Les histones déacétylases de type 2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac

Agnès Dutartre

▶ **To cite this version:**

Agnès Dutartre. Les histones déacétylases de type 2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS109 . tel-01374560

HAL Id: tel-01374560

https://theses.hal.science/tel-01374560

Submitted on 30 Sep 2016

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
Discipline Sciences de la Vie
Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Les histones déacétylases de type 2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac

Par

Agnès DUTARTRE

19 Décembre 2011

M. P. ETIENNE, Maître de Conférences, Université de Caen	Rapporteur
M. E. GELHAYE, Professeur, Université de Nancy	Rapporteur
M. M.CHERKAOUI-MALKI, Professeur, Université de Bourgogne	Examinateur
M. S. BOURQUE, Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Co-Directeur

Directeur de thèse : David WENDEHENNE, Professeur, Université de Bourgogne

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.

Je tiens également à remercier les membres du jury, Philippe Etienne, Eric Gelhaye et Mustapha Cherkaoui-Malki d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Arrivé au terme des trois années consacrées à ce travail de thèse, j'aimerai exprimer ma gratitude à l'encontre des personnes qui ont contribué, directement ou non, à sa réalisation.

En premier lieu, je remercie très sincèrement David Wendehenne, mon directeur de thèse, et Stéphane Bourque, mon co-directeur de thèse, de m'avoir intégrée et accueillie dans l'équipe OP2 de l'UMR Plante-Microbe-Environnement.

David, directeur de thèse mais également directeur de labo de talent, je profite de cette page dédiée pour te remercier pour ton encadrement, ta disponibilité, les discussions toujours constructives mais également ta franchise et ta compréhension !
Stéphane, je te remercie pour tes idées et conseils toujours judicieux, qui ont largement contribué à ce projet de thèse.

Un travail de recherche ne se faisant jamais seul, je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire OP2 au sein duquel j'ai passé ces années.

Agnès, tel un chocolat Mon Chéri (si je peux me permettre..), ton enrobage de douceur laisse entrevoir et découvrir un cœur tendre et généreux ! Merci pour toutes ces discussions, fous rires et autres bons moments passés avec toi.

Je remercie également Emilie « brune » et Emilie « blonde » pour les moments bien sympas partagés au labo ou ailleurs.

Annie, notre « colocation » de bureau pendant 5 mois aura suffit pour découvrir une belle et profonde amitié ! C'est un réel plaisir de pouvoir partager avec toi des discussions franches et abouties sans oublier les week-ends fort dépaysants.

Je n'oublie pas mes autres « colocataires » de bureau, Magda et Sumaira, avec qui j'ai passé de très bons moments. Bravo Magda, ca y est : tu es Docteur ! Sumaira, c'est bientôt à toi ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, tes conseils toujours judicieux et tous ces bons moments et péripéties qu'on a pu partager ensemble durant ces trois ans de thèse.

Je souhaite également remercier les membres du secrétariat de l'UMR, Christine, Samuel, Pauline et « les deux » Sandrine pour leur amabilité, leur gentillesse et leur efficacité.
Elizabeth, je t'adresse un grand merci pour ton soutien et je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie !

Je voudrais sincèrement remercier Mustapha pour m'avoir confié des encadrements de TP à l'uB très agréables à dispenser et forts en « aventures » ! J'en profite pour remercier Siham pour sa gentillesse et pour l'aide technique apportée au cours de ces encadrements.

C'est sans oublier l'équipe « Fribourgeoise » de Master 2 (Nathalie, Stanley, Nizar, Arlette) avec qui j'ai partagé des moments forts sympathiques. Merci Arlette pour ces moments partagés à refaire le monde dans les pubs fribourgeois !

Un immense merci à Nathalie (Bourguignonne cette fois !), pour ton soutien, pour être là en toutes circonstances mais aussi pour tous ces projets et moments de folie !

J'adresse un clin d'œil à Choucroute (pour les plaquages), à Bichon (un diffuseur d'affection) et à Pikachu (le protecteur aux décharges électriques) !

Mes remerciements les plus forts s'adressent à mes parents Josiane et Bernard et mon frère Olivier pour m'avoir toujours soutenue, guidée et encouragée dans mes projets. Vous avez toujours été là quand j'avais besoin de conseils (en vous félicitant pour votre incroyable capacité à supporter mon débit de paroles même jusqu'à très tard dans la nuit !) mais vous m'avez également permis de m'évader quand j'en n'avais besoin (merci Maman pour les pauses « peinture » !) !! Oli, tiens bon c'est la dernière ligne droite pour toi… futur Docteur !

J'adresse enfin mes tendres remerciements à Jan ! Merci pour tes bons petits plats, pour toutes les petites attentions pour me changer les idées quand j'en avais besoin. Tu as toujours cru en moi mais tu m'as surtout permis d'aller au bout de ces trois ans de thèse par ton soutien et ta patience incroyables !

A ma famille,

A Jan,

Sommaire

Liste des abréviations 5

Introduction 8

1. Généralités 8

2. Contexte bibliographique 8

2.1. Les réactions de défense des plantes 8

2.1.1. La perception de l'agent pathogène 9

2.1.1.1. La résistance basale ou PTI (PAMP-triggered immunity) 10

2.1.1.2. La résistance race-spécifique ou ETI (Effector-triggered immunity) 13

2.1.2. Les principaux éléments de la transduction du signal 14

2.1.2.1. Les flux ioniques à travers la membrane plasmique 14

2.1.2.2. La production de FAO 15

2.1.2.3. La production de NO 17

2.1.2.4. Le rôle des phytohormones 18

2.1.3. Les réponses de défense 18

2.1.3.1. Renforcement de la paroi cellulaire 19

2.1.3.2. La synthèse de composés antimicrobiens 19

2.1.3.3. Les protéines PR 20

2.1.3.4. La réponse hypersensible (RH) 21

2.1.3.5. La potentialisation 22

2.1.3.6. La résistance systémique acquise (RSA) 23

2.1.3.7. La résistance systémique induite (RSI) 24

2.1.3.8. La résistance systémique induite par blessure 25

2.1.4. Les modifications post-traductionnelles dans les réactions de défense 26

2.1.5. Chapitre d'ouvrage : " Post-translational modifications of nuclear proteins in the response of plant cells to abiotic stresses " 27

2.2. Le modèle Tabac/élicitines 64

2.2.1. Les élicitines des oomycètes 64

2.2.1.1. Caractéristiques et fonctions 64
2.2.1.2. Implication dans le développement de réactions de défense des plantes 65
2.2.2. La cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense 67
2.2.2.1. La reconnaissance spécifique de la cryptogéine 67
2.2.2.2. La signalisation induite par la cryptogéine 68
3. Objectifs de thèse 70
Matériels et Méthodes 71
1. Matériels 71
1.1. Suspensions cellulaires 71
1.2. Plants de tabac 71
1.3. Eliciteurs 71
1.4. Outils pharmacologiques 72
2. Méthodes 72
2.1. Obtention d'une lignée de tabac déficiente pour l'expression de *NtHD2a/b* 72
2.2. Surexpression de NtHD2a fusionnée à la protéine GFP dans les plants de tabac 73
2.3. Traitement des cellules de tabac 74
2.4. Traitement des plants de tabac 74
2.4.1. Agroinfiltration des plants de tabac 74
2.4.1.1. Préparation de la solution d'A. tumefaciens 74
2.4.1.2. Méthodes d'agroinfiltration 75
2.4.2. Observation de la réaction hypersensible 75
2.5. Analyse des événements cellulaires 75
2.5.1. Mort cellulaire 75
2.5.2. Production de monoxyde d'azote intracellulaire 76
2.5.3. Mesure de la production de H_2O_2 par chimioluminescence 76
2.5.4. Etude de l'accumulation de transcrits par RT-PCR quantitative en temps réel 76
2.5.5. Dosage des composés phénoliques solubles par le réactif de Folin-Ciocalteu 77
2.6. Analyse des modifications post-traductionnelles des protéines 78
2.6.1. Préparation des noyaux 78

2.6.2. Préparation des protéines nucléaires et cytosoliques....78

2.6.2.1. Extraction des protéines nucléaires par lyse saline 78

2.6.2.2. Extraction des protéines cytosoliques 79

2.6.3. Analyse des protéines par électrophorèse....79

2.6.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes 79

2.6.3.2. Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie....79

2.6.3.3. Immunodétection des protéines par western blot 79

2.6.3.4. Essai kinase en gel....80

2.6.4. Analyse des protéines par électrophorèse....81

2.6.4.1. Purification des protéines nucléaires acétylées 81

2.6.4.2. Préparation des échantillons pour séquençage....82

2.6.4.3. Analyse par spectrométrie de masse....83

Chapitre de Résultats 84

1. Résumé de la publication....84

2. Publication 87

3. Résultats complémentaires....104

3.1. Des événements de signalisation cellulaire comparables dans les cellules WT et CL5 ...104

3.1.1. Production de H_2O_2 induite par la cryptogéine 104

3.1.2. Production de NO induite par la cryptogéine....106

3.2. Des événements cellulaires significativement différents dans les cellules WT et CL5....108

3.2.1. Relation entre la synthèse protéique et l'induction de la mort cellulaire par la cryptogéine 108

3.2.2. Activation des MAPK dans les cellules CL5 109

3.2.3. Accumulation de composés phénoliques dans les cellules CL5....110

3.3. NtHD2a/b sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite dans les cellules de tabac par les élicitines nécrosantes 112

3.4. Identification des protéines nucléaires cibles de NtHD2a/b....113

3.4.1. Enrichissement des protéines acétylées par chromatographie d'échanges d'anions...113

3.4.2. Enrichissement des protéines acétylées par chromatographie d'affinité....114

3.4.3. Identification des protéines nucléaires acétylées par spectrométrie de masse LC MS/MS 115

3.5. NtHD2a/b et le développement des plants de tabac CL5 117

4. Discussion 119

4.1. NtHD2a/b jouent le rôle de régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine et d'autres élicitines nécrosantes dans les cellules de tabac 119

4.2. La néosynthèse de protéines et l'activation accrue des MAPK semblent impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire induit par NtHD2a/b 122

4.3. Le NO et le H_2O_2 ne sont pas des événements majeurs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac 124

4.4. NtHD2a/b seraient plus généralement des lysines déacétylases participant à des processus de défense et de développement chez le tabac.....128

4.5. Modèle proposé 130

Conclusion générale et perspectives 133

Annexes 136

Références bibliographiques.....151

Liste publications et communications.....173

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_{(cyt, nuc)}$ Concentration en calcium libre (cytosolique, nucléaire)

ABA Acide abscissique

ADN(c) Acide désoxyribonucléique (complémentaire)

ARN(m) Acide ribonucléique (messager)

avr Gènes d'avirulence

BABA Acide β-aminobutyrique

BAK1 Brassinosteroid receptor1-associated kinase 1

BiFC Biomolecular fluorescent complementation

BTH Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothiate

ButNa Butyrate de sodium

CCoAOMT Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase

CDPK Ca^{2+}-dependent protein kinase

CeBIP Chitin-binding protein

CERK1 Chitin elicitor receptor kinase 1

CHX Cycloheximide

CK2 Caséine kinase de type 2

CNGC Cyclic nucleotide gated channel

cPTIO 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium

cv. Cultivar

Da Dalton

DAF-2DA 4,5-diaminofluorescéine diacétate

DAMP Damage-associated molecular pattern

DMSO Diméthylsulfoxyde

dNTP Désoxy nucleotide tri-phosphate

DPI Diphénylène iodonium

DTT Dithiothréitol

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N, N', N'-tetraacetic acid

EF1-α Elongation factor1- α

EFR Elongation factor-Tu receptor

ERK Extracellular signal-regulated protein kinase

ET Ethylène

ETI Effector-triggered immunity

FAD Flavine adenine dinucléotide

FAO Formes actives de l'oxygène

FLS2 Flagellin sensing 2

GBP Glucan binding protein

GFP Green fluorescence protein

HDAC Histone déacétylase

HEPES N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène

HSR203J *Hypersensitive-related gene 203 J*

INA Acide 2,6-dichloroisonicotinique

JA Acide jasmonique

LB Milieu de Liuria Bertani

AADC2 Aromatic Amino acid decarboxylase 2

LeEIX1 Ethylene-inducing xylanase

LPS Lipopolysaccharide

LRR-(RK) Leucine-rich repeat (receptor kinase)

LZ-CC Leucine-zipper/coil-coil domain

MAMP Microbe-associated molecular pattern

MAPK Mitogen-activated protein kinase

MES 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid

MeSA Méthyl salicylate

MPT Modifications post-traductionnelles

MS Spectrométrie de masse

NAD Nicotinamide-adénine dinucléotide

NADPH Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

NBS Nucleotide-binding site

NO Monoxyde d'azote

NOS NO synthase

NPR1 Non-expressor of pathogenesis-related genes 1

NtHD2 *Nicotiana tabacum* histone déacétylase de type 2

NtOSAK *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase

NtRbohD *Nicotiana tabacum* respiratory burst oxydase homologue D

$O_2^{\cdot -}$ Anion superoxyde

OG Oligogalacturonides

$ONOO^-$ Peroxynitrite

PAL Phenylalanine ammonia-lyase

PAMP Pathogen-associated molecular pattern

PCD Mort cellulaire programmée

PEPR1 Pep1 receptor 1

PFC Poids frais de cellules

PK Protéine kinase

pI Point isoélectrique

PMSF Phenylmethanesulfonyl fluoride

PR Pathogenesis-related

PRR Pattern recognition receptor

PTI PAMP-triggered immunity

pv. Pathovar

R Gène de résistance

Rboh Respiratory burst oxydase homologue

RH Réponse hypersensible

RIN4 RPM1 interacting 4

RLP Receptor-like protein

rpm Rotation par minute

RSA Résistance systémique acquise

RSI Résistance systémique induite

SA Acide salicylique

SAB Sérum albumine bovine

SABP2 Salicylic acid binding protein 2

SDS Sodium dodécylsulfate

SDS-PAGE Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

SIPK Salicylic acid-induced protein kinase

SnRK Sucrose non-fermenting-related protein kinase

SOD	Superoxyde dismutase	**TTSS**	Système de secretion de type III
TBB	4,5,6,7-tétrabromobenzotriazole	**VOC**	Composés organiques volatils
TCA	Acide trichloroacétique	**VPE**	Vacuolar processing enzymes
TIR	Toll/interleukin-1 receptor	**WIPK**	Wound- induced protein kinase

B. cinerea	*Botrytis cinerea*	*P. infestans*	*Phytophthora infestans*
E. coli	*Escherichia coli*	*P. megasperma*	*Phytophthora megasperma*
H. arabidopsidis	*Hyaloperonospora arabidopsidis*	*P. parasitica*	*Phytophthora parasitica*
P. capsici	*Phytophthora capsici*	*P. syringae*	*Pseudomonas syringae*
P. cryptogea	*Phytophthora cryptogea*	*X. campestris*	*Xanthomonas campestris*

INTRODUCTION

1. Généralités

Malgré l'efficacité des défenses induites en réponse à un stress biotique, la maladie est parfois observée chez les plantes et peut causer des pertes considérables en termes de rendement, étant à l'origine de problèmes aussi bien économiques qu'humanitaires. La compréhension des mécanismes concourant à la mise en place des réponses de défenses des plantes constitue ainsi un enjeu majeur, en termes de recherche fondamentale comme de recherche appliquée. En particulier, le domaine de la phyto-protection est en attente forte de méthodes alternatives à la lutte chimique basée sur l'utilisation massive de produits phytosanitaires qui n'est pas sans conséquences sur l'environnement et la santé. Ces méthodes alternatives incluent notamment la stimulation des défenses naturelles de la plante par des éliciteurs ou des potentialisateurs (renommés SDN pour stimulateurs des défenses naturelles des plantes). Si de telles approches ont été montrées efficaces en laboratoire, le mode d'action des SDN ainsi que leur efficacité en parcelle cultivée sont actuellement à l'étude. De plus, à l'image des stratégies mises en œuvre dans le cadre de la lutte contre les pathologies humaines, l'identification de protéines jouant un rôle clé dans les voies de défense chez les plantes laisse entrevoir la possibilité de développer des méthodes de phyto-protection reposant sur la modulation de ces éléments moléculaires.

2. Contexte bibliographique

2.1. Les réactions de défense des plantes

Les plantes sont au cours de leur vie constamment confrontées aux variations de leur environnement ou à des agressions causées par d'autres organismes vivants. Au cours de l'évolution, les plantes ont mis en place des stratégies de défense efficaces et adaptées pour mieux résister à ces stress abiotiques et biotiques. En effet, la plante dispose de barrières physico-chimiques constitutives mais peut également mettre en place des mécanismes cellulaires spécifiques.

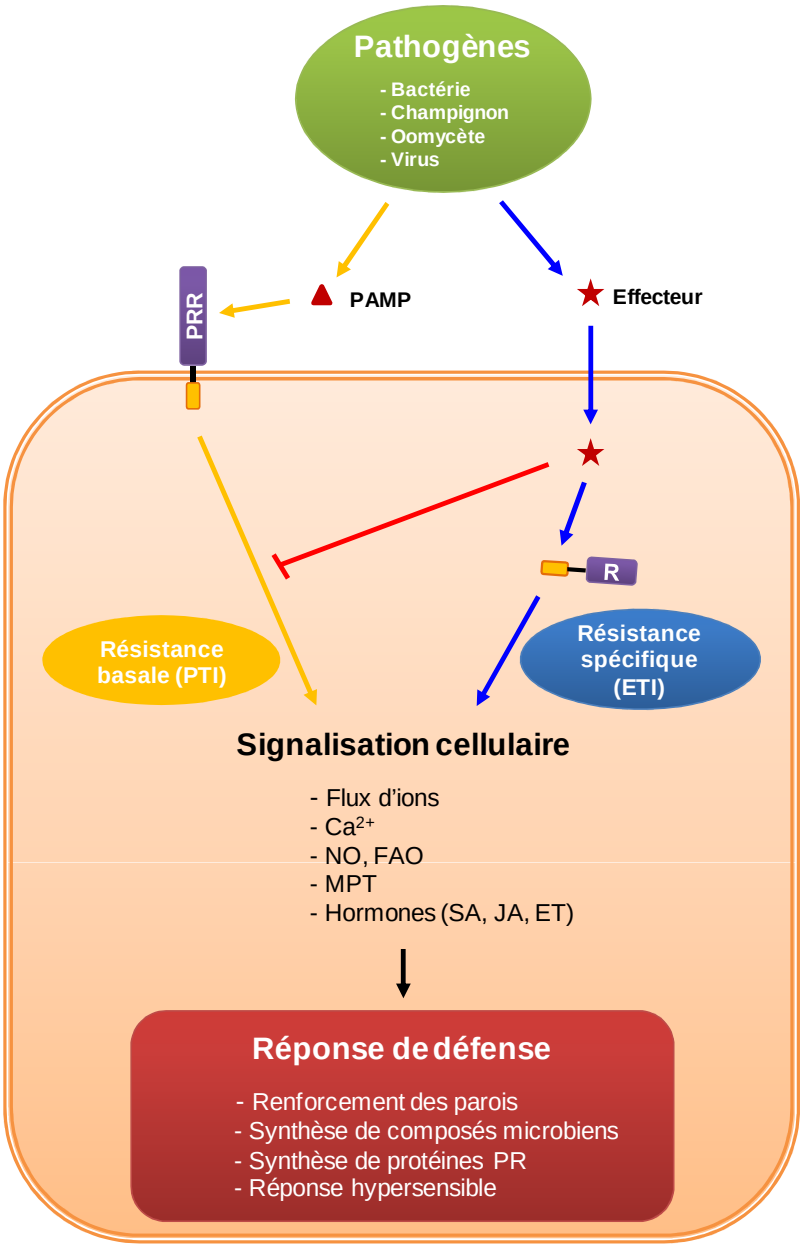


Figure 1 : Réprésentation schématique des mécanismes de défenses des plantes. L'attaque du pathogène est perçue par la plante *via* des PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) ou des effecteurs. La PTI (*PAMP-triggered immunity*) est induite par la reconnaissance des PAMP. La reconnaissance des effecteurs injectés dans la cellule, directe ou indirecte, par les protéines de résistance R conduit à l'ETI (*effector-triggered immunity*). Les effecteurs concourent à l'inactivation de la PTI. L'activation des défenses implique des processus de signalisation cellulaire tels que des flux d'ions, des influx de Ca^{2+}, une production de NO et de FAO, des événements de modifications post-traductionnelles (MPT), et des phytohormones en particulier le SA (acide salicylique), le JA (acide jasmonique) et l'ET (éthylène).

