar, C** (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* **53** (368): 525-534.
- Pugin, A., Frachisse, JM., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. and Guern, J** (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell.* **9** (11): 2077-2091.
- Qi, Z., Stephens, NR. and Spalding, EP** (2006) Calcium entry mediated by GLR3.3, an Arabidopsis glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol.* **142** (3): 963-971.
- Qiu, JL., Fiil, BK., Petersen, K., Nielsen, HB., Botanga, CJ., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, MC., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, KD., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. and Petersen, M** (2008) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *Embo J.* **27** (16): 2214-2221.
- Rahman, I., Biswas, SK., Jimenez, LA., Torres, M. and Forman, HJ** (2005) Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Sign.* **7** (1-2): 42-59.
- Rask, L., Andreasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol.* **42** (1): 93-113.
- Rauhut, T. and Glawischnig, E** (2009) Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochemistry.* **70** (15-16): 1638-1644.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J. and Zhang, S** (2008) A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105** (14): 5638-5643.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, JC., Sallantin, M., Beauvaiscante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, JC** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired-resistance in tobacco. *Eur J Biochem.* **183** (3): 555-563.
- Ristoff, E., Augustson, C., Geissler, J., de Rijk, T., Carlsson, K., Luo, J-L., Andersson, K., Weening, RS., van Zwieten, R., Larsson, A. and Roos, D** (2000) A missense mutation in the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia. *Blood.* **95** (7): 2193-2196.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. and Jones, JDG** (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol.* **10** (4): 372-379.

- Rodriguez, MCS., Petersen, M. and Mundy, J** (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **61**: 621-649.
- Roetschi, A** (2001) *Thèse*. Arabidopsis-Phytophthora, une pathosystème modèle pour la caractérisation d'une interaction entre une plante et un pathogène oomycète. Département de Biologie, Unité de Biologie Végétale, Université de Fribourg, Fribourg
- Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbahri, L., Mauch, F. and Mauch-Mani, B** (2001) Characterization of an Arabidopsis-Phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J.* **28** (3): 293-305.
- Ron, M. and Avni, A** (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell.* **16** (6): 1604-1615.
- Rouhier, N., Lemaire, S. and Jacquot, J-P** (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol.* **59** (1): 143-166.
- Rusterucci, C., Espunya, MC., Diaz, M., Chabannes, M. and Martinez, MC** (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143** (3): 1282-1292.
- Sagi, M. and Fluhr, R** (2006) Production of Reactive Oxygen Species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol.* **141** (2): 336-340.
- Salvaudon, L., Giraud, T. and Shykoff, JA** (2008) Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol.* **11** (2): 135-143.
- Schilmiller, AL. and Howe, GA** (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol.* **8** (4): 369-377.
- Schlaeppli, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A. and Mauch, F** (2010) Disease resistance of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant J.* **62** (5): 840-851.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F. and Reymond, P** (2008) The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J.* **55** (5): 774-786.
- Schornack, S., Huitema, E., Cano, LM., Bozkurt, TO., Oliva, R., van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, ME., Bos, J., Haas, BJ., Zody, MC., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M. and Kamoun, S** (2009) Ten things to know about oomycete effectors. *Mol Plant Pathol.* **10** (6): 795-803.
- Schwarzländer, M., Fricker, MD., Muller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, LJ., Hell, R. and Meyer, AJ** (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc.* **231** (2): 299-316.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, JE. and Innes, RW** (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science.* **301** (5637): 1230-1233.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T. and Blein, J-P** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* **31** (2): 137-147.

- Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, ML., Humbert, C., Montillet, JL. and Blein, JP** (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.* **20** (12): 1573-1579.
- Squier, TC** (2006) Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. *Antioxid Redox Sign.* **8** (1-2): 217-228.
- Stergiopoulos, I. and de Wit, PJGM** (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol.* **47** (1): 233-263.
- Stevens, RG., Creissen, GP. and Mullineaux, PM** (1997) Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol Biol.* **35** (5): 641-654.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. and Mettraux, JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* **35**: 235-270.
- Stuehr, DJ., Santolini, J., Wang, ZQ., Wei, CC. and Adak, S** (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem.* **279** (35): 36167-36170.
- Stulemeijer, IJ. and Joosten, MH** (2008) Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Mol Plant Pathol.* **9** (4): 545-560.
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, AC. and Harper, JF** (2000) Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: Insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Phy Plant Mol Biol.* **51** (1): 433-462.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K. and Dolan, L** (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science.* **319** (5867): 1241-1244.
- Talke, IN., Blaudez, D., Maathuis, FJM. and Sanders, D** (2003) CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci.* **8** (6): 286-293.
- Tang, XY., Frederick, RD., Zhou, JM., Halterman, DA., Jia, YL. and Martin, GB** (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science.* **274** (5295): 2060-2063.
- Thomma, B., Eggermont, K., Tierens, K. and Broekaert, WF** (1999) Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121** (4): 1093-1101.
- Thomma, BPHJ., Eggermont, K., Penninckx, IAMA., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, BPA. and Broekaert, WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (25): 15107-15111.
- Thomma, BPHJ., Penninckx, IAMA., Cammue, BPA. and Broekaert, WF** (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol.* **13** (1): 63-68.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, DB** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11** (6): 1187-1194.

- Thorpe, GH. and Kricka, LJ** (1986) Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Method Enzymol.* **133**: 331-353.
- Thulke, O. and Conrath, U** (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence related genes in parsley. *Plant J.* **14** (1): 35-42.
- Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B. and Turlings, TCJ** (2007) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J.* **49** (1): 16-26.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, MN., Metraux, J-P. and Mauch-Mani, B** (2005) Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell.* **17** (3): 987-999.
- Ton, J. and Mauch-Mani, B** (2004) Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* **38** (1): 119-130.
- Toroser, D., Yarian, CS., Orr, WC. and Sohal, RS** (2006) Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1760** (2): 233-244.
- Torres, MA. and Dangl, JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol.* **8** (4): 397-403.
- Torres, MA., Dangl, JL. and Jones, JDG** (2002) Arabidopsis gp91^{phox} homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99** (1): 517-522.
- Torres, MA., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, KE. and Jones, JDG** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). *Plant J.* **14** (3): 365-370.
- Torres, MA., Jones, JDG. and Dangl, JL** (2006) Reactive Oxygen Species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141** (2): 373-378.
- Trouvelot, S., Varnier, AL., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, JM., Pugin, A. and Daire, X** (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant-Microbe Interact.* **21** (2): 232-243.
- Truman, WM., Bennett, MH., Turnbull, CG. and Grant, MR** (2010) Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. *Plant Physiol.* **152** (3): 1562-1573.
- Tu, Z. and Anders, MW** (1998) Identification of an important cysteine residue in human glutamate-cysteine ligase catalytic subunit by site-directed mutagenesis. *Biochem J.* **336** (3): 675-680.
- Ullmann, P., Gondet, L., Potier, S. and Bach, TJ** (1996) Cloning of *Arabidopsis thaliana* glutathione synthetase (*GSH2*) by functional complementation of a yeast *gsh2* mutant. *Eur J Biochem.* **236** (2): 662-669.
- Van der Biezen, EA. and Jones, JDG** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci.* **23** (12): 454-456.
- Van der Ent, S., Van Wees, SCM. and Pieterse, CMJ** (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry.* **70** (13-14): 1581-1588.

Van Hulst, M., Pelser, M., van Loon, LC., Pieterse, CMJ. and Ton, J (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103** (14): 5602-5607.

Van Loon, LC., Bakker, PAHM. and Pieterse, CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. **36** (1): 453-483.

Van Loon, LC., Bakker, PAHM., Van der Heijdt, WHW., Wendehenne, D. and Pugin, A (2008) Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol Plant-Microbe Interact*. **21** (12): 1609-1621.

Van Loon, LC., Rep, M. and Pieterse, CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. **44**: 135-162.

Van Wees, SC., Chang, HS., Zhu, T. and Glazebrook, J (2003) Characterization of the early response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiol*. **132** (2): 606-617.

Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M. and Alain, P (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol Plant-Microbe Interact*. **19** (4): 429-440.

Verhagen, BW.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H-S., van Loon, LC. and Pieterse, CMJ (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol Plant-Microbe Interact*. **17** (8): 895-908.

Vernoux, T., Wilson, RC., Seeley, KA., Reichheld, J-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, SC., Cobbett, CS., Van Montagu, M., Inze, D., May, MJ. and Sung, ZR (2000) The *root meristemless1/cadmium sensitive2* gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*. **12** (1): 97-110.

Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. and Rausch, T (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J*. **41** (1): 15-30.

Ward, JM., Mäser, P. and Schroeder, JI (2009) Plant ion channels: Gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu Rev Phytopathol*. **71** (1): 59-82.

Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. and Miersch, O (2006) The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *J Plant Physiol*. **163** (3): 297-306.

Wawer, I., Bucholc, M., Astier, J., Anielska-Mazur, A., Dahan, J., Kulik, A., Wyslouch-Cieszynska, A., Zareba-Kozioł, M., Krzywinska, E., Dadlez, M., Dobrowolska, G. and Wendehenne, D (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J*. **429**: 73-83.

Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J-M., Barbier-Brygoo, H. and Pugin, A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*. **14** (8): 1937-1951.

White, PJ., Bowen, HC., Demidchik, V., Nichols, C. and Davies, JM (2002) Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta*. **1564** (2): 299-309.

- Willmott, NJ., Wong, K. and Strong, AJ** (2000) Intercellular Ca^{2+} waves in rat hippocampal slice and dissociated glial-neuron cultures mediated by nitric oxide. *FEBS Lett.* **487** (2): 239-247.
- Wingate, VPM., Lawton, MA. and Lamb, CJ** (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.* **87** (1): 206-210.
- Wolf, AE., Dietz, KJ. and Schröder, P** (1996) Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.* **384** (1): 31-34.
- Xiang, C., Werner, BL., Christensen, EM. and Oliver, DJ** (2001) The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* **126** (2): 564-574.
- Yu, LM** (1995) Elicitins from Phytophthora and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92** (10): 4088-4094.
- Zaninotto, F., Camera, SL., Polverari, A. and Delledonne, M** (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141** (2): 379-383.
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L. and Muller, M** (2008) Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J Exp Bot.* **59** (14): 4017-4027.
- Zeng, L-R., Vega-Sanchez, ME., Zhu, T. and Wang, G-L** (2006) Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res.* **16** (5): 413-426.
- Zhang, M-Y., Bourbonloux, A., Cagnac, O., Srikanth, CV., Rentsch, D., Bachhawat, AK. and Delrot, S** (2004) A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants. *Plant Physiol.* **134** (1): 482-491.
- Zhang, SQ. and Klessig, DF** (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95** (12): 7225-7230.
- Zhang, SQ. and Klessig, DF** (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* **6** (11): 520-527.
- Zhao, J., Connorton, JM., Guo, Y., Li, X., Shigaki, T., Hirschi, KD. and Pittman, JK** (2009) Functional studies of split Arabidopsis $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchangers. *J Biol Chem.* **284** (49): 34075-34083.
- Zhao, J., Davis, LC. and Verpoorte, R** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances.* **23** (4): 283-333.
- Zhou, N., Tootle, TL. and Glazebrook, J** (1999) Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell.* **11** (12): 2419-2428.
- Zimmerli, L., Hou, BH., Tsai, CH., Jakab, G., Mauch-Mani, B. and Somerville, S** (2008) The xenobiotic beta-aminobutyric acid enhances Arabidopsis thermotolerance. *Plant J.* **53** (1): 144-156.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J-P. and Mauch-Mani, B** (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97** (23): 12920-12925.

Zimmerli, L., Metraux, J-P. and Mauch-Mani, B (2001) Beta-aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **126** (2): 517-523.

Zimmermann, S., Frachisse, JM., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H. and Guern, J (1998) Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol Biochem.* **36** (9): 665-674.

Zipfel, C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol.* **20** (1): 10-16.

Zipfel, C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol.* **12** (4): 414-420.