Plus précisément, une première ligne de défense contre les agressions de pathogènes est formée par les barrières physico-chimiques naturelles de la plante, en particulier la cuticule et la paroi végétale, mais également par la synthèse constitutive de composés antimicrobiens tels que les phytoanticipines (Van Etten *et al.*, 1994). La cuticule, composée de cutine et de cires cuticulaires, recouvre l'ensemble des parties aériennes de la plante alors que la paroi pecto-cellulosique, composée principalement de fibres de cellulose et d'hémicellulose ainsi que de pectine, entoure chaque cellule végétale. Ces défenses préexistantes, à l'origine de la résistance passive, sont généralement suffisantes pour protéger la plante contre des attaques de micro-organismes. Cependant, certains d'entre eux parviennent parfois à contourner ces barrières pour infecter la plante *via* des ouvertures naturelles telles que les stomates ou par des blessures dans la couche cuticulaire, mais également par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques contribuant à la dégradation de la cuticule et / ou de la paroi végétale (Soliday *et al.*, 1984 ; Vorwerk *et al.*, 2004). La perception et la reconnaissance d'un micro-organisme potentiellement pathogène peuvent activer d'autres systèmes de défense conduisant à une résistance active de la plante. Ces mécanismes visent à limiter la propagation de l'agresseur et à se prémunir contre l'attaque ultérieure d'autres micro-organismes. Dans ce cas, l'interaction est dite incompatible et la plante est résistante. Toutefois, il peut arriver que ces mécanismes de défense ne soient pas suffisants car activés trop tardivement ou bloqués par le pathogène ; dans ce cas la maladie est alors observée. Ce processus est qualifié d'interaction compatible et la plante est dite sensible.

2.1.1. La perception de l'agent pathogène

En réponse aux agents pathogènes, la plante dispose de deux types de résistance active : la résistance basale et la résistance spécifique (Iriti & Faoro, 2007 ; Dodds & Rathjen, 2010 ; Figure 1). Ces deux types de défense définissent l'immunité innée chez les plantes (Jones & Dangl, 2006 ; Chisholm *et al.*, 2006).

PAMP		Motif	Origine	Plantes réceptives
Protéiques	Flagelline	flg22	bactéries gram-négatives	Tomate, *A. thaliana*
	Facteur d'élongation (EF-Tu)	elf18	bactéries gram-négatives	*A. thaliana* , autres Brassicacées
	Transglutaminase	Pep13	oomycètes (espèces de Phytophthora)	Persil, Pomme de terre, Vigne, Tabac
	Xylanase	Pentapeptide TKLGE	champignons (espèces de Trichoderma)	Tabac, Tomate
	Protéine Cold shock	RNP-1	bactéries gram-négatives	Solanacées
			bactéries gram-positives	
	Cellulose-binding elicitor lectin (CBEL)	Domaine conservé liant la cellulose	oomycètes (espèces de Phytophthora)	Tabac, *A. thaliana*
	Protéines de transfert lipidiques (Elicitines)	Inconnu	oomycètes (espèces de Phytophthora et de Pythium)	Tabac, Navet, *Raphanus sativus*
	Harpine (HrpZ)	Inconnu	bactéries gram-négatives (Pseudomonas, Erwinia)	Concombre, Tabac, Tomate, *A. thaliana*
	Protéines inductrices de nécroses (NLP)	Inconnu	bactéries (espèces de Bacillus), champignons (espèces de Fusarium), oomycètes (espèces de Phytophthora et de Pythium)	Plantes dicotylédones
Glucidiques	Sidérophores	Inconnu	pseudomonas fluorescens	Tabac
	Peptidoglycanes		bactéries gram-négatives	Tabac, *A. thaliana*
	Chitine	Chitine oligosaccharidiques (degré de polymérisation >3)	ensemble des champignons	Tomate, *A. thaliana*, Riz, Blé, Orge
	β -Glucanes	Tetraglucosyl glucitol	champignons (Pyricularia oryzae)	Tabac, Riz, Fabacées
		Hepta-β-glucosides	oomycètes (espèces de Phytophthora)	
		Oligo-β-glucosides	Algues brunes	
Lipidiques	Fucan sulfatés	Fucane oligosaccharidiques	Algues brunes	Tabac
	Lipopolysaccharide	Lipide A lipooligosaccharidiques	bactéries gram-négatives (Xanthomonas, Pseudomonas)	Tabac, Poivron
	Rhamnolipides	Mono-/Dirhamnolipides	espèces de Pseudomonas	Vigne
	Ergostérol		ensemble des champignons	Tomate
	Cérébrosides A,C	Base sphingoïdique	champignons (espèces de Magnaporthe)	Riz
DAMP		**Motif**	**Origine**	**Plantes réceptives**
	Oligouronides	Oligomères	pectines de la paroi végétale	Tabac, *A. thaliana*
	Cellodextrines	Oligomères	cellulose de la paroi végétale	Vigne
	Monomères de cutine	Dodécane-1-ol	cuticule de la plante	Concombre, Tomate, Pomme

Tableau 1 : PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) et DAMP (*damage-associated molecular pattern*) reconnus par différentes espèces végétales. D'après Postel & Kemmerling (2009).

2.1.1.1. La résistance basale ou PTI (PAMP-triggered immunity)

La résistance basale ou PTI (*PAMP-triggered immunity*), non spécifique, est déclenchée lors de l'interaction entre un grand nombre de plantes et de micro-organismes suite à la perception de molécules appelées communément éliciteurs de réaction de défense. Les éliciteurs, signatures moléculaires conservées d'agresseurs, sont regroupés selon leur origine sous les termes de PAMP (*pathogen-associated molecular patterns* ; Tableau 1) ou MAMP (*microbe-associated molecular patterns*) qui sont reconnus par des récepteurs à la surface des cellules végétales appelés PRR (*pathogen-recognition receptors* ; Zipfel, 2008). Les éliciteurs sont de nature chimique variée : protéique, lipidique ou encore oligosaccharidique (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Boller & Felix, 2009).

La PTI peut être conférée par des éliciteurs de nature protéique comprenant des protéines natives mais également des motifs peptidiques conservés. Parmi eux, Flg22, un peptide de 22 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de la flagelline bactérienne, est l'un des MAMP les plus étudiés (Felix *et al.*, 1999). De même, deux autres peptides bactériens, elf18 et elf26 correspondant à l'extrémité N-terminale acétylée du facteur d'élongation EF-Tu d'*Escherichia coli*, sont capables d'induire une résistance chez *Arabidopsis thaliana* et d'autres Brassicacées (Kunze *et al.*, 2004). Le motif peptidique RNP-1 de protéines « cold-shock », issues de bactéries gram-positives et négatives, provoque quant à lui une résistance chez les Solanacées (Felix & Boller, 2003). Des éliciteurs peptidiques provenant d'autres micro-organismes pathogènes ont également été mis en évidence, tel que Pep13, un peptide issu d'une transglutaminase conservée chez une dizaine d'espèces de *Phytophthora* qui possède des propriétés élicitrices chez le persil et la pomme de terre (Brunner *et al.*, 2002). Les élicitines, sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora*, sont des protéines qui sont capables de fixer les stérols et de provoquer la mise en place de nécroses de type réponse hypersensible (RH) mais également une résistance systémique acquise (RSA) chez le tabac contre des agents pathogènes fongiques et bactériens (Ricci *et al.*, 1989 ; Yu, 1995 ; Kamoun *et al.*, 1993 ; voir § 2.1.3 de cette section). Enfin lors d'attaques par des agents pathogènes, les plantes peuvent également sécréter des peptides endogènes capables d'induire des réactions de défense comme la systémine, identifiée chez la tomate, ou encore AtPep1 chez *A. thaliana* (Lotze *et al.*, 2007 ; Boller, 2005 ; Huffaker *et al.*, 2006).

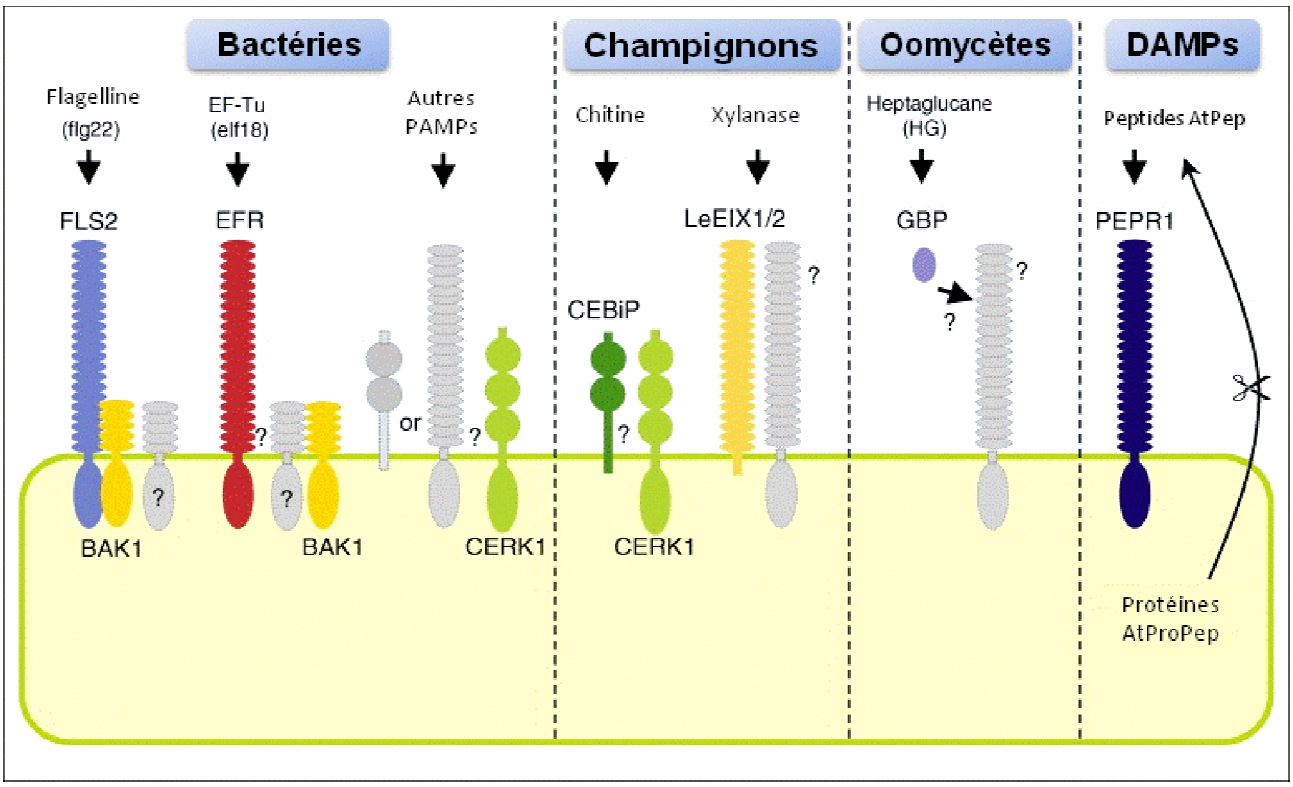


Figure 2 : **Récepteurs de type PRR (*pattern recognition receptor*) chez les plantes.**
La flagelline bactérienne (flg22) et le facteur d'élongation EF-Tu (elf18) chez *A. thaliana* sont reconnus respectivement par FLS2 et EFR, des récepteurs de type LRR-RK (*leucine-rich repeat receptor-like kinase*). Chez le riz, le site de haute affinité liant la chitine correspond à CEBIP (*chitin-binding protein*). Chez la tomate, la xylanase est reconnue par LeEIX1/2 (*ethylene-inducing xylanase*), un récepteur de type RLP (*receptor-like protein*), où seul LeEIX2 est capable d'induire la transduction du signal. Chez le soja, l'heptaglucane secrété par l'oomycète *Phytophthora sojae* 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 de la plupart des modèles. **D'après Zipfel (2009).**

La capacité des éliciteurs de nature lipidique, tels que l'acide arachidonique présent chez les oomycètes ou l'ergostérol et les sphingolipides de certains champignons, à induire la PTI a notamment été rapportée chez la pomme de terre, le tabac, le riz, la vigne et la tomate (Boller, 1995 ; Granado *et al.*, 1995 ; Koga *et al.*, 1998 ; Lochman & Mikes, 2006 ; Laquitaine *et al.*, 2006).

Enfin, parmi les éliciteurs de nature glucidique, ont été caractérisés les peptidoglycanes de la paroi bactérienne ou encore des peptides N-glycosylés de levure (Erbs *et al.*, 2008 ; Boller, 1995).

Bien que majoritairement sécrétée par les micro-organismes, une nouvelle classe d'éliciteurs appelée DAMP (*damage-associated molecular pattern*) regroupe des produits issus de la dégradation de la paroi du pathogène ou de la plante sous l'action respective d'enzymes hydrolytiques produites par la plante ou le micro-organisme (Lotze *et al.*, 2007 ; De Lorenzo *et al.*, 2011). Des monomères de cutine, libérés sous l'action de cutinases sécrétées par un certain nombre de microbes qui dégradent la cuticule, sont capables d'induire des réactions de défense de la plante (Chassot & Métraux, 2005). Les oligogalacturonides (OG), polymères d'acide α-1,4-galacturonique issus de la dégradation de la paroi des cellules végétales, sont parmi les DAMP les plus étudiés (Hahn *et al.*, 1981 ; Boller & Felix, 2009). Il a notamment été montré que les OG conféreraient une résistance contre l'infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* chez la vigne et *A. thaliana* (Ferrari *et al.*, 2007 ; Aziz *et al.*, 2004).

La PTI est initiée par la reconnaissance des PAMP par des récepteurs PRR (Nürnberger & Brunner, 2002 ; Zipfel, 2008 ; Figure 2). Ces récepteurs sont majoritairement regroupés dans la classe des LRR-RK (*leucine-rich repeat receptor kinase*) qui présentent des similarités de structure avec les récepteurs Toll-like chez les animaux (Zipfel, 2008 ; Hayashi *et al.*, 2001). Plusieurs PRR ont été caractérisés tels que FLS2 (*flagellin sensing 2*), EFR (*elongation factor-Tu receptor*) ou encore PEPR1 (*Pep1 receptor 1*) qui reconnaissent respectivement la flagelline/Flg22, EF-Tu/elf18 et le peptide AtPep1 chez *A. thaliana* (Gomez-Gomez & Boller, 2000 ; Zipfel *et al.*, 2006 ; Yamagushi *et al.*, 2006). Les récepteurs RLP (receptor-like proteins) constituent une autre classe de récepteurs capables de reconnaitre des PAMP. Les RLP sont des protéines transmembranaires constituées de la partie extracellulaire des

récepteurs LRR mais dépourvues de domaine intracellulaire de transduction du signal (Wang *et al.*, 2008 ; Zipfel, 2009). Parmi eux, le récepteur de tomate LeEIX1 (*ethylene-inducing xylanase*) est capable de reconnaitre la xylanase fongique EIX1 (Ron & Avni, 2004). Citons deux autres exemples de récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'éliciteurs tels que GBP (*glucan-binding protein*) chez le soja, capable de fixer l'heptaglucane de *Phytophthora sojae* (Umemoto *et al.*, 1997), et la protéine transmembranaire CeBIP (chitin-binding protein) chez le riz, similaire aux récepteurs RLP qui est capable de fixer la chitine (polymère de β-1,4 N-acétylglucosamine ; Miya *et al.*, 2007). Dans certains cas, d'autres molécules peuvent jouer le rôle de co-récepteurs telles que CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*) ou BAK1 (*brassinosteroid receptor 1-associated kinase 1*) dans la perception de PAMP par des récepteurs RLP (Zipfel, 2009 ; Postel & Kemmerling, 2009).

La PTI, immunité basée sur la reconnaissance des PAMP, est considérée comme la première ligne de défense active de la plante. Les PAMP sont des molécules très conservées et indispensables qui sont caractéristiques de la plupart des micro-organismes. Au cours de l'évolution se sont développés des agents pathogènes ayant élaborés des stratégies pour infecter les plantes hôtes en contournant la reconnaissance ou en inhibant les étapes de signalisation ultérieures de la plante. Dans la plupart des cas, les agents pathogènes réussissent à contourner ces défenses en produisant des molécules effectrices qui interfèrent avec la PTI. Mais dans une dynamique de coévolution entre les plantes et les agents pathogènes, la plante élabore une nouvelle stratégie de défense en produisant des protéines (codées par des gènes de résistance R) capables de reconnaitre spécifiquement ces effecteurs (codés par des gènes d'avirulence *Avr*). Une perte ou une altération d'un de ces deux gènes peut conduire à la maladie. En revanche, la reconnaissance du produit du gène *Avr* par la protéine R est à l'origine d'événements de signalisation conduisant à la résistance de la plante. Ce deuxième type de défense active, appelé ETI (*effector-triggered immunity*), pourra de nouveau être détourné par de nouveaux effecteurs que la plante devra reconnaitre *via* la sélection de nouvelles protéines R (Jones & Dangl, 2006).

Espèce végétale	*Gène R de plantes*	Structure	Pathogène	*Gène Avr correspondant*
Tomate	*Pto*		*Pseudomonas syringae pv. Tomato*	*AvrPto*
A. thaliana	*RPW8*		*Erysiphe spp.*	*AvrRPW8*
A. thaliana	*RPM1*		*P. syringae pv. Maculicola*	*AvrRpm1, avrB*
A. thaliana	*RPP8*		*Peronospora parasitica*	*AvrRpp8*
A. thaliana	*RPS2*		*P. syringae pv. Tomato*	*AvrRpt3*
A. thaliana	*RPS5*		*P. syringae pv. Tomato*	*AvrPphB*
Pomme de terre	*Rx*		*Virus X de la pomme de terre*	*Protéine du virus*
Orge	*Mla6*		*Blumeria graminis*	*Avr-M16*
Riz	*Pi-ta*		*Magnoporthe grisea*	*AvrPita*
A. thaliana	*RPP5*		*P. parasitica*	*AvrRpp5*
A. thaliana	*RPS4*		*P. syringae pv. Pisi*	*AvrRps4*
Lin	*L6*		*Melamspora lini*	*AvrL6*
Lin	*Mla6*		*M. lini*	*AvrM*
Tabac	*N*		*Virus de la mosaïc du tabac*	*Replicase*
Tomate	*Cf-2*		*Cladosporium fulvum*	*Avr2*
Tomate	*Cf-4*		*C. fulvum*	*Avr4*
Tomate	*Cf-5*		*C. fulvum*	*Avr5*
Tomate	*Cf-9*		*C. fulvum*	*Avr9*
Riz	*Xa21*		*Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*	*AvrXa21*

Domaine protéine kinase
Région transmembranaire
Région riche en leucines répétées (LRR)
Domaine leucine zipper/coil-coil (LZ-CC)
Site de liaison aux nucléotides (NBS)
Domaine toll/ récepteur à l'interleukine 1 (TIR)

Tableau 2 : Classification des gènes de résistance R et des gènes d'avirulence correspondants. D'après Nürnberger *et al.* (2004).

2.1.1.2. La résistance race-spécifique ou ETI (Effector-triggered immunity)

Selon le concept « gène pour gène » (Flor, 1971), une plante hôte possède le gène de résistance R correspondant au gène d'avirulence *Avr* du pathogène. Les effecteurs sont secrétés par des pathogènes tels que les bactéries, les champignons ou encore les oomycètes (Chisholm *et al.*, 2006 ; Stergiopoulos & de Wit, 2009 ; Schornack *et al.*, 2009 ; Dodds & Rathjen, 2010), pouvant être reconnus de manière directe ou indirecte par la plante (Chisholm *et al.*, 2006 ; Jones & Dangl, 2006). Les bactéries pathogènes des animaux sont connues pour sécréter un nombre limité d'effecteurs dans les cellules hôtes alors que les bactéries pathogènes de plante comme *Pseudomonas syringae* sont capables de sécréter 20 à 30 effecteurs durant l'infection (Chang *et al.*, 2005). Les bactéries gram négatives ont acquis un système de sécrétion de type 3 (TTSS), processus le mieux caractérisé à ce jour, par lequel les effecteurs sont délivrés dans le cytoplasme de la plante hôte dans le but de contourner la PTI. Toutefois, le processus d'injection d'effecteurs cytoplasmiques dans la cellule hôte par les champignons et oomycètes qui ne possèdent pas ce système de sécrétion TTSS demeure inconnu à ce jour.