Zipfel, C. and Felix, G (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol.* **8** (4): 353-360.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, JDG., Boller, T. and Felix, G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* **125** (4): 749-760.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, EJ., Jones, JDG., Felix, G. and Boller, T (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature.* **428** (6984): 764-767.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Publications scientifiques internationales

- S. Rasul, **C. Dubreuil-Maurizi**, B. Poinssot, D. Wendehenne and S. Jeandroz. Characterization of nitric oxide production in response to OG in *A. thaliana*. En preparation
- A. Gauthier, S. Trouvelot, A. Ferrarini, V. Flors, P. Frettinger, **C. Dubreuil-Maurizi**, J.M. Joubert, M. Delledonne, D. Wendehenne and B. Poinssot. Grapevine transcript and signal profiling triggered by two β -1,3 glucan derivates reveal that priming and elicitation use distinct signaling events but activate a common transcriptome to induce resistance against *Plasmopara viticola*. En préparation
- **C. Dubreuil-Maurizi**, J. Vitecek, L. Marty, L. Branciard, P. Frettinger, D. Wendehenne, A. Meyer, F. Mauch and B. Poinssot. Glutathione biosynthesis depletion in Arabidopsis *pad2* mutant disturbs defense cellular signaling events and gene expression. Soumis à *Plant physiology* (16 juin 2010)
- **C. Dubreuil-Maurizi**, S. Trouvelot, P. Frettinger, A. Pugin, D. Wendehenne and B. Poinssot. β -Aminobutyric acid primes a NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species production during grapevine triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (2010). **23** (8) : 1012-1021.
- A. Besson-Bard, J. Astier, S. Rasul, I. Wawer, **C. Dubreuil-Maurizi**, S. Jeandroz, D. Wendehenne. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science* (2009) 177 : 302-309

Revues de vulgarisation scientifiques

- A-F. Adam-Blondon, R. Bacilieri, F. Baillieul, J-M. Boursiquot, C. Clément, X. Daire, F. Delmotte, S. Delrot, **C. Dubreuil-Maurizi**, E. Duchêne, A. Gauthier, F. Karst, T. Lacombe, V. Laucou, D. Merdinoglu, P. Mestre, N. Ollat, F. Pelsy, J-P. Péros, B. Poinssot, A. Pugin, P. Rey, N. Terrier, P. This, S. Trouvelot, M. Viaud. Décryptage du génome de la vigne : Perspectives pour la viticulture. *La revue des œnologues* (2009) 130 : 9-11
- S. Trouvelot, **C. Dubreuil**, A. Gauthier, A. Pugin, X. Daire et B. Poinssot. La potentialisation des défenses naturelles des plantes. *Phytoma* (2006) 598 : 38-41

COMMUNICATIONS

Communications orales

- S. Rasul, M-C. Mounier, G. Alcaraz, **C. Dubreuil-Maurizi**, O. Lamotte, B. Poinssot, D. Wendehenne, S. Jeandroz. Characterization of nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana* elicited by oligogalacturonides. 8^{ème} *Rencontre de Phytopathologie–Mycologie* - Aussois (2010)
- **C. Dubreuil-Maurizi**, J. Vitecek, L. Branciard, F. Mauch, P. Meimoun, F. Bouteau, D. Wendehenne and B. Poinssot. Analysis of a *pad2* mutant sensitivity to pathogens. *Journées Santé des Plantes et Environnement* - Rennes (2009)
- **C. Dubreuil**, J. Vitecek, L. Branciard, F. Mauch, P. Meimoun, F. Bouteau, D. Wendehenne and B. Poinssot. Why a *pad2* mutant of *Arabidopsis thaliana* is more sensitive to pathogens. *Forum des Jeunes Chercheurs* - Dijon (2008)

Communications écrites

- M. Gamm, M.-C. Héloir, J. Kelloniemi, **C. Dubreuil-Maurizi**, B. Poinssot, D. Wendehenne and M. Adrian. Evaluation of reference genes for gene expression normalization in *V.vinifera* by quantitative real-time RT-PCR. *International workshop on grapevine downy and powdery mildew* – Bordeaux (2010)
- S. Rasul, **C. Dubreuil-Maurizi**, B. Poinssot, D. Wendehenne and S. Jeandroz. Characterization of nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana* treated by H₂O₂, an elicitor of plant defense. *Forum des Jeunes Chercheurs* - Dijon (2009)
- **C. Dubreuil-Maurizi**, J. Vitecek, L. Branciard, F. Mauch, P. Meimoun, F. Bouteau, D. Wendehenne and B. Poinssot. Why a mutation in GSH1 triggers susceptibility to pathogens in the *Arabidopsis pad2* mutant. *International symposium of glutathione and related thiols in microorganisms and plants* – Nancy (2008)