Les produits des gènes de résistance R, jouant le rôle de récepteurs intracellulaires capables de reconnaitre des effecteurs cytoplasmiques de pathogène, comportent majoritairement des domaines LRR et NBS (*nucleotide-binding site*) conservés chez les différentes espèces végétales (Dangl & Jones, 2001 ; Tableau 2). D'autres protéines R présentent des domaines LZ-CC (*leucine zipper coil/coil domain*) ou TIR (*toll/interleukin-1 receptor*). Parmi les différents modèles de pathosystèmes décrits, la protéine R peut interagir physiquement avec l'effecteur du pathogène ; on parle alors de reconnaissance directe de l'effecteur. C'est le cas de la protéine R Pi-Ta chez le riz qui interagit physiquement avec la protéine avirulente AvrPita de l'oomycète *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.*, 2000), mais également de la protéine Pto chez la tomate qui reconnait l'effecteur AvrPto produit par la bactérie *P. syringae* (Tang *et al.*, 2006) ou encore de l'effecteur AvrL6 issu de *Melampsora lini* reconnu par la protéine de résistance L chez le lin (Dodds *et al.*, 2006). Cependant, dans de nombreux autres pathosystèmes, aucune interaction directe n'a été mise en évidence. Le modèle basé sur « l'hypothèse de garde » propose que l'effecteur soit reconnu de manière indirecte par la plante (Van der Biezen & Jones, 1998 ; Dangl & Jones, 2001). Une protéine R de l'hôte

reconnaitrait soit le complexe formé entre l'effecteur et la cible de pathogénicité de l'hôte, soit la cible de pathogénicité modifiée suite à son interaction avec l'effecteur. L'exemple le mieux caractérisé est la protéine RIN4 (RPM1 interacting 4) d'*A. thaliana* qui est la cible des deux effecteurs AvrRpt2 et AvrRPM1 secrétés par *P. syringae*, qui vont respectivement cliver et phosphoryler RIN4. Une fois modifiée, la protéine RIN4 est alors détectée par les protéines R RPM1 et RPS2, ce qui initie l'activation des défenses de la plante (Kim *et al.*, 2005). Citons également l'effecteur AvrPphB, une protéase sécrétée par *P. syringae* qui durant l'infection clive la protéine PBS1 de l'hôte. Sous forme clivée, cette dernière est alors reconnue par la protéine de résistance RPS5, ce qui conduit à l'activation des défenses d'*A. thaliana* (Shao *et al.*, 2003).

2.1.2. Les principaux éléments de la transduction du signal

2.1.2.1. Les flux ioniques à travers la membrane plasmique

La perception de l'agent pathogène conduit à la mise en place d'une cascade d'événements de signalisation intracellulaire concourant à une réponse adaptative de la plante (Jones & Dangl, 2006).

Parmi les premiers événements de signalisation mis en évidence suite à la perception d'un pathogène figurent des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique qui se manifestent notamment par des influx de Ca^{2+} et des efflux de NO_3^-, de Cl^- ou encore de K^+ (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Ces flux d'ions induisent une dépolarisation de la membrane plasmique dont l'amplitude et la durée dépendent de l'éliciteur.

Le Ca^{2+} est considéré comme un second messager clé des événements de signalisation cellulaire induit en réponse à un pathogène ou à un éliciteur (Dodds & Rathjen, 2010). Pour de nombreux modèles, des influx de Ca^{2+}, des échanges d'ions K^+/H^+ mais également des efflux de NO_3^- et de Cl^- ont été rapportés en réponse à des éliciteurs chez des plantes comme le persil, le tabac ou *A. thaliana* (Nurnberger *et al.*, 1994 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002). En effet, des mesures de l'incorporation de $^{45}Ca^{2+}$ dans la cellule ont permis de montrer un influx de Ca^{2+} suite à différents éliciteurs tels que BcPG1, Pep13 ou les OG

respectivement chez la vigne, le persil et le tabac (Mathieu *et al.*, 1991 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Nurnberger *et al.*, 2004 ; Vandelle *et al.*, 2006). De plus, plusieurs méthodes de mesure de la concentration en Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$) dans la cellule *in vivo* ont rapporté que la concentration en Ca^{2+} cytosolique libre ($[Ca^{2+}]_{cyt)}$ pouvaient varier de 100 nM jusqu'à 1-5 µM après seulement 2 à 5 mn d'élicitation (Zhao *et al.*, 2005). Il est proposé que chaque éliciteur serait capable d'induire des variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ qui lui seraient spécifiques : ce concept est appelé la « signature calcique » de l'éliciteur (Lecourieux *et al.*, 2006). Cette élévation de la $[Ca^{2+}]$ dans le cytosol serait préalable à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ dans d'autres compartiments cellulaires, dont notamment 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, peuvent notamment figurer des pompes Ca^{2+}-ATPases, des échangeurs $Ca^{2+/}H^{+}$, des canaux de type CNGC (cyclic nucleotide-gated channel), de type TPC (two pore channels) ou encore des récepteurs au glutamate (Dodds *et al.*, 2010).

L'implication de flux d'anions dans la signalisation cellulaire en réponse aux éliciteurs a été mise en évidence essentiellement par des approches biochimiques et pharmacologiques (Zimmermann *et al.*, 1998 ; Jabs *et al.*, 1997). Chez le tabac, l'efflux d'anions NO_3^- et Cl^- a notamment été décrit comme un événement de signalisation précoce puisque observable dans les cinq premières minutes suivant le traitement par l'éliciteur cryptogéine (Pugin *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002). Gauthier *et al.* (2007) ont rapporté que l'influx de Ca^{2+} module l'efflux de NO_3^- qui est fortement impliqué dans la dépolarisation de la membrane plasmique. L'efflux de NO_3^- contrôle à son tour l'influx de Ca^{2+} *via* l'activation de canaux voltage-dépendants perméables au Ca^{2+}, concourants ainsi à la modulation des événements Ca^{2+}-dépendants tels que la production de FAO (formes actives de l'oxygène). Des efflux de Cl^- à travers la membrane plasmique ont précédemment été observés lors de réponses de défense chez un certain nombre de plantes, tout comme des efflux de K^+ dans des suspensions cellulaires de tabac en réponse à la cryptogéine (Jabs *et al.*, 1997 ; Pugin *et al.*, 1997 ; Nurnberger *et al.*, 2004).

2.1.2.2. La production de FAO

Les FAO sont produites tout au long de la vie de la plante mais également en réponse à des stress biotiques et abiotiques. Les FAO, dont les principales sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), peuvent contribuer à limiter le développement du pathogène de part leur toxicité mais également en renforçant les parois cellulaires de la plante. La production de FAO a notamment été rapportée durant les premières étapes de l'établissement de la RH après reconnaissance de pathogènes de nature fongique, bactérienne ou encore virale (Lamb & Dixon, 1997). De nombreuses études ont montré qu'une activité NADPH oxydase était la source enzymatique de la production de H_2O_2 impliquée dans les mécanismes de défense des plantes (Pugin *et al.*, 1997 ; Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2002 ; Torres & Dangl, 2005). Les NADPH oxydases ont été initialement décrites chez les mammifères comme des complexes impliqués dans la régulation de la mort du pathogène au sein des neutrophiles (Lambeth, 2004). L'enzyme, composée de deux sous-unités $gp91^{-phox}$ et $p22^{-phox}$, est localisée au niveau de la membrane plasmique. Nommée Rboh (pour respiratory burst oxydase homologue), la NADPH oxydase est retrouvée chez un grand nombre d'espèces végétales telles que le riz, la tomate, la pomme de terre, le tabac ou *A. thaliana* (Torres & Dangl, 2005). Par exemple, dix homologues *Rboh* (A à J) ont été identifiés dans le génome d'*A. thaliana* (Torres *et al.*, 1998 ; Sagi & Fluhr, 2006). Chez les plantes, la NADPH oxydase est composée de six domaines transmembranaires conservés, de deux domaines de fixation respectifs du FAD et du NADPH (extrémité C-terminale) ainsi que de deux motifs EF-hands (extrémité N-terminale) qui lient le Ca^{2+} (Torres *et al.*, 1998 ; Torres & Dangl, 2005 ; Sagi & Fluhr, 2006). L'activité de la NADPH oxydase est directement régulée par la fixation de Ca^{2+} mais également par phosphorylation, par une kinase de type calcium-dependent protein kinase (CDPK), au niveau de son extrémité N-terminale (Kobayashi *et al.*, 2007).

D'un point de vue enzymatique, les NADPH oxydases catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en $O_2^{\cdot -}$, en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, ce qui aboutit à la libération d'un proton dans le cytosol (Pugin *et al.*, 1997). L'$O_2^{\cdot -}$ formé est rapidement dismuté en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD), une espèce plus stable et capable de diffuser au travers des membranes (Wojtaszek *et al.*, 1997). Dans les cellules de tabac, la NADPH oxydase responsable de la production de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine est codée

par le gène *NtRbohD (Nicotiana tabacum respiratory burst oxidase homologue D ;* Simon-Plas *et al.,* 2002). De nombreux travaux ont relaté une production rapide et transitoire de H_2O_2 après élicitation, appelée « burst oxydatif ». Dans les suspensions cellulaires, la production de H_2O_2 atteint une valeur maximale après 10 à 30 mn de traitement selon l'éliciteur (Simon-Plas *et al.,* 2002 ; Aziz *et al.,* 2003 ; Poinssot *et al.,* 2003 ; Van Loon *et al.,* 2008). Cette production de FAO semble être en lien étroit avec les autres événements cellulaires. En effet, des approches pharmacologiques ont montré que la production de FAO est dépendante d'un influx de Ca^{2+}, de la production de monoxyde d'azote (NO) et peut également moduler la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ chez le tabac en réponse à la cryptogéine (Lecourieux *et al.,* 2002 ; Vandelle *et al.,* 2006).

2.1.2.3. La production de NO

Le NO est une espèce radicalaire, gazeuse et diffusible qui est formée chez les animaux lors de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par les NO synthases (NOS ; Stuehr *et al.,* 2004). Toutefois, aucune NOS végétale n'a été identifiée à ce jour, bien que des activités enzymatiques similaires aient été mesurées (Gupta *et al.,* 2010 ; Moreau *et al.,* 2010). Les voies enzymatiques de synthèse caractérisées à ce jour correspondent à une nitrate réductase ayant comme substrat les nitrites, ainsi qu'aux polyamines oxydases dont la voie de synthèse est dépendante de la L-arginine (Besson-Bard *et al.,* 2008). Chez les plantes, la production de NO est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la germination, la floraison, la croissance racinaire ou encore la fermeture stomatique (Besson-Bard *et al.,* 2008). De part sa nature radicalaire, le NO est capable d'interagir avec un grand nombre de molécules comme les FAO et plus précisément l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ pour former le peroxinitrite ($ONOO^-$), qui va agir en modifiant des résidus tyrosyls de protéines cibles par un mécanisme de tyrosine nitration. Le NO peut aussi agir plus directement sur des protéines cibles par le biais de modifications post-traductionnelles (MPT) comme la S-nytrosylation. Cette modification correspond à la formation d'une liaison entre le cation nitrosonium NO^+, issu de l'oxydation du NO, et le groupement thiol de résidus cystéinyls réduits de protéines cibles.

Une production de NO a été rapportée en réponse aux éliciteurs et à des micro-organismes potentiellement pathogènes (Lamotte *et al.*, 2004). Une fois produit, le NO contribue à l'enrichissement du cytosol en Ca^{2+} libre *via* la mobilisation du Ca^{2+} stocké dans des réservoirs internes provenant de réservoirs internes. Le NO peut également contribuer à la synthèse de H_2O_2 selon le modèle d'étude et moduler l'expression de gènes de défense (Grun *et al.*, 2006 ; Vandelle *et al.*, 2006).

2.1.2.4. Le rôle des phytohormones

Les phytohormones telles que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) ou l'éthylène (ET) jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques mais également dans les réponses de défense des plantes notamment dans la résistance aux micro-organismes pathogènes (Glazebrook *et al.*, 2005 ; Lorenzo & Solano, 2005 ; Broekaert *et al.*, 2006 ; Loake & Grant, 2007 ; Balbi & Devoto, 2008). La signalisation dépendante du SA est généralement associée à l'attaque de pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes alors que les signalisations du JA et de l'ET sont associées aux réponses de défense induites contre des agents pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts (Glazebrook *et al.*, 2005). De récentes études ont relaté l'implication d'autres phytohormones, initialement étudiées dans les étapes de développement et la croissance, dans la mise en place des réponses adaptatives des plantes à des stress biotiques et abiotiques : ce sont des brassinostéroïdes, des auxines, des gibbérellines, des cytokinines ou encore l'acide abscissique (ABA ; Pieterse *et al.*, 2009 ; Truman *et al.*, 2010).

2.1.3 Les réponses de défense

La perception de l'agent pathogène par la plante se traduit par l'activation de voies de signalisation cellulaire qui conduisent notamment à la reprogrammation de l'expression de gènes, plus particulièrement de gènes de défense, nécessaire à la mise en place de réponses de défense adaptées. Les produits de ces gènes correspondent à des protéines PR (pour

pathogenesis related) ou sont entre autre impliqués dans les renforcements pariétaux, les voies de synthèse de composés antimicrobiens ou encore dans la mise en place de la RH.

2.1.3.1. Renforcement de la paroi cellulaire

Pour accéder aux nutriments constitués du contenu cellulaire végétal, la plupart des agents pathogènes sont capables de synthétiser et de sécréter des enzymes hydrolytiques telles que des pectinases, des cutinases ou des polygalacturonases, qui contribuent à la dégradation de la cuticule et de la paroi cellulaire. La perception des produits de dégradation pariétaux par la plante induit l'activation de mécanismes de défense, certains conduisant à l'inhibition des enzymes de dégradation du pathogène et d'autres au renforcement de la paroi (De Lorenzo & Ferrari, 2002). Ce renforcement se traduit par une réorganisation structurale et chimique de la paroi due au dépôt de molécules nouvellement synthétisées telles que la lignine, la callose, la subérine ou des composés phénoliques toxiques, mais également par le recrutement de protéines riches en hydroxyproline et en glycine (Lherminier *et al.*, 2003 ; Huckelhoven, 2007). Le renforcement pariétal est également lié à la production de FAO nécessaire à la lignification des parois cellulaires (Huckelhoven, 2007). La lignification confère à la cellule une meilleure résistance aux pressions mécaniques (Bechinger *et al.*, 1999) et contribue également à limiter le développement de l'agent pathogène.

2.1.3.2. La synthèse de composés antimicrobiens

En réponse à une infection par un pathogène ou à des stimuli de nature abiotique, la plante peut également synthétiser des composés antimicrobiens communément appelés phytoalexines (Hammerschmidt, 1999 ; Grayer & Kokubun, 2000). Les phytoalexines sont des composés produits par la majorité des plantes et de nature chimique variée (Dixon, 2001), comme les dérivés des phénylpropanoïdes, les dérivés des flavonoïdes ou encore les sesquiterpènes qui peuvent exercer une activité toxique directe sur les agents pathogènes (Hammerschmidt, 1999). La camalexine est la phytoalexine la plus représentative chez *A. thaliana*. Elle participe entre autres à la résistance contre certaines souches de champignons

Famille	Membre type	Fonctions	Symbole du gène
PR-1	PR-1a de Tabac	Inconnue	*Ypr1*
PR-2	PR-2 de Tabac	β-1,3 glucanase	*Ypr2,* [*Gns2 ('Glb')*]
PR-3	P, Q de Tabac	Chitinase type I,II, IV, V, VI, VII	*Ypr3, Chia*
PR-4	R' de Tabac	Chitinase type I, II	*Ypr4, Chid*
PR-5	S de Tabac	*Thaumatin-like*	*Ypr5*
PR-6	Inhibiteur 1 de Tomate	Inhibiteur de protéase	*Ypr6, Pis ('Pin')*
PR-7	P_{69} de Tomate	Endoprotéase	*Ypr7*
PR-8	Chitinase de Concombre	Chitinase type III	*Ypr8, Chib*
PR-9	Peroxydase de Tabac formant la lignine	Peroxidase	*Ypr9, Prx*
PR-10	"PR-1" de Persil	*Ribonuclease-like*	*Ypr10*
PR-11	Chitinase de "Classe V" de Tabac	Chitinase, type I	*Ypr11, Chic*
PR-12	Rs-AFP3 de Radis	Défensine	*Ypr12*
PR-13	THI2.1 d'Arabidopsis	Thionine	*Ypr13, Thi*
PR-14	LTP4 d'Orge	Protéines de transfert de lipides	*Ypr14, Ltp*
PR-15	OxOa (germine) d'Orge	Oxalate oxydase	*Ypr15*
PR-16	OxOLP d'orge	*Oxalate oxydase-like'*	*Ypr16*
PR-17	PRp27 de Tabac	Inconnue	*Ypr17*

Tableau 3 : Familles des protéines PR. D'après Sels *et al*. (2008).

nécrotrophes comme *Alternaria brassicicola* ou *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1999 ; Ferrari *et al.*, 2003). Les glucosinolates produits chez les Brassicacées, qui jouent un rôle important dans la résistance contre des herbivores (Halkier & Gershenzon, 2006), les stilbènes produits chez la vigne (Belhadj *et al.*, 2008) ou encore les saponines produites chez la tomate (Martin-Hernandez *et al.*, 2000) sont d'autres exemples de phytoalexines impliquées dans la résistance contre les micro-organismes pathogènes.

2.1.3.3. Les protéines PR

La mise en place de défenses actives de la plante peut s'accompagner de la synthèse de protéines PR. Le rôle des protéines PR dans les réponses de défenses a été rapporté chez de nombreuses espèces végétales telles que le persil, le tabac, *A. thaliana*, la vigne ou encore l'orge, et ce en réponse à de nombreux agents pathogènes (Van Loon *et al.*, 2006). Selon leurs propriétés biochimiques et biologiques, les protéines PR ont été classées en 17 familles (Sels *et al.*, 2008 ; Tableau 3). Bien que la fonction de certaines d'entre elles reste encore indéterminée (à savoir PR-1 et PR-17), la plupart ont des propriétés antimicrobiennes en dégradant la paroi des agents pathogènes et/ou en présentant une toxicité vis-à-vis du pathogène. C'est notamment le cas des β-1,3-glucanases (PR-2) et des différentes familles de chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) qui ont une action directe sur la paroi des champignons. Les endoprotéases de la famille PR-7 pourraient elles aussi contribuer à la dégradation de la paroi de certains microbes. A l'inverse, les défensines (PR-12), les thionines (PR-13) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14) présentent quant à elles des propriétés antimicrobiennes en agissant au niveau de la membrane plasmique des micro-organismes pathogènes (Broekaert *et al.*, 1995 ; Garcia-Olmeda *et al.*, 1995 ; Epple *et al.*, 1997). Les *thaumatin-like* protéines (PR-5) et la famille de protéines PR-1 ciblent préférentiellement les oomycètes alors que certaines *ribonuclease-like* protéines (PR-10) joueraient un rôle dans la défense contre les virus. Les inhibiteurs de protéases (PR-6) mais également les chitinases cibleraient les nématodes ainsi que les insectes herbivores. Les peroxydases (PR-9) participeraient quant à elles au renforcement de la paroi végétale en catalysant la lignification. Enfin, certaines familles de protéines telles que PR-15 (oxalate

oxydases) et PR-16 (*oxalate oxydase-like* protein), synthétisées chez les monocotylédones, présentent des activités SOD qui génèrent du H_2O_2 à partir d'anions superoxyde $O_2^{\cdot -}$ (Van Loon *et al.*, 2006).

L'expression de la plupart des gènes codant ces protéines PR est finement régulée et est notamment sous le contrôle des voies de signalisation dépendantes du SA, JA et/ou ET (Van Loon *et al.*, 2006). Par exemple, bien que sa fonction reste inconnue, la protéine PR-1 est utilisée comme marqueur de la voie de défense SA-dépendante et de la RSA. De leur côté, Penninckx *et al.* (1998) ont mis en évidence que, chez *A. thaliana,* l'infection par des champignons nécrotrophes ou l'application exogène de JA et/ou d'ET s'accompagnaient de l'expression de gènes de défense incluant notamment ceux codant les protéines PR-12, PR-13 et PR-6.

2.1.3.4. La réponse hypersensible (RH)

La RH est une réponse de défense observée dans de nombreuses interactions plantes/micro-organismes, qui se caractérise par une mort cellulaire localisée au site de pénétration du micro-organisme, conduisant à l'apparition de lésions nécrotiques. La RH est considérée par certains auteurs comme l'étape finale de la mise en place de la résistance (Mur *et al.*, 2008). Ce processus aurait pour but de confiner le pathogène à son site de pénétration, en limitant l'accès aux nutriments nécessaires à son développement (Greenberg & Yaho, 2004). La RH s'avère efficace lors d'attaques de micro-organismes pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes qui ont besoin des cellules vivantes de l'hôte pour se développer (Glazebrook, 2005). En revanche la RH peut être néfaste pour la plante, lors d'attaques de pathogènes nécrotrophes tel que le champignon *B. cinerea*, dont le développement nécessite des tissus morts comme source nutritive (Govrin & Levin, 2000).

De nombreux travaux s'accordent à présenter la RH comme une forme de mort cellulaire programmée (PCD) qui serait similaire au processus d'apoptose chez les animaux (Greenberg & Yaho, 2004). En effet, la RH se caractérise par plusieurs événements cellulaires communs à l'apoptose, incluant la rétractation du cytoplasme, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le relargage du cytochrome c de la mitochondrie ou encore

l'intervention de protéases (Mur *et al.*, 2008). De part de récents travaux, la RH est désormais considérée comme une forme de PCD bien distincte (Mur *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires concourant à l'établissement de la RH demeurent aujourd'hui sujets de controverses et semblent dépendre du pathosystème considéré. En effet, chez *A. thaliana* le gène *NDR1* réprime la HR lors de l'infection par certaines souches avirulentes de *P. syringae* qui produisent l'effecteur AvrB, alors que le même gène *NDR1* participe à l'établissement de la RH lors d'une infection par des souches bactériennes qui synthétisent l'effecteur AvRpt2 (Shapiro & Zhang, 2001). Parmi les événements cellulaires précocement mobilisés en réponse aux éliciteurs, effecteurs ou micro-organismes pathogènes, certains ont été associés au développement de la RH. C'est par exemple le cas de l'efflux d'anions et des variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ observés dans des suspensions cellulaires de tabac traitées par la cryptogéine (Wendehenne *et al.*, 2002 ; Lecourieux *et al.*, 2006 ; voir § 2.2.2.2 de cette section). Si le NO ou l'H_2O_2 seuls ne semblent pas jouer un rôle central dans la mort cellulaire de type RH, une régulation fine de la balance NO/FAO est nécessaire pour l'établissement de la RH (Delledonne *et al.*, 2001 ; Binet *et al.*, 2001 ; De Pinto *et al.*, 2002). Enfin, la peroxydation des lipides qui entraîne la perturbation des membranes, semble également jouer un rôle important dans l'établissement de la RH (Mur *et al.*, 2008). La formation de lipides peroxydés est dépendante de la voie des FAO mais également de la voie enzymatique des lipoxygénases. Montillet *et al.* (2005) ont notamment relaté la peroxydation de lipides chez le tabac, lors de l'établissement de la RH en réponse au pathogène avirulent *P. syringae* pv. *syringae*.

2.1.3.5. La potentialisation

En plus de la reconnaissance du pathogène, la résistance de la plante dépend également de la rapidité et/ou de l'intensité de la mise en place des réponses de défenses (Conrath *et al.*, 2006). L'application d'un premier stress, ou de certains composés, peut conduire la plante à mobiliser ses mécanismes de défenses plus efficacement lors d'un stress ultérieur, identique ou non au premier. Ce processus est appelé « potentialisation » ou « priming », par analogie avec un phénomène décrit chez les monocytes et les macrophages de mammifères (Conrath *et al.*, 2002).

La potentialisation des réactions de défense chez les plantes peut être induite par des agents pathogènes (Sticher *et al.*, 1997) : on parle alors de RSA. Elle peut également être induite par des organismes bénéfiques tels que les rhizobactéries (Pieterse *et al.*, 1996) et les champignons mycorhizogènes (Pozo *et al.*, 2002), ce qui conduit à la résistance systémique induite (RSI), ou encore par la blessure (Ton *et al.*, 2007 ; Chassot *et al.*, 2008). L'application de composés naturels ou synthétiques peut aussi initier le processus de potentialisation. C'est le cas du SA, capable de potentialiser des cellules de persil (Thulk & Conrath, 1998), ainsi que ses analogues synthétiques tels que le BTH (benzothiadiazole) ou l'INA (acide 2,6-dichloroisonicotinique ; Kauss *et al.*, 1992 ; Katz *et al.*, 1998). L'acide β–aminobutyrique, un acide aminé non protéique couramment appelé BABA, possède également des propriétés potentialisatrices chez un grand nombre d'espèces végétales telles que *A. thaliana*, la vigne, le tabac, la tomate, le maïs ou encore le pois (Zimmerli *et al.*, 2000 ; Jakab *et al.*, 2001).

Enfin, certains composés microbiens comme les lipopolysaccharides (LPS) ou les exopolysaccharides peuvent exercer un rôle de potentialisateur selon l'espèce végétale. Par exemple, les LPS, composants de la membrane externe de bactéries gram négatives, confèrent au poivron une meilleure résistance vis-à-vis des bactéries *Xanthomonas axonopodis* et *X. campestris via* la potentialisation d'une production élevée de dérivés phénoliques et de l'expression de gènes codant des protéines PR dont notamment la famille PR-2 (Newman *et al.*, 2002).

Bien que les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la potentialisation demeurent peu connus, il a été proposé que l'état de potentialisation d'une plante puisse être associé à l'accumulation de protéines demeurant inactives. Un stress ultérieur induirait l'activation de ces dernières, contribuant ainsi à une transduction du signal amplifiée et plus rapide, qui conduirait à la mise en place de réponses de défense adaptées et très efficaces (Conrath, 2011).

2.1.3.6. La résistance systémique acquise (RSA)

La perception d'une attaque localisée de pathogènes par la plante peut conduire à la mise en place de la RSA, une forme de résistance qui s'établit dans la plante entière par

l'intermédiaire du système vasculaire (Sticher *et al.*, 1997). La RSA, effective au minimum plusieurs semaines, contribue à la protection de la plante contre l'attaque ultérieure d'un large spectre de pathogènes (Durrant & Dong, 2004).

L'établissement de la RSA s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes codant certaines protéines PR mais fait également intervenir la voie de signalisation dépendante du SA, ce dernier s'accumulant au point d'infection ainsi que dans les tissus non infectés de la plante (Durrant & Dong, 2004). En effet, des plantes transgéniques *nahG*, qui expriment constitutivement une hydroxylase bactérienne qui dégrade le SA en catéchol inactif dans l'induction de la SAR, perdent leur capacité à mettre en place la RSA lors d'attaques par des pathogènes biotrophes tels que l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Thomma *et al.*, 1998). De même, le mutant *npr-1* (nonexpressor of PR genes 1), dont la voie de signalisation dépendante du SA est bloquée, présente le même phénotype (Thomma *et al.*, 1998). Néanmoins, le SA ne constituerait pas le signal mobile nécessaire à la propagation distale de la résistance dans la plante (Vernooij *et al.*, 1994). Ces dernières années, de nombreux travaux ont donc été menés pour identifier la nature des signaux requis dans l'établissement de la RSA. A ce titre, le méthyl salicylate (MeSA), un dérivé inactif du SA, a été identifié comme l'un des acteurs concourant à l'établissement de la RSA (Park *et al.*, 2007). En effet, le MeSA, véhiculé par le système vasculaire, contribue à une production distale de SA par l'intervention de protéines telles que SABP2 (*SA binding protein 2*) qui présente une activité MeSA estérase (Vlot *et al.*, 2008). Parmi les autres messagers mobiles impliqués dans l'établissement de la RSA figureraient entre autres le JA, l'acide azélaïque ou encore certains terpénoïdes (Shah, 2009).

2.1.3.7. La résistance systémique induite (RSI)

Certaines interactions bénéfiques entre les plantes et des rhizobactéries ou des agents mycorhizogènes contribuent à stimuler la croissance végétale mais également à renforcer la résistance de la plante contre des attaques ultérieures de pathogènes, phénomène autrement appelé résistance systémique induite (RSI ; Pieterse *et al.*, 1996; Van Loon *et al.*, 1998). La RSI, mise en évidence chez un grand nombre d'espèces végétales telles que le tabac, *A.*

thaliana, la tomate, le haricot ou encore le radis, est efficace contre un large spectre d'agents pathogènes fongiques, bactériens ou viraux (Van Loon *et al.*, 1998). L'établissement de la RSI, contrairement à celui de la RSA, est indépendant de la voie de signalisation du SA et serait régulé par les voies de l'éthylène et du JA (Van der Ent *et al.*, 2009). En effet, les mutants affectés dans les voies de signalisation dépendantes du JA (*jar1, jasmonic acid resistant 1*) et de l'éthylène (*etr1, ethylene resistant 1*) ne sont plus capables de développer une RSI (Pieterse *et al.*, 1998 ; Pieterse *et al.*, 1999 ; Ton *et al.*, 2001). La RSI s'accompagne également de la potentialisation des défenses à travers notamment la modulation de l'expression de gènes (Cordier *et al.*, 1998 ; Verhagen *et al.*, 2004).

2.1.3.8. La résistance systémique induite par blessure

Les blessures causées par l'attaque d'insectes herbivores peuvent conduire la plante à mettre en place des mécanismes de défense mobilisant une résistance systémique, dépendante de la production de JA, dans le but d'altérer le développement de l'herbivore (Schilmiller & Howe, 2005). Il a ainsi été rapporté que suite à une blessure, la résistance systémique mise en place par la plante peut s'accompagner de la production de composés organiques volatils (VOC) qui vont initier la potentialisation des défenses des plantes voisines saines (Engelberth *et al.*, 2004 ; Ferry *et al.*, 2004). La communication entre plantes voisines est notamment relatée par Ton *et al.* (2007), qui ont mis en évidence que l'exposition d'un plant de maïs sain aux VOC, produits par un plant attaqué par le ver du cotonnier, conduit à la potentialisation de l'expression de gènes de défense. Cette dernière s'accompagne d'un moindre développement de la larve et de l'attraction de la guêpe *Cotesia marginiventris*, un parasite de la larve (Ton *et al.*, 2007).

Une blessure mécanique peut également potentialiser les mécanismes de défense de la plante. C'est notamment le cas chez *A. thaliana* où une blessure induite par un pincement mécanique de la feuille s'accompagne du développement limité de *B. cinerea* mais également de la potentialisation des mécanismes de défense impliquant la production de camalexine et de glutathion (Chassot *et al.*, 2008).

2.1.4. Les modifications post-traductionnelles dans les réactions de défense

La mise en place et le contrôle des mécanismes de défense reposent donc sur le développement d'un réseau complexe de seconds messagers et d'éléments de signalisation, comme nous venons de le voir avec NO ou H_2O_2. Tout ce réseau de signalisation est décodé et relayé par un certain nombre de protéines cibles, notamment par les processus de modifications post-traductionnelles (MPT). Les MPT sont le plus souvent rapides, réversibles et catalysées par des enzymes spécifiques qui peuvent elles aussi être régulées par des MPT (Peck, 2006). Parmi les 300 types de MPT recensées figurent par exemple la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation/désacétylation ou encore la glycosylation (Jensen, 2004). L'une des illustrations les plus représentatives que l'on puisse donner de l'importance des MPT dans la mise en place et le contrôle des réactions de défense concerne l'implication du module MAPK (pour *mitogen activated protein kinase*) dans l'établissement de la RH induite par la cryptogéine. En effet, le module MAPK, qui comprend SIPK (pour *salicylic acid-induced protein kinase*) et WIPK (pour *wound-induced protein kinase*), est activé par phosphorylation après quelques minutes de traitement par la cryptogéine dans les cellules de tabac (Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). L'activation durable de SIPK et WIPK, pendant plusieurs heures, serait nécessaire et indispensable à l'induction de la RH et à la régulation de l'expression de certains gènes de défense (Yang *et al.*, 2001 ; Zhang & Liu, 2001). Plus particulièrement, SIPK régulerait l'expression de gènes de défense en contrôlant par phosphorylation un facteur de transcription, WRK1, son seul substrat identifié à ce jour (*in vitro*), et qui interviendrait également dans l'établissement de la RH (Menke *et al.*, 2005).

Dans le chapitre d'ouvrage qui suit, nous avons rédigé, sur invitation des éditeurs, une revue que nous avons voulu la plus complète possible sur l'implication des MPT dans un contexte de signalisation nucléaire. L'ouvrage publié par les éditions InTech étant consacré aux stress abiotiques, nous avons décrit les MPT de protéines nucléaires et les enzymes qui en sont responsables dans le contexte de la réponse cellulaire à ces stress abiotiques, sachant qu'une grande partie de cet article pourrait être aisément transposable à l'étude de la réponse cellulaire aux stress biotiques.

2.1.5. Chapitre d'ouvrage : " Post-translational modifications of nuclear proteins in the response of plant cells to abiotic stresses "

Jennifer Dahan [1,2,3], Emmanuel Koen [1,2], Agnès Dutartre [1,2], Olivier Lamotte [1,2], Stéphane Bourque [1,2,4]

[1] Université de Bourgogne, UMR Plante-Microbe-Environnement, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
[2] UMR 1088 INRA/CNRS 5184, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
[3] Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France
[4] GDR CNRS N°2688 'Calcium et régulation de l'expression des gènes en contexte normal et pathologique', 31000 Toulouse, France

InTech (2011) **4** : 77-112

4

Post-Translational Modifications of Nuclear Proteins in the Response of Plant Cells to Abiotic Stresses

Jennifer Dahan[1,2,3], Emmanuel Koen[1,2], Agnès Dutartre[1,2], Olivier Lamotte[1,2] and Stéphane Bourque[1,2,4]
[1]*Université de Bourgogne, UMR Plante-Microbe-Environnement*
Dijon cedex
[2]*UMR 1088 INRA – 5184 CNRS*
Dijon cédex
[3]*Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Centre de Versailles-Grignon*
Versailles Cedex
France

1. Introduction

For a long time, in plant cells as in animal cells, the nucleus was only considered as the organelle in which fundamental mechanisms such as replication and transcription occurred. While strong efforts were deployed in order to identify important families of transcription factors such as MYB, WRKY or TGA families (Dubos *et al*., 2010; Rushton *et al*., 2010), a few attention was devoted to our lack of knowledge about their regulation in regard to the physiological conditions of the plant cells. Whereas the major importance of post-translational modification of proteins is well established for several decades regarding cytosolic proteins, the last years have been characterized by the discovery that the plant cell nucleus also contains all the enzymes necessary to assume these fundamental reactions in terms of signal transduction. For example, Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) are well known protein kinases (PKs) involved in response to both biotic and abiotic stresses (for review see Dahan *et al.*, 2009). These MAPKs play a crucial role in the regulation of specific gene expression by phosphorylating particular transcription factors. However, while they are well described in the cytosol, only recently researchers focused on their presence and involvement in the nucleus of plant cells challenged by abiotic stresses (for example, Ahlfors *et al*., 2004). Unfortunately, these authors like the other ones involved in plant cell nucleus studies did not try to identify the targets of these MAPK. This example highlights the fact that our knowledge of the incidence of protein posttranslational modifications regarding the cellular activities is still poorly rudimental, and particularly in the field of abiotic stress responses.

Amongst the targets of these post-translational modifications, histones will be a piece of choice, being one of the favourite substrates for acetylation or methylation for example. Histones are small basic protein associated with DNA to form the chromatin. Chromatin

contains histone octamere composed by two copies of each histone H2A, H2B, H3 and H4 to form the histone core. Histones composing the histone core are extremely conserved in the different kingdoms. For example, histone H3 differs only by two amino acids in its sequence in rat and pea. The histone core is rolled by approximately 146 bps of DNA to form a nucleosome, the repeating unit of chromatin which provided a first level of DNA compaction. Association of nucleosome with other protein like histone H1 creates a structure named 30 nm chromatin fiber (Kornberg and Lorch, 1999; Hayes and Hansen, 2001). This fiber can be unfold by several protein grouped under the term chromatin remodeling complex to generate a 11 nm fiber, the template for transcription. The 11 nm fiber can also be repressive to transcription process but different types of protein complexes can affect the chromatin to modulate DNA accessibility to transcriptional machinery and at the end gene transcription. Histone tails and globular domains are subjected to a variety of posttranslational modifications such as acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, ADP ribosylation, deimination and proline isomerization. These covalent modifications of histones are important in chromatin dynamics (Kouzarides, 2007). It has been proposed that all the histone postranslationnal modifications constitute a code, "the histone code" associating to all the possible combinations of modification a particular state allowing biological process such as transcription of gene. This code is written by particular proteins: "the writers", interpreted by other proteins: "the readers" and erased by a last class of protein, "the erasers" (Figure 1). Readers could also be able to modify histones or to recruit other protein actin on chromatin (Strahl and Allis, 2000).

The goal of this book chapter is to summarize our current knowledge of the molecular actors and their regulations that lead to posttranslational modifications of nuclear proteins, and *in fine* to the regulation of specific target gene expression. For this purpose, a large number of nuclear enzymes that are involved in (de)phosphorylation, (de)acetylation, and (de)methylation of nuclear proteins, but also in nuclear protein degradation pathway associated with sumoylation and ubiquitination, and in changes of the redox state of the nuclear proteins will be presented and their roles illustrated by various but non exhaustive cell responses to abiotic stresses.

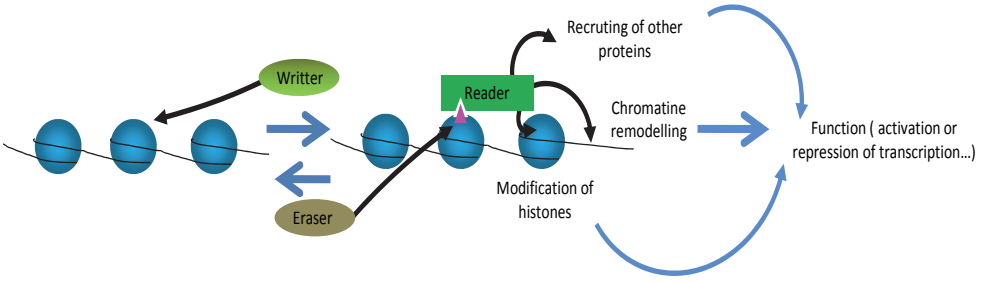


Fig. 1. Schematic representation of histone code. Writers can recognize chromatin area and add marks on histone (methylation, acetylation…). Theses labeling is dynamic because marks can be remove by erasers. They can also be recognized par readers, another group of proteins able to act directly or indirectly on chromatin structure. The final consequence can be a modification of the gene transcription in concerned loci.

2. Nuclear protein phosphorylation / dephosphorylation

Phosphorylation is probably the most prominent and major posttranslational modification in living organisms. This reversible modification consists on the covalent binding of a phosphate on aminoacids hydroxyl residues. In eukaryotes, phosphorylation occurs mainly on Ser, Thr and Tyr residues. This modification depends on the action of two types of enzymes with antagonistic activities: (i) PKs which phosphorylates and (ii) protein phosphatases (PPs) which remove phosphoryl groups from target proteins. The binding of the phosphoryl group alters the functional properties of target proteins in terms of activity, subcellular localization, protein-protein interactions or stability (Cohen, 2000). This versatility has made phosphorylation one of the major means for modulation of cellular activities, as phosphorylation status can be finely tuned as the result of the balance between PKs and PPs activities at a given time point on specific substrates. These enzymes are thus involved at every steps of signal transduction, from plasma membrane to final effectors. Although numerous studies like the ones regarding brassinosteroids, have investigated PKs, PPs and their targets in the plasma membrane and the cytoplasm (Li, 2005), only few ones has focused on those localized, temporarily or permanently, in the nuclear compartment, despite their involvement in critical processes for cell surviving (Dahan *et al.*, 2009). A recent phosphoproteomic analysis of the nuclear proteins from *Arabidopsis thaliana* showed that the identified phosporylated proteins cover a wide range of nuclear activities, indicating an equal importance of phosporylation in the modulation of nuclear activities as for the cytoplasmic ones (Jones *et al.*, 2009).

In plants, PKs constitute a superfamily of proteins, and according to their importance in cellular homeostasis, it was shown that around 4 % of *A. thaliana* genome encodes putative PKs (Champion *et al.*, 2004). According to their substrate specificities, PKs and PPs can be classified into three families: (i) Ser/Thr PKs/PPs, (ii) Tyr PKs/PPs and (iii) dual-specificity (Ser/Thr-Tyr) PKs/PPs. In plants, no functional Tyr PK has been described to date, although predicted (Miranda-Saavedra and Barton, 2007). Consistent with this, the relative abundance of phosphor-Ser, phosphor-Thr and phosphor-Tyr has been estimated in *A. thaliana* to 85 %, 11 % and 4 % respectively (Sugiyama *et al.*, 2008). Although Tyr (de)phosphorylation is thus accomplished through dual-specificity PKs/PPs, to date, the vast majority of studies have been focused on Ser/Thr PKs/PPs in plant.

More than half of the putative PKs from the *A. thaliana* genome fall in the clade of the so-called Receptor-Like protein Kinases (RLKs), which are transmembrane proteins probably acting as receptors of environmental stimuli (Tör *et al.*, 2009). The other part of plant PKs, which is of interest in this article, constitutes the clade of the "soluble" ones, and concerns all PKs found in the cytoplasm and the nucleus. This clade can be divided into numerous families and subfamilies, based on sequence similarities of the kinase domain and features of flanking sequences determining regulation properties (Hanks and Hunter, 1995; Champion *et al.*, 2004; Miranda-Saavedra and Barton, 2007); readers are invited to report to these works for more details). Although for a large part studied in the cytoplasm or at the plasma membrane level, members from almost all families have been found in the nuclear compartment (for a detailed review, see Dahan *et al.*, 2010). The majority of the available data on these nuclear PKs comes from subcellular distribution studies. Indeed for most of them their nuclear localization has been investigated using chimerical PKs fused to a fluorescent reporter, or immunolocalization studies based on specific antibodies. The

activity of the PKs in the nucleus has only been assessed in rare cases, impairing our understanding of their roles and functionality.

While the core catalytic domain of PKs derived from a single ancestor (Hanks and Hunter, 1995), PPs origins are more diversified (Moorhead *et al.*, 2009). In plants, around 160 sequences coding for putative catalytic subunit of PPs have been retrieved (Kerk *et al.*, 2002). They can be divided in three main families, based on catalytic domain sequences and enzymatic features: (i) the PPP (phophoprotein phosphatase) family, (ii) the PPM (metallodependent protein phosphatase) family, and (iii) the PTP (phosphotyrosine phosphatase) including the DSP (dual-specificity phosphatase). Readers are invited to refer to other reviews that detailed the features of these families (Kerk *et al.*, 2002; Luan, 2003; Moorhead *et al.*, 2009). As for plant PKs, PP functionalities in the nucleus have been poorly studied.

The role of several nuclear PKs in response to different abiotic stresses has been investigated in different model plants. To date, and despite the great diversity of PKs, only a few families have been shown to be involved in these signaling pathways at a nuclear level. Among them, the MAPK family is certainly the most studied family of PKs in the nucleus. MAPK is the last component of a cascade of three PKs, which are sequentially activated (Widmann *et al.*, 1999). The perception of an environmental stimulus drives the activation of the first PK of this transduction module, namely MAPKKK (MAPK kinase kinase). MAPKKK in turn activates by phosphorylation on a specific motif a MAPKK (MAPK kinase), which phosphorylates MAPK, the final effector, on conserved residues. This chain of phosphorylation is thought to take place in the cytoplasm, and the MAPK is then translocated upon activation by phosphorylation into the nucleus, where it modulates gene expression by acting on transcription factors. However the presence of MAPKK and MAPKKK in the nucleus was already reported (Dahan *et al.*, 2009).

Figure 2 illustrates, although partially, the known nuclear PKs that were shown to be involved in response to various abiotic stresses. Even though MAPK was involved in the response to many abiotic stresses on the basis of their activation in the cytosol, few of them have been demonstrated to localize and to act in the nuclear compartment. In fact in the context of abiotic stresses only one study showed the translocation in *A. thaliana* of two MAPKs, AtMPK3 and AtMPK6, following ozone exposure and using immunolocalization of the native protein (Ahlfors *et al.*, 2004). However contradictory results were obtained when these two MAPKs were expressed fused to GFP, and showed a constitutive nuclear and cytoplasmic localization (Yoo *et al.*, 2008). In addition to ozone exposure, these two MAPKs are furthermore activated in response to several abiotic stresses, such as cold, salt, drought, wounding and touch for AtMPK6 (Ichimura *et al.*, 2000) and osmotic stress for AMPK3 (Droillard *et al.*, 2002). The orthologs of AtMPK3 and AtMPK6 in tobacco, respectively WIPK (Wounding-Induced Protein Kinase) and SIPK (Salicylic acid-Induced Protein Kinase), are also activated in response to several environmental cues, such as high salinity and osmotic stresses, wouding and ozone exposure (Zhang and Klessig, 1998; Mikolajczyk *et al.*, 2000; Samuel and Ellis, 2002). They were shown to be nuclear, independently of any stimuli when fused to GFP (Menke *et al.*, 2005; Yap *et al.*, 2005), and the activity of SIPK could be retrieved in nuclear extracts of osmotically stressed tobacco cells (Dahan *et al.*, 2009), demonstrating its functionality in the nuclear compartment in response to environmental stresses.. A few substrates of MAPKs have been identified, and so their precise roles in response to abiotic stresses remain elusive. For the most part, their known targets are transcription factors. For example, SIPK was shown to phosphorylate *in vitro* the transcription factor WRKY1, involved in the expression of defense-related genes (Menke *et al.*, 2005). This suggests that

MAPKs, in response to different abiotic stresses, could be involved in the reprogramming of transcription patterns to allow the plant to cope with the perceived stresses. Given that, the overexpression or knock-out of several MAPKs impairs the outcome of the response to some abiotic stresses. The extinction of *Atmpk6* expression using RNAi and a loss-of-function mutation of *Atmpk3* both generate increased sensitivity to ozone leading to cell death, implying that these MAPK play an important role in the management of ozone stress by *A. thaliana* (Ahlfors *et al.*, 2004). Another *A. thaliana* MAPK, AtMPK4, has been shown to reside permanently in the nucleus along with the cytoplasm (Andreasson *et al.*, 2005; Kosetsu *et al.*, 2010). Although more studied for its potential role in cytokinesis (Kosetsu *et al.*, 2010) and its involvement in plant defense reactions (Andreasson *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008), its activity is observed upon application of stresses such as cold, salt and osmotic stresses (Droillard *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004). One substrate for this MAPK has been described in vitro: MKS1, which is a protein interacting with two WRKY transcription factors (Andreasson *et al.*, 2005). The phosphorylation of MKS1 by AtMPK4 is thought to result in the release of the WRKY33, which could then play its role as a transcriptional regulator (Qiu *et al.*, 2008). However, this interaction takes place in the context of defense reaction, and no data is available regarding functionality of AtMPK4 in response to abiotic stresses.

Stress	Kinase/phosphatase	HDAC/HAT
Cold	MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000) MPK4 (Droillard *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004)	AtGCN5/HAG1 (Servet *et al.*, 2010) HDA18, HDA19 (Alinsug *et al.*, 2009) SIR2 (Bond *et al.*, 2009)
Heat		HDA7 (Alinsug *et al.*, 2009)
Salt	MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000) SnRK2 (Halford and Hey, 2009) MPK4 (Droillard *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004)	HDA6 (Chen *et al.*, 2010) HDA19 (Chen and Wu, 2010) HDA2, HDA14 (Alinsug *et al.*, 2009) HD2C (Sridha and Wu, 2006)
Osmotic	MPK3 (Droillard *et al.*, 2002) MPK4 (Droillard *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004) SnRK2 (Halford and Hey, 2009)	
Drought	MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000) SnRK2 (Halford and Hey, 2009)	
Light		HDA19 (Tian *et al.*, 2003) HDA7 (Alinsug *et al.*, 2009) GCN5 (Benhamed *et al.*, 2006)
Ozone	MPK3, MPK6 (Ahlfors *et al.*, 2004)	
Wounding	MPK6 (Ichimura *et al.*, 2000)	HDA19 (Zhou *et al.*, 2005)

Fig. 2. An overview of nuclear enzymes involved in phosphorylation/dephosphorylation or acetylation/deacetylation processes in response to various abiotic stresses.

Not only MAPKs are the nuclear crossroads of abiotic stresses. Data that are piling up to put PKs and PPs at the centre of the regulation of the adaptative reponses of plant cells to osmotic, saline and hydric stresses, in link with ABA (abscisic acid), point out the role of other nuclear PK. In particular SnRK2 (for Snf1-Related protein Kinase) family is constituted of PKs initially characterized as ABA signalling factors. They can be categorized into three subclasses, and subsequent studies on rice and *A. thaliana* PKs demonstrated that all of the subclasses could be activated in response to osmotic stress, with subclasses II and III being also responsive to ABA (Halford and Hey, 2009). ABA is a phytohormone essential for the establishment of adaptative responses to drought and salinity stresses. Its accumulation leads to expression of ABA-responsive genes helping cells to cope with hydric and osmotic variations (Hubbard *et al.*, 2010). It was recently shown that at the heart of its signalling pathway in *A. thaliana* is a core complex composed of three subclass III SnRK2 called SnRK2D, E and I, and their cognate PPs PP2C. Indeed SnRK2s are rendered active upon phosphorylation on two critical residues in their activation loop (Belin *et al.*, 2006; Burza *et al.*, 2006; Boudsocq *et al.*, 2007). Recently, several PPs from the PP2C family have been shown to dephosphorylate these residues, thus inactivating the PKs. These partners have been colocalized in the nuclear compartment, where they interact in permanence (Umezawa *et al.*, 2009). Interestingly, the same SnRK2s were also shown to associate in the nucleus with AREB1, a transcription factor whose expression occurs during drought (Fujii *et al.*, 2009). A triple mutant plant impaired in the expression of SnRK2D, E and I exhibited a strongly reduced tolerance to drought, comforting the involvement of these PKs in response to water shortage. Accordingly, drastic changes was observed in response to ABA, high salinity stress and drought at the transcriptional level, with down-regulation of ABA responsive-genes as compared to wild type plants (Fujita *et al.*, 2009). Upon perception, water and osmotic stresses lead to production of ABA which in turn activates the transduction module composed of the PP2Cs and the SnRK2s. The signaling pathway is then achieved by phosphorylation of specific transcription factors, controlling a set of stress and ABA-responsive genes. Likewise, other SnRK2s have been characterized in several plant species that can phosphorylate ABA-responsive transcription factors. In wheat, the SnRK2 PKABA1 has been shown to interact with and phosphorylate *in vitro* TaABF, an ortholog of AREB1 (Johnson *et al.*, 2002). Furthermore, three rice SnRK2s were found to phosphorylate and activate another ortholog of AREB1, TRAB1 (Kobayashi *et al.*, 2005). However in the last two cases, the subcellular partitioning of the PK was not investigated. Recent data suggest that the transduction module composed of the SnRK2 and PP2C could be directly activated in the nucleus, meaning that the ABA receptor is expected to translocate after binding to its ligand.

Calcium is a well recognized second messenger, and as such its variations in the cytosol specifically induced by many stimuli promote specific signal transduction through decoding by a panel of Ca^{2+} sensor molecules (Kudla *et al.*, 2010). It is now well established that apart from the cytosol, nucleus is able to generate its own Ca^{2+} signatures following diverse environmental cues (Mazars *et al.*, 2009). Accordingly, Ca^{2+}-binding proteins have been localized in the nucleus, where they can decode Ca^{2+} variations into an appropriate response, like modulation of the expression of specific set of genes (Xiong *et al.*, 2006). Accordingly, several PKs and PPs potentially regulated by Ca^{2+} have been localized in the nucleus, where they are thought to decode nuclear Ca^{2+} variations into modifications of phosphorylation state of specific target proteins. The concerned PKs are mainly CDPKs

(Ca^{2+}-Dependent Protein Kinases) and CIPKs (Calcineurin B-like[CBL]-Interacting Protein Kinases). CDPKs are specifics to plant and exhibit in their sequence a CaM-like domain with three to four EF-hand Ca^{2+} binding motifs, rendering them directly dependent on Ca^{2+} binding for their activities (Klimecka and Muszynska, 2007). A study on the subcellular targeting performed for 9 of the 34 putative CDPK in *A. thaliana* showed that two of them, AtCPK3 and AtCPK4 are constitutively cytosolic and nuclear (Dammann *et al.*, 2003). AtCPK3 has been shown to be activated at the plasma membrane level following a salt stress, and in accordance to this putative involvement knock-out *Atcpk3* mutant plant exhibited altered resistance to salt stress, whereas it was improved in *Atcpk3* overexpressor mutant line (Mehlmer *et al.*, 2010). Intriguingly, no transcriptional changes in the expression of traditionally salt-stress related genes were observed, raising the question of AtCPK3 nuclear role (Mehlmer *et al.*, 2010). Apart salt stress, another CDPK, AtCPK32, has been found to be involved in ABA signaling, through interaction and phosphorylation with an ABA-responsive transcription factors, ABF4. Interestingly these two proteins are colocalized in the nucleus (Choi *et al.*, 2005). Whereas most of the CDPK studied show a constitutive partitioning between different sublocation and the nucleus, two CDPK from different species are suggested to translocate from the plasma membrane to the nucleus upon stresses. McCPK1 from *Mesembryanthemum crystallinum* is transcriptionnaly induced following salt- or water deficit stresses and when fused to GFP, translocate from the plasma membrane to the nuclear compartment (Chehab *et al.*, 2004). However the mechanisms and the functions of this phenomenon are not explained to date. Even if CDPKs are thought to have their activities regulated by Ca^{2+}concentrations in the cytosol (Harmon, 2003), recent data suggest that they could also be part of phosphorylation cascade, as for NtCDPK2 and NtCDPK3, complicating conventional signaling schemes (Witte *et al.*, 2010). Despite recent advances in the understanding of the functionality of Ca^{2+} variations, the ion still constitute a missing when it comes down to evaluate its part in the activation of specific signaling pathways.

3. Nuclear protein acetylation / deacetylation

The first descriptions of a nuclear protein modification by the chemical binding of an acetyl group on the amine function of lysine residues was observed on histone proteins (Allfrey *et al.*, 1964), explaining why enzymes responsible for the acetylation and deacetylation processes were named histone acetyltransferases (HATs; Gallwitz, 1971) and histone deacetylases (HDACs; Inoue and Fujimoto, 1969), respectively. However, based on their ability to act on proteins unrelated to histone such as transcription factors or coregulators of gene transcription, HATs and HDACs are more generally considered as lysine acetyl transferases and lysine deacetylases (Chen and Tian, 2007). All these proteins were reported to be located, exclusively or not, into the nucleus of plant cell.

3.1 Histone deacetylases (HDACs)

Concerning HDACs, plant genomes contain members that belong to two different families that are common to eukaryotes (Pandey *et al.*, 2002): the RPD3 (Reduced Potassium Dependency Protein 3) - HDA1 (Histone Deacetylase 1) superfamily, and SIR2 (Silent Information Regulator 2) family. The third family, termed HD2 (type-2 Histone Deacetylase), is specific to plant cells (Fu *et al.*, 2007).

The first member of the RPD3-HDA1 superfamily was identified in yeast in a complementation screen of a mutant for a high affinity potassium transporter (Vidal *et al.*, 1990). It was latter shown that RPD3 encodes the catalytic subunit of the HDB (Histone Deacetylase B) complex activity (Rundlett *et al.*, 1996). The first plant RPD3-HDAC member, ZmRpd3, was identified in maize thanks to its ability to functionally complement a yeast *rpd3* null mutant (Rossi *et al.*, 1998). Among the eleven *RPD3* genes identified in the maize genome, three of them (*ZmHDA101*, *ZmHDA102* and *ZmHDA108*) exhibit the same expression pattern, suggesting a possible functional redundancy among this gene family (Varotto *et al.*, 2003). In term of specificity, ZmRPD3s, like its counterpart in yeast, seem to specifically remove the acetyl tail of lysines of histone H4 (H4K5, H4K12) prior to its incorporation in chromatin (Lechner *et al.*, 2000). Homologs of ZmRPD3 were also identified in *A. thaliana* and classified in three different clades : Class I for the RPD3 group, Class II for the HDA1-like group, and Class IV for the AtHDA2 group (Alinsug *et al.*, 2009). Whereas 18 RPD3-like genes were identified from the genome analysis data, only *AtHD1* (also called *AtHDA19* or *RPD3A*) and *AtHDA6* were largely characterized. *AtHD1*, that is constitutively expressed, encodes a protein that localises both in the cytoplasm and in the nucleus, but is predominantly accumulated in the euchromatic region and excluded from the nucleolus (Varotto *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 2006). AtHD1 exhibits a histone deacetylase activity that removes the acetyl group of histone H3 (H3K9) and H4 (H4K5, H4K8, H4K12, H4K16; Tian *et al.*, 2003). AtHDA6, although it is the close homolog of AtHD1, exhibits major differences in term of expression and specificity. AtHDA6 is largely accumulated in the nucleoli (Probst *et al.*, 2004) and is a broad-specificity HDAC that removes the acetyl group of various lysines of histone H3 and H4 (H3K14, H4K5, H4K12; Earley *et al.*, 2006). In agreement with these differences in their expression profiles, AtHD1 and AtHDA6 are involved in different signalling pathways: AtHD1 regulates several developmental processes such as early senescence, floral organ identity or late flowering (Wu *et al.*, 2000; Tian and Chen, 2001; Tian *et al.*, 2005), by controlling the expression of a set of genes involved in protein synthesis, ionic homeostasis or plant hormonal regulation (Tian *et al.*, 2005). AtHDA6, due to its localisation in the nucleolus, is involved in the inhibition of the NORs (nucleolus organisation region; Probst *et al.*, 2004; Earley *et al.*, 2006), and evidences supporting roles in silencing transgenes and transposons were also reported (Murfett *et al.*, 2001; Aufsatz *et al.*, 2002; Lippman *et al.*, 2003; May *et al.*, 2005). In a structural point of view, a huge study was conducted with the RPD3-like HDACs of *A. thaliana* (Alinsug *et al.*, 2009). All members are characterized by a variable catalytical domain characterized by a pocket that can either bind a Zn^{2+} cation necessary to ensure the deacetylation reaction, or different inhibitors like sodium butyrate or trichostatine A (Finnin *et al.*, 1999). Different members of this family like HDA6, HDA7 or HDA19 contain a NLS and / or NES, confirming the nuclear localisation of these enzymes, but also that a cytosolic / nuclear shuttling could be of importance for their mode of action.

Several studies, mainly based on the use of mutants in *RPD3-HDA1 A. thaliana* genes, have reported that they play major roles in various biotic and abiotic stress responses (Figure 2; Alinsug *et al.*, 2009). Amongst the 18 HDAC *A. thaliana* genes belonging to the RPD3-HDA1 family, most of them appear to be partly or largely involved in response to various environmental stresses. For example, in the Class I RP3-HDAC, AtHDA19 that is the best characterized member of this family, is highly expressed in germinating and imbibed seeds and also strongly accumulated in response to cold stress (Alinsug *et al.*,

2009), wounding (Zhou *et al.*, 2005) or light response (Tian *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2005). In fact, Tian *et al.* (2005) showed that approximately 7 % of the Arabidopsis genome is up- or down-regulated in *athda19* mutants. For example, Tian *et al.* (2003) showed that *hda19* mutant lines were affected in their flowering process under long day conditions, exhibiting the opposite phenotype of mutants altered in the expression of the histone acetyltraferase GCN5. Interstingly, the double mutant *gcn5:hda19* is characterized by a normal phenotype in response to light, suggesting that both HDA19 and GCN5 could target the same genes. This was shown by Benhamed *et al.* (2006): a reduced histone acetylation was monitored in the promoter of *CAB2*, *RBCS-1A* and *IAA3* genes in the *gcn5* mutants, whereas an increase histone acetylation was observed in the promoter of the same genes in the *hda19* mutants. Furthermore AtHDA19 expression is strongly induced in response to wounding and the stress related hormons JA and ethylene, suggesting that it could be involved in many abiotic stresses leading to the production of both compounds (Zhou *et al.*, 2005). AtHDA19 was also reported to be involved in response to abiotic through its interaction with the transcription corepressor LEUNIG by repressing gene transcription (Gonzalez *et al.*, 2007). In the same way, overexpression of AtHDA19 in *Brassica napus* demonstrated that it was involved in response to cold stress by interacting with bnKCP1, a novel protein containing a putative kinase-inducible domain (Gao *et al.*, 2003).

AtHDA6, another RPD3-type histone deacetylase in *A. thaliana*, is involved in response to ABA and salt stress. Chen *et al.* (2010) showed that an AtHDA6 mutant, *axe1-5*, as well as *HDA6* RNA-interfering plants are hypersensitive to salt and ABA treatment, due to the down-regulation of various abiotic stress responsive genes like *ABI1*, *ABI2*, *RD29A* or *RD29B*. This hypersensitivity to salt stress is correlated with changes in H3 acetylation pattern. Without ABA treatment, an increase of H3 acetylation was shown both in the promoter and in exons of these genes in the *axe1-5* mutant compared to Col0. In response to ABA, an increase of H3 acetylation was only monitored in Col0 but not in the *axe1-5* mutant, indicating that HDA6 is required for the induction of acetylation by ABA and salt treatment. A similar phenotype was obtained with the *A. thaliana HDA19* T-DNA insertion mutant, *hda19-1* (Chen and Wu, 2010). On the contrary, other RPD3 HDAC like AtHDA7 are not differentially expressed in regard to developmental stages but are induced in response to both biotic (*Pseudomonas syringae*) and abiotic stimuli such light intensity or heat stress, according to microarray data analyses (Alinsug *et al.*, 2009).

Little information is available regarding the properties of HDA1-like HDACs in plants. The study of one member of this family in maize, ZmHDA1, reported that it is expressed in an inactive form of high molecular weight (84-kDa) that needs to be processed in an active form of 48-kDa by a proteolytic cleavage of the C-terminal end to regulate gene transcription (Pipal *et al.*, 2003). According to the data of the sequenced genomes, *A. thaliana* contains five members of the HDA1 group also termed class II. Members of this Class II are also involved in response to various environmental stresses: while heat stress seems to upregulate most of the Class II HDAs, NaCl treatment only stimulates AtHDA14 and AtHDA2 expression (Alinsug *et al.*, 2009). Furthermore, AtHDA18 expression is induced in response to cold treatment. Demetriou *et al.* (2009) reported that members of this HDAC family in Barley are also regulated by JA in response to abiotic stresses: whereas *HvHDAC1-I-1* is slightly reduced after 6 hr of treatment, other genes like *HvHDAC1-II-1* or *HvHDAC1-IV-1* are strongly accumulated after 6 hr.

The SIR2-like HDACs are characterised by their NAD-dependent histone deacetylase activity. They are homolog to the yeast SIR2 HDAC that is involved in longevity (Imai *et al.*, 2000). Although the genome of all sequenced plants contains several Sir2-like genes, their functions are yet to be determined. A recent study in *A. thaliana* showed that AtSIR2 regulates several defence related genes involved in the synthesis of SA, implying potentially SIR2 members in plant defence reactions (Wang *et al.*, 2010). To our knowledge, only one study recently reported the involvement of SIR2 in response to low temperature in the context of vernalization (Bond *et al.*, 2009). SIR2 class of HDAC would repress the expression of the MADS box transcription factor *FLC* (for Flowering Locus C, a central gene in the vernalization process) by altering the acetylation pattern of histones H3 and H4.
The last HDAC family, termed HD2-like, is specific to plants and do not share any sequence similarities with other HDAC proteins (Pandey *et al.*, 2002). Three genes HD2 HDAC genes /or homologues are coded in maize genome, four in *A. thaliana*, two in rice and in barley. All HD2 display similarities with the FKBP family peptidyl-propyl cis-trans isomerase (Aravind and Koonin, 1998; Dangl *et al.*, 2001) and display the same architecture: a conserved EFWG motif in the N-terminal region that comprises the catalytical domain, a central acidic domain involved both in enzymatic activity and its regulation, and in the C-terminal part a NLS and a Zn^{2+} finger that may be involved in protein/protein or protein/DNA interactions. Several members of this family like ZmHD2 in maize and AtHD2A in *A. thaliana* were shown to be localized in the nucleolus and to deacetylate the lysine 9 of histone H3, suggesting that they should be involved in the regulation of ribosomal RNA expression (Lusser *et al.*, 1997; Earley *et al.*, 2006). However their mode of action is still largely unknown; they seem to be mainly involved in plant defence reactions (Bourque *et al.*, 2011) and in seed development (Wu *et al.*, 2000). In *A. thaliana*, Sridha and Wu (2006) showed that overexpression of *AtHD2C* enhances tolerance to salt stress and drought compare to wild-type plants by affecting the expression of several abscisic acid-responsive genes. However, we do not know whether or not it affects the acetylation of these genes.

3.2 Histone acetyltransferases (HATs)

The action of the HDAC proteins is reversed by the one of the HATs that catalyse the transfer of an acetyl group from acetyl~SCoA to the amine function of a lysine residue, particularly in histone proteins (Servet *et al.*, 2010). Like HDACs, HATs are divided into several groups based on primary homology with yeast and mammalian HATs: GNAT (for GCN5-related N-acetyltransferase), MYST (for MOZ, Ybf2/Sas2 and Tip60), p300/CBP (for CREB-binding protein) and TAF1 (for TATA-binding protein (TBP)-associated factor 1) groups. The GNAT group is usually subdivided into three subfamilies termed GCN5 (for General Control Nonderepressive protein 5), ELP3 (for transcriptional ELongator complex Protein 3) and HAT1. In a structural point of view, HATs are usually constituted by two fundamental domains: the catalytical acetyltransferase domain, and the bromodomain. The bromodomain is composed of 110 aminoacids that can bind to acetylated lysine residues (Owen *et al.*, 2000). Bromodomains are generally found in proteins that regulate chromatin structure and gene expression, such as HATs and the ATPase component of certain nucleosomes-remodeling complexes. The mode of recognition of acetyl-lysine by the bromodomain is similar to the one of acetyl~SCoA by HATs, since the bromodomain is the only domain known to interact with acetylated lysine containing peptides. Among the

different HATs expressed in *A. thaliana*, AtGCN5/HAG1, which belongs to the GNAT HAT family, is one of the best characterized in terms of function and is involved both in abiotic and developmental responses (see Servet *et al.*, 2010 for a recent review). Regarding its specificity, the major targets of this HAT are histone H3 (H3K9, H3K14, H3K18 and H3K27) and histone H4 (H4K5, H4K8, H4K12 and H4K16; Zhang *et al.*, 2007). The bromodomain of AtGCN5, that was shown to bind to acetylated histone lysine motifs, is probably not required for its binding to most of its targets (Benhamed *et al.*, 2008). Among its targets, in addition to histones H3 and H4, AtGCN5 also interacts and acetylates other proteins such as AtADA2 that could regulate HAT activity (Servet *et al.*, 2010). Furthermore, AtGCN5 activity could be regulated by phosphorylation/dephosphorylation, since it interacts with protein phosphatase 2C *in vitro* and mutation in PP2C gene increases H3K14 acetylation, one of the targets of AtGCN5. The other HAT proteins are less characterized in terms of target and mode of action.

Works in the group of D.X Zhou have shown that AtGN5 is required for light-regulated gene expression by promoting the acetylation of the promoter of target genes (Benhamed *et al.*, 2006; Benhamed *et al.*, 2008; Servet *et al.*, 2010). Several studies reported that abiotic stresses involve the association/regulation of HAT activities with various proteinaceous partners in the regulation of specific genes leading to the establishment of the biological response. For example, the GCN5 HAT is known to physically interact with the transcriptional coactivator Ada2 (Stockinger *et al.*, 2001), this one enhancing the ability of GCN5 to acetylate histones *in vitro* and enabling GCN5 to acetylate nucleosomal histones (Mao *et al.*, 2006). Hark *et al.* (2009) showed that mutants of one of both *ADA2* genes, *ADA2b*, display hypersensitive phenotype to salt stress and altered responses to low temperature stress, a phenotype close to the one of AtGCN5 mutants. A recent study showed that ADA2b and GCN5 interact with a third partner, the coactivator SGF29a, to enhance the acetylation in the promoter region of target genes like COR6.6, RAB18, and RD29b (Kaldis *et al.*, 2011). In the same vein, Gao *et al.* (2007) showed that AtGCN5 HAT activity is required in response to cold and stress treatment by its physical interaction with the transcription factor AtEML. The authors suggest that AtEML would co-ordinates the expression of target stress regulated genes through involvement in recruiting AtGCN5 to their promoters.

4. Protein methylation

Protein methylation involves transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine (the universal methyl donor in cells) to acceptor groups on substrate proteins (Aletta *et al.*, 1998). It commonly occurs on carboxyl groups of glutamate, leucine, and isoprenylated cysteine, or on the side-chain nitrogen atoms of lysine, arginine, and histidine residues (Clarke, 1993). In eukaryotes nuclei, one of the best known examples of protein methylation is probably histone methylation. Like acetylation, histone methylation is considerate as an important process regulating the chromatine dynamics and function (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002). Histone methylation can occur at different residues and on distinct sites. For one residue, different numbers of methyl groups can be added. Even if some methylation has been characterized in the globular domain of H3 in animals (Feng *et al.*, 2002), methylation seems to concern most of the time the N-terminal part of histones (named histone tail) (Bannister and Kouzarides, 2005). Histones methylation has been described mainly on histones H3 and H4 and occurs on both arginine and lysine residues.

4.1 Histone lysine methylations

Lysine methylation consists on addition of one or more methylgroups to the ε-amino group of lysine residues, resulting in mono-, di-, or trimethylated lysine. Unlike acetylation, methylation of these residues does not change the charge but progressively increases the bulk and hydrophobicity. This may impact intra- or intermolecular hydrogen-bond interactions of the amino group or create new sites recognized by reader proteins that bind preferentially to the methylated domain (Lee *et al.*, 2005). In eukaryotes, histone lysine methylation occurs on histone H3 at lysines 4, 9, 14, 27, 36, and 79 and on histone H4 at lysines 20 and 59 (Strahl and Allis, 2000; Berger, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). A recent study provide evidences that methylation can also occurs on Lysine 37 of histone H2B *in vivo* (Gardner *et al.*, 2011).

In *A. thaliana*, the best known histone lysine methylation occurs at Lys4 (K4), Lys9 (K9), Lys27 (K27), and Lys36 (K36) of histone H3 while methylation on lysine 20 of H4 has only been observed with immunostaining. Presence of methylation on H3 K79 which is highly conserved in non-plant systems has not been reported in plant. Methylations of lysine are catalyzed by HKMTs (histone lysine methyltransferases) that almost all share a SET [Su(var), Enhancer of zeste, trithorax] domain, a conserved motif containing approximately 130 amino acids which was originally identified in Drosophila. This domain is responsible for catalysis and binding of cofactor S-adenosyl-lmethionine (Lee *et al.*, 2005). Plant genome encodes number of protein with set domain; for example, *A. thaliana* genome encodes 41 while grapes encode 32 and maize 37 (http://www.chromdb.org). Function of their homology with their Drosophila homologues E(Z), TRX, ASH1 and SU(VAR)3–9, they are assigned to four groups (Jenuwein *et al.*, 1998). In *A. thaliana*, certain families of HKMTs seem to catalyse methylation on one particular site. It is the case for HKMTs homologues of SU(VAR)3–9 that are acting on H3K9 and for HKMTs relative to E(Z) that methylate H3K27. E(z) proteins are associated with other members in PRC2 (polycomb-group repressive complex 2) to performed H3K27 methylation. Members of other families seem to be able to act at different sites. It is the case of TRX homologue where different members can contribute to methylation of H3K4 or H3K27. Also ASH1 (for Absent, Small, or Homeotic discs 1) family seems to act on both H3K36 and H3K4. Nevertheless the link between this protein and histone methylation can be direct or indirect since methyl transferase activity has been not tested for all members of these different families (for review Liu *et al.*, 2010). Methylated lysine can be then recognized by protein reader leading in a direct or indirect way to a particular function like gene silencing (Schotta *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004). These proteins comported domain that can recognized methylated lysine such as chromolike domains of the royal superfamily (including chromodomain, tudor domain, malignant brain tumor (MBT), PWWP, and plant Agenet module), or a plant homeodomain finger (PHD) or the WD40 repeat (Taverna *et al.*, 2007). At this time only fews readers are known in plants and the way by which they translate the histone marks to direct downstream functions it is not fully understood.

4.2 Stoechiometrie and localization of histone lysine methylation in plant

In plants like in animals the three degrees of methylation (mono, di et trimethylation) on histone H3 at lysines 4, 9, 14, 27, 36 are found but proportions between the different degrees change. For example in *A. thaliana*, higher levels of H3K4 di-methylation (H3K4me2) and lower H3K9me2 and H3K9me3 levels have been detected compare to animals (Jackson *et al.*,

2004; Guo *et al*., 2006). Histones methylation profile has mainly be determined in *A. thaliana* thanks to Immunostaining of nuclei, chromatin immunoprecipitation (ChIP) , ChIP coupled with high-resolution microarray analysis (ChIP-chip) and mass spectrometry in combination with high-performance liquid chromatography (HPLC) separation methods (Liu *et al*., 2010). H3K4me1/2/3 are highly enriched in euchromatin in *A. thaliana* and about 90 % of annotated genes carry one or more of the H3K4 methylation marks, suggesting an important role of this histone modification in the control of gene expression (van Dijk *et al*., 2010). H3K9 methylation is critical for maintenance of transcriptional gene silencing and genome stability (Vaillant and Paszkowski, 2007). H3K9me1 and H3K9me2 are predominant and enriched in heterochromatin (Johnson *et al*., 2004) while H3K9me3 is enriched in euchromatin (Mathieu *et al*., 2005; Turck *et al*., 2007). H3K9me2 is particularly present in transposons and repeated sequences according to the repressing transposon activities that have been attribute to this histone mark (Lippman *et al*., 2004; Bernatavichute *et al*., 2008). H3K27me1 and H3K27me2 are enriched in heterochromatin (Mathieu *et al*., 2005; Fuchs *et al*., 2006) while H3K27me3 is localized in euchromatin (Turck *et al*., 2007). H3K27me3 is found in about 4400 genes and is often localized upstream of promoters and of 5'UTR suggesting like for H3K4, an important role of this methylation in controle of gene expression in plant (Turck *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007). H3K36me1/3 are enriched in euchromatin while H3K36me2 is present in both euchromatin and heterochromatin (Lin *et al*., 2008).

4.3 Histones arginine methylation

Arginine methylation can impact histone and more generally protein properties. In fact, arginine is a positively charged amino acid that has five potential hydrogen bond donors positioned for favorable interactions with biological hydrogen bond acceptors (Bedford and Clarke, 2009). These biochemical properties give to this amino acid a crucial role for protein structure and interaction with other molecules. In proteins interacting with DNA, arginine residues are the most frequent hydrogen bond donors to backbone phosphate groups and to thymine, adenine, and guanine bases (Luscombe *et al*., 2001). Protein arginine methylation results in the addition of one or two methyl groups to the guanidino nitrogen atoms of arginine (Gary and Clarke, 1998). Each addition of a methyl group to an arginine residue changes its form and removes a potential hydrogen bond donor (Bedford and Clarke, 2009). Since no protein able to interact with histone arginine methylation are known, it is possible that the only fact of methylate arginine is to impact interaction between histones and DNA, leading to an impact of chromatin structure and finally of gene expression.

In Eukaryotes, the best known arginine methylation concerned Arg2 (R2), Arg8 (R8), Arg17 (R17), Arg26 (R26) of histone H3, and Arg3 (R3) of histone H4. In *A. thaliana*, at this time only methylation on H4R3 and H3R17 have been detect *in vivo*. Protein arginine methylation is catalyzed by a family of protein named arginine methyltransferases (PRMTs). PRMTs are classified into four classes depending of the final methylated product of reaction that they can catalyze. Type I and type II enzymes are among others, involved in histone methylation and are one of the best characterized (Bedford and Richard, 2005). Both of them catalyze first addition of single methyl group on the terminal nitrogen atom of Arginine to form Mono methylated Arginine (MMA). Then, Type I PRMTs form asymmetric di-methylated Arg meaning that two methyl groups are added on the same nitrogen atom of the guanidine leading to an ω-NG,NG-di-methyl arginine, while type II PRMTs performed symmetric

dimethylation of Arg meaning that the two methyl groups are on two different nitrogen atome leading to an ω-NG,N_G-d i-methyl arginine (Mitchell *et al.*, 1992). *A.thaliana* genome codes for nine PRMTs (Niu *et al.*, 2007). AtPRMT4a and AtPRMT4b, are homologs of human CARM1 and can performed asymmetrically H3R17me2a *in vivo*. H4R3 can be di-methylated symmetrically by AtPRMT5/SKB1 (Pei *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2008) and asymmetrically by AtPRMT1a, AtPRMT1b (Yan *et al.*, 2007) and AtPRMT10 (Niu *et al.*, 2007).

4.4 Histones demethylation

Histone methylation has been considered as irreversible until the discovery in 2004 of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) in animals (Shi *et al.*, 2004). This discovery proved that histone methylation is a dynamic process regulated by HMTs (the writers) but also histones demethylases (the erasers). Two types of demethylases exist with distinct mechanisms to remove lysine methylation: Flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent KDM1/LSD act by amine oxidation and need the cofactor Flavin adenine dinucleotide. JmjC domain–containing proteins act by hydroxylation and most of them use Fe(II) and α-ketoglutarate (Shi *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2006). These two classes of enzymes act on different substrates: Flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent KDM1/LSD1 are able to demethylate mono and dimethylation while JmjC domain–containing proteins demethylase act one mono-di and tri methylated lysines (Klose and Yi, 2007). In *A. thaliana*, potential histone demethylases have been predicted based on conservation of cofactor-binding amino acids (Lu *et al.*, 2008). There are four KDM1/LSD1 homologs in *A. thaliana* and one of them, LDL1, has been shown to demethylate di- and mono-methylated H3K4 (Spedaletti *et al.*, 2008). *A. thaliana* genome also contains 21 JmjC domain–containing proteins (JMJs). These JMJs are grouped into five subfamilies according to sequence similarities. The biochemical properties and biological functions of histone demethylases are emerging and how these enzymes work, are recruited to their target loci, and play roles are still largely unknown (Liu *et al.*, 2010).

In animals, H3 and H4 arginines can be desiminate by PADI4 (peptidyl arginine deiminase 4). Deimination could be antagonist of arginine methylation since citrulline prevents arginine from being methylated (Cuthbert *et al.*, 2004). Moreover it could be a way to remove methylation of arginine. In fact, monomethylated arginine could be converted to citrullin by PADI4 (Wang *et al.*, 2004). In addition a family of amine oxidases may be able to demethylate arginine residues using a similar mechanism as they demethylate lysine residues (Bedford and Richard, 2005). In plant, arginine demethylation process is still unknown.

4.5 Histone methylation in responses to abiotic stresses

Abiotic stresses modulate expression of different genes. As it has been explained before, gene regulation can be due to chromatin remodeling involving histone modification. In plants, modification of histone methylation occurs during stress responses even if the mode of action and consequence of these changes are still not well understand. These modifications could control stress relative genes. For example, hundreds of stress-responsive genes are targets for H3K27me3 in *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2007).

During a cold stress, methylation of H3K27me3 gradually decreases at the loci of two cold-responsive genes, COR15A and AtGolS3 while expressions of genes increase. Even if Tri-methylation of histone H3 Lys27 (H3K27me3) is generally considered as a negative marker of transcription (Zhang *et al.*, 2007), the link between reduction of H3K27me3 and increase of transcription seems to be not obvious in this case : first COR15A and ATGOLS3 are not

targets for LHP1 (Zhang *et al.*, 2007), an *A. thaliana* protein that binds H3K27me3 *in vitro* (Zhang *et al.*, 2007; Exner *et al.*, 2009) and that has been shown to be required for silencing of genes with H3K27me3 (Mylne *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Exner *et al.*, 2009). Also, when cold-exposed plants are returned to normal growth conditions, transcription of COR15A and ATGOLS3 was repressed to the initial level before cold exposure while decrease in H3K27me3 is still maintained. Also, this decrease does not enhance the induction of transcription when plants are returned to cold temperatures (Kwon *et al.*, 2009). According to these results, it has been proposed that H3K27me3 could act as a memory marker for recent transcriptional activity in *A. thaliana*. In this case, previous exposure of plants to certain environmental stresses may negatively affect the level of H3K27me3 and lower the chance of stress-responsive genes being silenced.

Dehydration stress also induces variations on histone methylation. In fact, histone H3 modifications at the coding regions of four dehydration stress responsive genes, RD29A, RD29B, RD20, and an AP2 transcription factor have been reported during a drought stress in *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2008), characterized by an enrichment of H3K4me3 and H3K9ac (a positive marker of gene activation) at these four loci. Another study presents the whole-genome distribution patterns of histone H3 H3K4me1, H3K4me2, and H3K4me3 and its modification after a drought stress in *A. thaliana*. While H3K4me1 and H3K4me2 levels changed modestly during dehydration stress, drastic changes in the H3K4me3 levels are observed. These changes are correlated with modification in level of transcription of responding genes: a large increase of H3K4me3 level was found on nucleosomes of the genes which had a high expression and a large decrease in H3K4me3 levels has been reported in highly down-regulated genes (van Dijk *et al.*, 2010). By analyzing the H3K4me3 distribution profiles on nucleosomes of stress-induced genes, this study provided specific chromatin pattern associated with many genes involved in dehydration stress response and confirm the putative role of H3K4me3 in transcription activation.

The *A. thaliana* SKB1 protein is a type II Arg methyltransferase homologue to PRMT5 in mammals that catalyzes Arg symmetric dimethylation H4R3sme2. SKB1 is associated to chromatin region of FLC promoting flowering by suppressing its expression through H4R3sme2 (Wang *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2008). SKB1 is also associated in chromatin of other genes involving among others in stress responses like HAB1, who is really important in ABA and salt stress (Saez *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2006) where it represses transcription through H4R3sme2. Salt stress and ABA treatment (that is accumulated under a salt stress) lead to dissociation of SKB1 from chromatin leading to a reduced level of H4R3sme2 and to an higher expression of genes in ABA and salt response like HAB1, suggesting a direct mechanism by which salt and ABA impact gene transcription (Figure 3). This theory is supporting by the fact that SKB1 invalidation leads to a decrease of H4R3sme2 levels, an increase of HAB1 and some other stress-responsive gene expression and a bigger susceptibility to salt stress (Zhang *et al.*, 2011). During a salt stress, SKB1 not only leaves chromatin of some loci but also methylates U6 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)–specific Sm-like protein LSM4. SKB1 invalidation leads to splicing defects in hundreds of genes that are involved in many biological processes, including the abiotic stress responses. Furthermore, *lsm4* mutant, similarly to *Skb1*, is hypersensitive to salt and shows similar splicing defects in some genes (Zhang *et al.*, 2011). In conclusion, SKB1 plays a dual role in salt response by altering the methylation status of H4R3sme2 and LSM4.

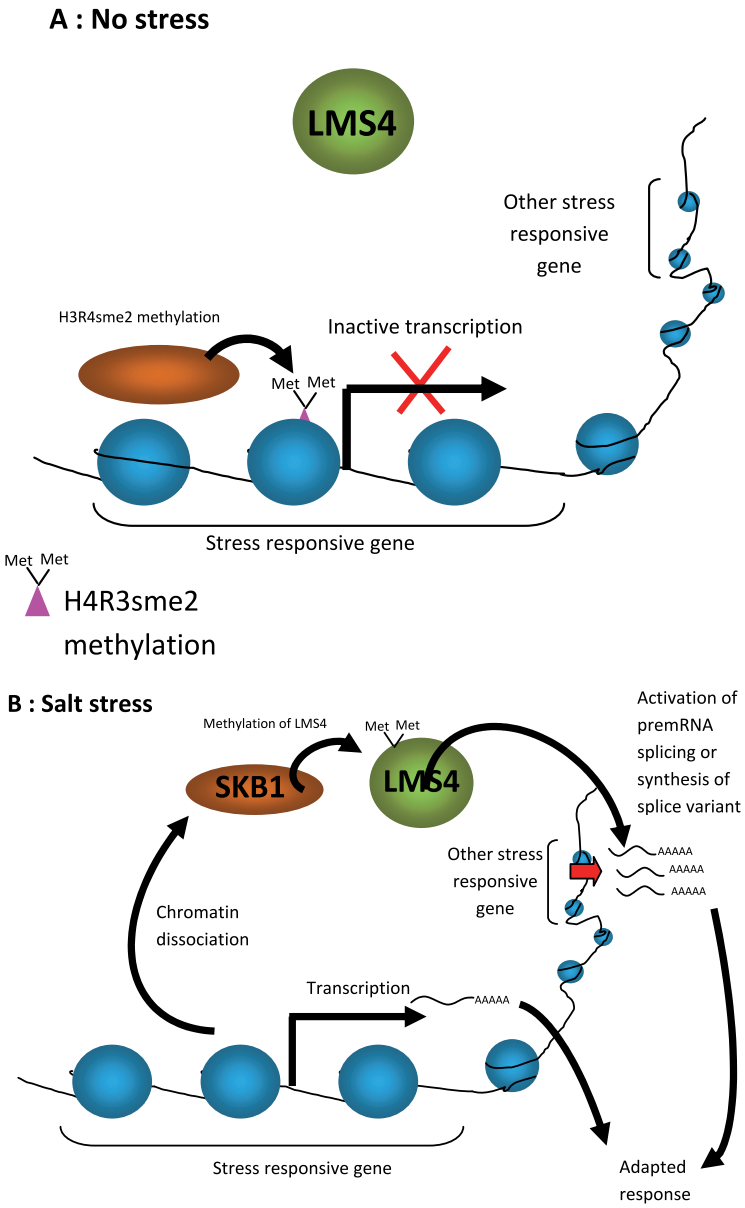


Fig. 3. Involvement of methylation in salt stress responses. A : Without stress, SKB1 a PRMT is associated to the chromatin of some stress related genes where it methylates histone on H4R3sme2. These methylations are repressive mark leading to transcription inactivation of these genes. B: During a salt stress, there is a chromatin dissociation of SKB1. This dissociation has a dual role in stress related gene control to insure an adapted response: Firstly SKB1 do not maintains H3R4sme2 in the loci where it was associated leading to an

higher expression of many stress relative genes. Secondly, SKB1 will methylated another protein LMS4 connected to splicing. This last methylation leads to an activation of premRNA splicing and /or synthesis of splice variant of some other genes connected to stress responses.

5. Redox modification of nuclear proteins

5.1 ROS and RNS in the nucleus

Reactive oxygen species (ROS) are chemically reactive species of oxygen formed by successive one-electron reduction of molecular oxygen. It includes superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), perhydroxyl radical ($HO_2^{\cdot}$) and the highly reactive hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) (Apel and Hirt, 2004). ROS is produced in different organelles such as mitochondria, chloroplast, peroxizome, endoplasmic reticulum and in the cytosol (Gill and Tuteja, 2010) but to our knowledge, only one study has described ROS accumulation in the nucleus, in response to an elicitor of plant defense (Ashtamker *et al.*, 2007). However, recent data indicate that plant cell nucleus possesses antioxidant redox system to control ROS homeostasis (Pulido *et al.*, 2009a; Pulido *et al.*, 2009b). Furthermore, ROS production in other cellular compartments results in changes in gene expression, indicating that ROS production can influence gene transcription in the nucleus. Another reactive radical, Nitric Oxide (NO), has been known for years as a signaling molecule in animal and plant cells (Besson-Bard *et al.*, 2008). Reactive Nitrogen Species (RNS) contains all the NO derived molecules and their chemistry have been documented elsewhere (Stamler *et al.*, 1992). For instance, NO can be oxidized or reduced to NO^+ or NO^- or can react with $O_2^{\bullet-}$ to form the strong oxidant peroxynitrite ($ONOO^-$). Through its different chemical forms, NO can react with a great variety of molecules including proteins, lipids, metals, molecular oxygen or nucleic acids. Evidences for NO production in the nucleus of various plant cell types (stomata guard cells, stomata subsidiary cells, epidermal cells) have been documented in some studies in response to different stimuli such as heat stress, green light, osmotic stress, plant defense elicitors (Foissner *et al.*, 2000; Gould *et al.*, 2003; Vitecek *et al.*, 2008). As observed for ROS, NO can have an impact on gene expression (Palmieri *et al.*, 2008).

5.2 Redox-based post-translational modification in plant cell nuclei

ROS and RNS could affect gene expression through different mechanisms. These reactive compounds can activate components of signaling pathways controlling gene expression or can directly affect the DNA binding activity of several kinds of transcription factors. Heat shock transcription factors (HSF) bind to a consensus sequence found in the promoter of many stress-responsive genes. HSF transcription factors have been thought to be ROS sensors as reviewed by (Miller and Mittler, 2006). Other transcription factors are regulated in a redox dependent manner through a dithiol/disulfide exchange and some examples are detailed bellow.

The activity of transcription factors from the R2R3 MYB family have been shown to be involved in abiotic stress responses including salt stress, drought stress (Jung *et al.*, 2008). Using the typical R2R3 MYB protein P1 from *Zea mays*, Heine *et al.* (2004) have shown that DNA binding of this transcription factor is redox-dependent. More precisely, the two cysteines residues 49 and 53 are necessary for DNA binding and under non-reducing conditions, they formed a disulfide bridge that prevents DNA binding. Another R2R3 MYB

plant transcription factor of *A. thaliana*, AtMYB2, has been shown to be redox-modulated (Serpa *et al.*, 2007). AtMYB2 has been suggested to play a role in response to stresses that induce NO production such as ABA or salt treatment. Contrary to P1, cystein 49 is absent in AtMYB2 (Heine *et al.*, 2004) and the S-nitrosylation of Cys 53 by NO donors blocks its binding to a specific DNA sequence (Serpa *et al.*, 2007). In this case, it indicates that the S-nitrosylation of AtMYB2 could be a mechanism to turn off the activity of this protein. However, the role of the redox regulation of R2R3 MYB transcription family protein needs to be addressed *in vivo* in response to abiotic stresses.

The DNA binding of RAP2.4a (At1g36060), a AP2/DREB-type transcription factors, to the promoter of 2-Cys peroxiredoxin-A gene (2CPA) is redox-regulated by dithiol/disulfide transition of regularoty cysteinyl residues (Wormuth *et al.*, 2007; Shaikhali *et al.*, 2008). Reducing conditions lead to the monomerisation of RAP2.4a whereas oxidizing conditions dimerize or oligomerize RAP2.4a proteins through the formation of disulfide bridges which increased binding affinity of the protein to DNA. Loss-of-function of *RAP2.4a* affects the adaptation of plants to changes in environmental conditions such as naturally fluctuating light conditions. Furthermore, RAP2.4a transcription factor regulates the expression of genes known to be induced by ROS and involved in abiotic stress tolerance such as ZAT 10 (Mittler *et al.*, 2006). A closed homologue, RAP2.4b (At1g78080) has also been involved in stress response. Mutations in *RAP2.4b* cause altered expression of light and drought-responsive genes and defects in developmental processes or drought tolerance. However, its redox control as observed with RAP2.4a has not been investigated.

In the last decades, studies in the animal field have indicated that the main mode of action of NO is based on the post-translational modification of proteins. Firstly, S-nitrosylation consists of the oxidation by NO of reduced sulfidryl groups of cysteyls residues of proteins thus forming a nitrosothiol (SNO). Secondly, tyrosine nitration is based on the addition of a NO_2 group on a tyrosyl residue of a protein. And thirdly, NO can bind covalently transition metal of metalloproteins. This last process is called metal nitrosation. These NO-based post-translational modifications of proteins finally affect the activity of the modified proteins. While thousand proteins have been identified in animals to be modified by NO, only a few have been characterized in plants (Astier *et al.*, 2011; Seth and Stamler, 2011). Among them, some are linked with the nucleus function. The best example on the role of NO in the modification of proteins associated with nuclear functions is the transcription coactivator NPR1 (for Non-expressor of Pathogenesis Related-1) in *A. thaliana.* Although data indicate that NPR1 is important for plant resistance to abiotic stresses (Quilis *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2002), its mode of action and its regulation have been discovered in plants infected by avirulent pathogens or treated by elicitors of plant defense reactions. In untreated cells, NPR1 forms a homo multimeric complex that is sequestered in the cytosol and stabilized by intermolecular disulphide bonds (Mou *et al.*, 2003). In this case, NPR1 monomers still exist. To prevent target gene activation in the absence of inducing stimulus, they are translocated to the nucleus at low rate and finally targeted to the proteasome (Spoel *et al.*, 2010). A role of NO in this process has been recently discovered. It was reported that S-nitrosylation of NPR1 by S-nitrosoglutathione (GSNO) at cysteine-156 facilitates its oligomerization and blocks its nuclear translocation (Tada *et al.*, 2008). After the perception of stimuli such as pathogen infection, redox changes dependent on the production of salicylic acid occur. Multimeric NPR1 is reduced to monomers by thioredoxins and NPR1 monomers are then translocated to the nucleus where their interaction with transcription

factors allowed the regulation of the expression of several genes (Despres *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008; Fan and Dong, 2002; Boyle *et al.*, 2009). Particularly, NPR1 activates the binding of the b-ZIP transcription factor TGA1 to the activation sequence-1 (as-1) element of the promoter region of defense genes. Disulfide bridge formation involving cysteyl residues 260 and 266 precludes the interaction of TGA1 with NPR1 and then prevents binding of TGA1 to its target DNA element (Despres *et al.*, 2003). Recent mass spectrometry analysis indicated that these cysteyl residues of TGA1 are S-nitrosylated and S-glutathionylated after GSNO treatment (Lindermayr *et al.*, 2010). Furthermore, GSNO enhanced the DNA binding activity of TGA1 to its DNA element in the presence of NPR1. It can be the consequence of conformational changes of both proteins which allow a more effective TGA1-NPR1 interaction and finally a more effective DNA-binding of TGA1. Interestingly, a GSNO-induced nuclear translocation of NPR1 has also been observed by these authors. It could be due to SA-mediated redox-changes since NO induced SA production (Durner *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004). All these results indicate that NO has a major regulatory role of NPR1 functions by controlling its translocation from the cytosol to the nucleus and by affecting the NPR1/TGA1 complex and downstream dependent responses. Other proteins might be involved in this process. The small oxidoreductases glutaredoxins that mediate redox regulation of proteins through the reduction of disulphide bridges or the glutathionylation of cysteyl residues (Dalle-Donne *et al.*, 2009; Rouhier *et al.*, 2010) has been recently shown to interact with transcription factors from the TGA family in the nucleus of plant cells (Ndamukong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). However, the role of GRX in TGA function has not been described yet.

Another protein is redox-modified by NO. In a recent paper, Wawer *et al.* (2010) have shown that *Nicotiana tabacum* GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) localized in the nucleus and in the cytosol of plant cells. GAPDH was transiently S-nitrosylated after the salt treatment of *N. tabacum* cell suspensions but the role of this NO-dependent modification is not known.

6. Ubiquitin and ubuquitin-like post-ranslationnal modifications

Protein post-translational modifications by ubiquitin and ubiquitin-like proteins are essential for a plethora of cell functions in eukaryotic cells and are involved in development processes but also in the responses to biotic and abiotic stresses (Fu *et al.*, 2010; Miura and Hasegawa, 2010; Trujillo and Shirasu, 2010). Ubiquitination is a post-translational modification of proteins corresponding to the reversible attachment of the 76-amino acid protein ubiquitin to target proteins through a well-characterized process (Fu *et al.*, 2010). This three-step enzymatic cascade is catalyzed by ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and ubiquitin ligase enzyme (E3). A major function of protein ubiquitination is to address proteins to the proteasome for their degradation. However, it can also control intracellular localization of proteins, transcription of DNA and cell cycle. Thus, ubiquitination regulates a great number of cellular processes. There are evidences that the ubiquitination system is involved in regulating signaling pathways controlling plant adaptation to stresses and especially abiotic stresses. Some proteins belonging to the ubiquitination enzymatic machinery and involved in abiotic stress tolerance have been shown to localized in the nucleus of plant cell. AtHOS1, a E3-ubiquitin ligase that control cold tolerance in *A. thaliana* have been shown to localized in the nucleus after cold stress (Lee *et al.*, 2001, see below). Furthermore, AtDRIP1 and AtDRIP2 (DREB2A-

interacting protein) are two E3-ubiquitin ligase (Qin *et al*., 2008). AtDRIP1 is localized in the nucleus of *A. thaliana* cells where it interact with AtDREB2A (Dehydratation-responsive element binding protein 2A), a transcription factor that is important for drought tolerance and controls the expression of water deficit-inducible gene expression. As proposed by (Qin *et al*., 2008), the ubiquitination of AtDREB2A may occur in a no-stress condition leading to its degradation by the proteasome. However, during drought stress, AtDREB2A is activated by an unknown mechanism. It is possible that the ubiquitination and degradation of AtDREB2A is blocked leading to the accumulation of effective AtDREB2A protein that in turn activate the expression of drought-responsive genes. This result highlights the importance of ubiquitination process in controlling gene transcription in the nucleus.

In addition to ubiquitin, post-translational modification of proteins by ubiquitin-like proteins (Ubls) such as SUMO (small ubiquitin-like modifier), RUB (related to ubiquitin), NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated), ATG8 and ATG12 (autophagy 8 and 12) have been shown to be functional in plants and to control essential cellular processes as observed in other eukaryotes (reviewed by (Miura and Hasegawa, 2010). Among them, modification of proteins by SUMO (SUMOylation) has been one of the most described Ubl-post-translational modifications in plants. SUMO proteins are synthesized as precursors that need to be cleaved by specific proteases to expose a glycyl residue necessary for their ligation to target proteins. The addition of SUMO proteins to a lysyl residue of the target protein is catalyzed in a three-step enzymatic reaction similar to ubiquitinylation (Kurepa *et al*., 2003).

In *A. thaliana*, genetic analysis of SUMOylation process indicates that this post-translational modification of proteins is essential for plant development. Thus, mutation in the gene coding AtSCE1 (Arabidopis Sumo-conjugating Enzyme1) or AtSAE2 (Arabidopsis Sumo-activating Enzyme 2) proteins results in embryo lethality (Saracco *et al*., 2007). The same phenotype was observed in plants in which the genes coding both AtSUMO1 and AtSUMO2 proteins were mutated (Saracco *et al*., 2007). Number of proteins modified by SUMO have been shown to increase *in planta* after abiotic stresses including heat, oxidative stress, ethanol, phosphate starvation, salt and cold stress (Kurepa *et al*., 2003; Miura *et al*., 2005; Yoo *et al*., 2006; Miura *et al*., 2007; Conti *et al*., 2008; Miller *et al*., 2010). Furthermore, mutants defective in proteins of the SUMO-conjugating pathway such as AtSIZ1 (arabidopsis SUMO E3 ligase) are impaired in stress responses such as thermotolerance and have been shown to exhibit exaggerated phosphate starvation responses (Miura *et al*., 2005; Miura *et al*., 2007) indicating that SUMOylation of proteins is an essential process mediating stress acclimation. As observed in other eukaryotic cells, SUMOylation enzymes (*e.g.* AtSCEA and SUMO1/2) localized in the nucleus in Arabidopsis (Lois *et al*., 2003) indicating a role of SUMOylation in controlling many aspects of nuclear function. In rice (*Oryza sativa*), SUMO-conjugating enzyme (OsSCE1) has been shown to localize in the nucleus. Yeast-two hybrid experiments indicated that OsSCE1 interacts with the heat-inducible pyrophosphatase (PPIase) OsFKBP20, a class of proteins that assist molecular chaperones in reactions associated with protein folding and protein transport across membrane. It was proposed that OsSCE1 and OsFKBP20 proteins mediate in concert the stress response of rice plants (Nigam *et al*., 2008). In Arabidopsis, heat stress dramatically increased the pool of SUMO conjugates which were mainly detected in the nucleus (Saracco *et al*., 2007). In a recent proteomic analyses, Miller *et al*. (2010) have identified 357 SUMOylated proteins in Arabidopsis. Many of them are nuclear proteins that participate in a wide range of processes related to nuclear function,

such as chromatin modification, DNA maintenance/repair or gene transcription. Furthermore, nuclear SUMOylated proteins identified in non-stressed plants were enriched in oxidative and/or heat-stressed plants. Among the nuclear SUMO conjugates, some transcription factors have been identified (Miura and Hasegawa, 2010). For instance the SUMOylation of AtICE1, a MYC transcription factor involved in cold stress responses in Arabidopsis has been characterized (see below). Protein SUMOylation is a reversible process and de-SUMOylation is catalyzed by SUMO proteases a class of enzymes that is also involved in the generation of mature SUMO proteins. Recently, the Arabidopsis mutants *overly tolerant to salt 1* (*ots1*) and *2* (*ots2*) has been shown to be mutated in two SUMO proteases OTS1 and OTS2 that act redundantly to regulate salt stress response (Conti *et al.*, 2008). Both proteins are localized in the nucleus indicating that SUMOylation/deSUMOylation of nuclear proteins is likely to control essential processes required for salt stress responses.

It has been shown recently that both ubiquitination and SUMOylation can affect the same protein. During cold stress, Arabidopsis cold responsive genes are induced transiently indicating that their expression is finely regulated. Among the transcription factors that controls cold-gene expression and cold stress tolerance, AtICE1 is a MYC transcription factor that is constitutively expressed. It controls the cold induction of other transcription factors such as AtCBF3 which in turn drive the expression of cold responsive genes. On the contrary, AtMYB15 is a repressor of such genes (Agarwal *et al.*, 2006). ICE1 is post translationnally modified by both ubiquitynation and SUMOylation processes and these processes are thought to provide a fine-tuning for the expression of cold-responsive genes. More precisely, the nuclear-localized SUMO E3 ligase AtSIZ1 (Cheong *et al.*, 2009) mediate the SUMOylation of AtICE1. SUMOylation of AtICE1 is thought to stabilize or activate the protein, leading to the expression of genes required for low temperature tolerance, such as AtCBF3 (Miura *et al.*, 2007). Furthermore, the RING-E3-ubiquitin ligase HOS1 (for *high expression of osmotically responsive gene*) have been shown to relocalize to the nucleus after a cold treatment (Lee *et al.*, 2001) where it interacts with ICE1. HOS1 mediates the polyubiquitination of ICE1 targeting this transcription factor for degradation by the proteasome (Dong *et al.*, 2006). This leads to the repression of cold responsive genes such as CBF3 by the transcription factor AtMYB15. A model for the opposite role of ubiquitination and SUMOylation in the control of cold-responsive genes during cold episode has been proposed (Miura *et al.*, 2007; Miura and Hasegawa, 2010).

7. Conclusion

As we illustrate in this review using studies reporting the involvement of nuclear posttranslational modifications in response to numerous environmental changes, almost all known major abiotic stresses induce one or more nuclear protein modifications to regulate the expression of specific target genes.

After reading this chapter, three main conclusions emerge. Firstly, histone modifications and associated chromatin and gene expression changes appear to be a critical point necessary for establishment of an appropriate biological response. Understanding the regulation of histone modifications, competitions that can occur between different posttranslational modifications (the famous “histone code”) and interpretation of these

modifications by readers proteins is being initiated and should greatly highlight our comprehension of gene expression regulation in response to stresses in the coming years.

Secondly, we should keep in mind that protein modifications do not occur only on histones, but also concern many others proteins such as transcription regulators. However the number of non-histone proteins targeted by the nuclear posttranslational modification machinery remains sparse probably due to the technical difficulties for identification and purification of these very low abundant proteins in the nuclear compartment.

Thirdly, in almost all cases, the chemical and / or physical signals leading to nuclear machinery through the nuclear envelop are still unknown. Here too our knowledge about nuclear pore channels functioning in plant is emerging, but recent discoveries in this field should extend our understanding of how nuclear protein posttranslational modifications are controlled and lead the plant in an appropriate response to stress.

8. Acknowledgements

We would like to thank the Conseil Régional de Bourgogne for its financial support. Jennifer Dahan was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Agnès Dutartre is supported by a grant from the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne, Emmanuel Koen by the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche and Olivier Lamotte by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Conseil Régional de Bourgogne (FABER grant n° 20109201AAO047S05280).

9. References

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X and Zhu JK (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. Journal of Biological Chemistry 281: 37636-37645

Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosché M, Schlichting R, Scheel D and Kangasjärvi J (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. The Plant Journal 40: 512-522

Aletta JM, Cimato TR and Ettinger MJ (1998) Protein methylation: a signal event in post-translational modification. Trends in Biochemical Sciences 23: 89-91

Alinsug M, Yu C-W and Wu K (2009) Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. BMC Plant Biology 9: 37

Allfrey VG, Faulkner R and A.E. M (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 51: 786-794

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu S, Qiu J-L, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman M-A, Bjorn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O and Mundy J (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. Embo Journal 24: 2579-2589

Apel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373 - 379

Aravind L and Koonin EV (1998) Second family of histone deacetylases. Science 280: 1167

Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O and Fluhr R (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. Plant Physiology 143: 1817-1826

Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C and Wendehenne D (2011) S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. Plant Science In Press, Corrected Proof

Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke M and Matzke AJM (2002) HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. Embo Journal 21: 6832-6841

Bannister AJ and Kouzarides T (2005) Reversing histone methylation. Nature 436: 1103-1106

Bedford MT and Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. Molecular Cell 33: 1-13

Bedford MT and Richard S (2005) Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. Molecular Cell 18: 263-272

Belin C, de Franco P-O, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter J-M, Vavasseur A, Giraudat J, Barbier-Brygoo H and Thomine S (2006) Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. Plant Physiology 141: 1316-1327

Benhamed M, Martin-Magniette ML, Taconnat L, Bitton F, Servet C, De Clercq R, De Meyer B, Buysschaert C, Rombauts S, Villarroel R, Aubourg S, BeynonnJ, Bhalerao RP, Coupland G, Gruissem W, Menke FLH, Weisshaar B, Renou JP, Zhou DX and Hilson P (2008) Genome-scale *Arabidopsis* promoter array indetifies targets of the histone acetylreanferase. Plant Journal 56: 493-504

Benhamed M, Bertrand C, Servet C and Zhou DX (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell 18: 2893 - 2903

Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. Current Opinion in Genetics & Development 12: 142-148

Bernatavichute YV, Zhang XY, Cokus S, Pellegrini M and Jacobsen SE (2008) Genome-Wide Association of Histone H3 Lysine Nine Methylation with CHG DNA Methylation in Arabidopsis thaliana. Plos One 3: e3156

Besson-Bard A, Pugin A and Wendehenne D (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. Annual Review of Plant Biology 59: 21-39

Bond DM, Dennis ES, Pogson BJ and Finnegan EJ (2009) Histone acetylation, VERNALIZATION INSENSITIVE 3, FLOWERING LOCUS C, and the vernalization response. Molecular Plant 2: 724-737

Boudsocq M, Droillard M-J, Barbier-Brygoo H and Laurière C (2007) Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. Plant Molecular Biology 63: 491-503

Bourque S, Dutartre AH, V., Dahan J, Jeandroz S, Pichereaux C, Rossignol M and Wendehenne D (2011) Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-1 induced cell death in plants. New Phytol.: In press

Boyle P, Le Su E, Rochon A, Shearer HL, Murmu J, Chu JY, Fobert PR and Despres C (2009) The BTB/POZ domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. Plant Cell 21: 3700-3713

Burza AM, Pekala I, Sikora J, Siedlecki P, Malagocki P, Bucholc M, Koper L, Zielenkiewicz P, Dadlez M and Dobrowolska G (2006) *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. Journal of Biological Chemistry 281: 34299-34311

Champion A, Kreis M, Mockaitis K, Picaud A and Henry Y (2004) *Arabidopsis* kinome: after the casting. Functional & Integrative Genomics 4: 163-187

Chehab EW, Patharkar OR, Hegeman AD, Taybi T and Cushman JC (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced Calcium-Dependent Protein Kinase from ice plant. Plant Physiology 135: 1430-1446

Chen L-T, Luo M, Wang Y-Y and Wu K (2010) Involvement of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. Journal of Experimental Botany 61: 3345-3353

Chen L-T and Wu K (2010) Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. Plant Signaling Behaviour 5: 1318-1320

Chen ZJ and Tian L (2007) Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1769: 295-307

Cheong MS, Park HC, Hong MJ, Lee J, Choi W, Jin JB, Bohnert HJ, Lee SY, Bressan RA and Yun DJ (2009) Specific domain structures control abscisic acid-, salicylic acid-, and stress-mediated SIZ1 phenotypes. Plant Physiology 151: 1930-1942

Choi H-i, Park H-J, Park JH, Kim S, Im M-Y, Seo H-H, Kim Y-W, Hwang I and Kim SY (2005) *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. Plant Physiology 139: 1750-1761

Clarke S (1993) Protein methylation. Current Opinion in Cell Biology 5: 977-983

Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. Trends in Biochemical Sciences 25: 596-601

Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P and Sadanandom A (2008) Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. Plant Cell 20: 2894-2908

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ and Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. Cell 118: 545-553

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. Biochemical Journal 418: 191-200

Dahan J, Wendehenne D, Ranjeva R, Pugin A and Bourque S (2010) Plant protein kinases: still enigmatic components in plant cell signalling. New Phytologist 185: 355-368

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D and Milzani A (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. Trends in Biochemical Sciences 34: 85-96

Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG and Harper JF (2003) Subcellular targeting of nine Calcium-Dependent Protein Kinase isoforms from *Arabidopsis*. Plant Physiology 132: 1840-1848

Dangl M, Brosch G, Haas H, Loidl P and Lusser A (2001) Comparative analysis of HD2 type histone deacetylases in higher plants. Planta 213: 280-285

Demetriou K, Kapazoglou A, Bladenopoulos K and Tsaftaris A (2009) Epigenetic chromatin modifiers in barley: II. Characterization and expression analysis of the *HDA1* family of barley histone deacetylases during development and in response to jasmonic acid. Plant Molecular Biology Reporter 28: 9-21

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: 2181-2191

Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q and Zhu JK (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 103: 8281-8286

Droillard M-J, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H and Laurière C (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions: Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. FEBS Letters 527: 43-50

Droillard M-J, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H and Laurière C (2004) Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. FEBS Letters 574: 42-48

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C and Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. Trends in Plant Science 15: 573-581

Durner J, Wendehenne D and Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 10328-10333

Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W and Pikaard CS (2006) Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. Genes & Development 20: 1283-1293

Exner V, Aichinger E, Shu H, Wildhaber T, Alfarano P, Caflisch A, Gruissem W, Kohler C and Hennig L (2009) The chromodomain of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 is essential for H3K27me3 binding and function during Arabidopsis development. Plos One 4: e5335

Fan W and Dong X (2002) *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid–mediated gene activation in *Arabidopsis*. Plant Cell 14: 1377-1389

Feng Q, Wang HB, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K and Zhang Y (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. Current Biology 12: 1052-1058

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R and Pavletich NP (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature 401: 188-193

Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C and Durner J (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. Plant Journal 23: 817-824

Fong PM, Tian L and Chen ZJ (2006) *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 1 (AtHD1) is localized in euchromatic regions and demonstrates histone deacetylase activity *in vitro*. Cell Research 16: 479-488

Fu H, Lin YL and Fatimababy AS (2010) Proteasomal recognition of ubiquitylated substrates. Trends in Plant Science 15: 375-386

Fu W, Wu K and Duan J (2007) Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. Biochemical and Biophysical Research Communications 356: 843-850

Fuchs J, Demidov D, Houben A and Schubert I (2006) Chromosomal histone modification patterns - from conservation to diversity. Trends in Plant Science 11: 199-208

Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park S-Y, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL and Zhu J-K (2009) *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. Nature 462: 660-664

Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. Plant and Cell Physiology 50: 2123-2132

Gallwitz D (1971) Orgab specificity of histone acetyltranferases. FEBS Letters 13: 306-308

Gao M-J, Hegedus D, Sharpe A, Robinson S, Lydiate D and Hannoufa A (2007) Isolation and characterization of a GCN5-interacting protein from *Arabidopsis thaliana*. Planta 225: 1367-1379

Gao M-J, Schäfer UA, Parkin IAP, Hegedus DD, Lydiate DJ and Hannoufa A (2003) A novel protein from *Brassica napus* has a putative KID domain and responds to low temperature. Plant Journal 33: 1073-1086

Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S and Zhang Y (2008) MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. Cell Research 18: 1190-1198

Gardner KE, Zhou L, Parra MA, Chen X and Strahl BD (2011) Identification of Lysine 37 of Histone H2B as a Novel Site of Methylation. Plos One 13: e16244

Gary JD and Clarke S (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 61 61: 65-131

Gill SS and Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930

Gonzalez D, Bowen AJ, Carroll TS and Conlan RS (2007) The transcription corepressor LEUNIG interacts with the histone deacetylase HDA19 and mediator components MED14 (SWP) and CDK8 (HEN3) to repress transcription. Molecular and Cell Biology 27: 5306-5315

Gould K, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A and Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? Plant Cell Environment 16: 1851-1862

Guo L, Yin BL, Zhou JL, Li XY and Deng XW (2006) Development of rabbit monoclonal and polyclonal antibodies for detection of site-specific histone modifications and their application in analyzing overall modification levels. Cell Research 16: 519-527

Halford NG and Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. Biochemical Journal 419: 247-259

Hanks SK and Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. The FASEB Journal 9: 576-596

Hark AT, Vlachonasios KE, Pavangadkar KA, Rao S, Gordon H, Adamakis I-D, Kaldis A, Thomashow MF and Triezenberg SJ (2009) Two Arabidopsis orthologs of the transcriptional coactivator ADA2 have distinct biological functions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1789: 117-124

Harmon AC (2003) Calcium-regulated protein kinases of plants. Gravitatiobal and Space Biology Bulletin 16: 83-90

Hayes JJ and Hansen JC (2001) Nucleosomes and the chromatin fiber. Current Opinion in Genetics & Development 11: 124-129

Heine GF, Hernandez JM and Grotewold E (2004) Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. Journal of Biological Chemistry 279: 37878-37885

Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller M and Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. Planta 218: 938-946

Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED and Schroeder JI (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes & Development 24: 1695-1708

Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T and Shinozaki K (2000) Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant Journal 24: 655-665

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M and Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature: 795-800

Inoue A and Fujimoto D (1969) Enzymatic deacetylation of histone. Biochemical and Biophysical Research Communications 36: 146-150

Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, Cheng XD, Schubert I, Jenuwein T and Jacobsen SE (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. Chromosoma 112: 308-315

Jenuwein T and Allis CD (2001) Translating the histone code. Science 293: 1074-1080

Jenuwein T, Laible G, Dorn R and Reuter G (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. Cellular and Molecular Life Sciences 54: 80-93

Johnson L, Mollah S, Garcia BA, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF and Jacobsen SE (2004) Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. Nucleic Acids Research 32: 6511-6518

Johnson LM, Cao XF and Jacobsen SE (2002) Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. Current Biology 12: 1360-1367

Jones AME, MacLean D, Studholme DJ, Serna-Sanz A, Andreasson E, Rathjen JP and Peck SC (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Proteomics 72: 439-451

Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD and Cheong J-J (2008) Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Physiology 146: 623-635

Kaldis A, Tsementzi D, Tanriverdi O and Vlachonasios K (2011) *Arabidopsis thaliana* transcriptional co-activators ADA2b and SGF29a are implicated in salt stress responses. Planta 233: 749-762

Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S and Gribskov M (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. Plant Physiology 129: 908-925

Kim JM, To TK, Ishida J, Morosawa T, Kawashima M, Matsui A, Toyoda T, Kimura H, Shinozaki K and Seki M (2008) Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-Tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology 49: 1580-1588

Klimecka M and Muszynska G (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. Acta Biochimica Polonica 54: 219-233

Klose RJ and Yi Z (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 307-318

Kobayashi Y, Murata M, Minami H, Yamamoto S, Kagaya Y, Hobo T, Yamamoto A and Hattori T (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. Plant Journal 44: 939-949

Kornberg RD and Lorch YL (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98: 285-294

Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, Colcombet J, Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Hirt H and Machida Y (2010) The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 22: 3778-3790

Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. Current Opinion in Genetics & Development 12: 198-209

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. Cell 128: 693 - 705

Kudla J, Batistic O and Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. Plant Cell 22: 541-563

Kurepa J, Walker JM, Smalle J, Gosink MM, Davis SJ, Durham TL, Sung DY and Vierstra RD (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. Journal of Biological Chemistry 278: 6862-6872

Kwon CS, Lee D, Choi G and Chung WI (2009) Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in Arabidopsis. Plant Journal 60: 112-121

Lechner T, Lusser A, Pipal A, Brosch G, Loidl A, Goralik-Schramel M, Sendra R, Wegener S, Walton JD and Loidl P (2000) RPD3-type histone deacetylases in maize embryos. Biochemistry 39: 1683-1692

Lee DY, Teyssier C, Strahl BD and Stallcup MR (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. Endocrine Reviews 26: 147-170

Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B and Zhu JK (2001) The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger

protein that displays cold-regulated nucleo--cytoplasmic partitioning. Genes and Development 15: 912-924

Li J (2005) Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors. Current Opinion in Plant Biology 8: 526-531

Li S, Lauri A, Ziemann M, Busch A, Bhave M and Zachgo S (2009) Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 21: 429-441

Lin C-H, Li B, Swanson S, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM and Workman JL (2008) Heterochromatin protein 1a stimulates histone H3 lysine 36 demethylation by the Drosophila KDM4A demethylase. Molecular cell 32: 696-706

Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D and Durner J (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. Plant Cell 22: 2894-2907

Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V and Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. Nature 430: 471-476

Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T and Martienssen R (2003) Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and mistone modification. PLoS Biol 1: e67

Liu CY, Lu FL, Cui X and Cao XF (2010) Histone Methylation in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology, 61: 395-420

Lois LM, Lima CD and Chua NH (2003) Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. Plant Cell 15: 1347-1359

Lu FL, Li GL, Cui X, Liu CY, Wang XJ and Cao XF (2008) Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. Journal of Integrative Plant Biology 50: 886-896

Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. Annual Review of Plant Biology 54: 63-92

Luscombe NM, Laskowski RA and Thornton JM (2001) Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. Nucleic Acids Research 29: 2860-2874

Lusser A, Brosch G, loidl A, Haas H and Loidl P (1997) Identification of histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. Science 277: 88-91

Mao Y, Pavangadkar KA, Thomashow MF and Triezenberg SJ (2006) Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1759: 69-79

Mathieu O, Probst AV and Paszkowski J (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. Embo Journal 24: 2783-2791

May BP, Lippman ZB, Fang Y, Spector DL and Martienssen RA (2005) Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats. PLoS Genet 1: e79

Mazars C, Bourque S, Mithöfer A, Pugin A and Ranjeva R (2009) Calcium homeostasis in plant cell nuclei. New Phytologist 181: 261-274

Mehlmer N, Wurzinger B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R and Teige M (2010) The Ca^{2+}-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. Plant Journal 63: 484-498

Menke FLH, Kang H-G, Chen Z, Park JM, Kumar D and Klessig DF (2005) Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 1027-1034

Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF and Dobrowolska G (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid–induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. Plant Cell 12: 165-178

Miller GAD and Mittler RON (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? Annals of Botany 98: 279-288

Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua Z and Vierstra RD (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 107: 16512-16517

Miranda-Saavedra D and Barton GJ (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 68: 893-914

Mitchell JBO, Thornton JM, Singh J and Price SL (1992) Towards an understanding of the arginine aspartate interaction. Journal of Molecular Biology 226: 251-262

Mittler R, Kim Y, Song LH, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B and Zhu JK (2006) Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. Febs Letters 580: 6537 - 6542

Miura K and Hasegawa PM (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. Trends in Cellular Biology 20: 223-232

Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ and Hasegawa PM (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Cell 19: 1403-1414

Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ and Hasegawa PM (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 102: 7760-7765

Moorhead GBG, De wever V, Templeton G and Kerk D (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. Biochemical Journal 417: 401-409

Mou Z, Fan W and Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. Cell 113: 935-944

Murfett J, Wang X-J, Hagen G and Guilfoyle TJ (2001) Identification of Arabidopsis histone deacetylase hda6 mutants that affect transgene expression. Plant Cell 13: 1047-1062

Mylne JS, Barrett L, Tessadori F, Mesnage S, Johnson L, Bernatavichute YV, Jacobsen SE, Fransz P and Dean C (2006) LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 5012-5017

Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R and Gatz C (2007) SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. Plant Journal 50: 128-139

Nigam N, Singh A, Sahi C, Chandramouli A and Grover A (2008) SUMO-conjugating enzyme (Sce) and FK506-binding protein (FKBP) encoding rice (Oryza sativa L.) genes: genome-wide analysis, expression studies and evidence for their involvement in abiotic stress response. Molecular Genetics and Genomics 279: 371-383

Niu LF, Lu FL, Pei YX, Liu CY and Cao XF (2007) Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. EMBO Reports 8: 1190-1195

Owen DJ, Ornaghi P, Yang J-C, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P and Travers AA (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. EMBO Journal 19: 6141-6149

Palmieri MC, Sell S, Huang X, Scherf M, Werner T, Durner J and Lindermayr C (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in Arabidopsis thaliana: a bioinformatics approach. Journal of Experimental Botany 59: 177-186

Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW and Jorgensen RA (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. Nucleic Acids Research 30: 5036-5055

Pei YX, Niu LF, Lu FL, Liu CY, Zhai JX, Kong XF and Cao XF (2007) Mutations in the type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis(1[C][OA]). Plant Physiology 144: 1913-1923

Pipal A, Goralik-Schramel M, Lusser A, Lanzanova C, Sarg B, Loidl A, Lindner H, Rossi V and Loidl P (2003) Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. Plant Cell 15: 1904-1917

Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K, Lawrence RJ, Pikaard CS, Murfett J, Furner I, Vaucheret H and Scheid OM (2004) Arabidopsis distone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. Plant Cell 16: 1021-1034

Pulido P, Cazalis R and Cejudo FJ (2009a) An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. Plant Journal 57: 132-145

Pulido P, Dominquez F and Cejudo FJ (2009b) A hydrogen peroxide detoxification system in the nucleus of wheat seed cells: protection or signaling role? Plant Signaling Behavior 4: 23-25

Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. Plant Cell 20: 1693-1707

Qiu J-L, 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 Journal 27: 2214-2221

Quilis J, Penas G, Messeguer J, Brugidou C and Segundo BS (2008) The Arabidopsis AtNPR1 inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 1215-1231

Rao MV, Lee H-i and Davis KR (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. Plant Journal 32: 447-456

Rossi V, Hartings H and Motto M (1998) Identification and caracterisation of an RDP3 homologue from maize (*Zea mays* L.) that is able to complement an rpd3 null mutant of *Saccharomyces cerevisiaeI*. Molecular and General Genetics 258: 288-296

Rouhier N, Couturier J, Johnson MK and Jacquot J-P (2010) Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. Trends in Biochemical Sciences 35: 43-52

Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM and Grunstein M (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing andâ€‰transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 14503-14508

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P and Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. Trends in Plant Science 15: 247-258

Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O and Rodriguez PL (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. Plant Journal 37: 354-369

Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R and Rodriguez PL (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. Plant Physiology 141: 1389-1399

Samuel MA and Ellis BE (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. Plant Cell 14: 2059-2069

Saracco SA, Miller MJ, Kurepa J and Vierstra RD (2007) Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. Plant Physiology 145: 119-134

Schmitz RJ, Sung S and Amasino RM (2008) Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 411-416

Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R and Reuter G (2002) Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. EMBO Journal 21: 1121-1131

Serpa V, Vernal J, Lamattina L, Grotewold E, Cassia R and Terenzi H (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. Biochemical and Biophysical Research Communications 361: 1048-1053

Servet C, Conde E, Silva N and Zhou DX (2010) Histone acetyltransferase AtGCN5/HAG1 is a versatile regulator of developmentat and inducible gene expression in *Arabidopsis*. Molecular Plant 3: 670-677

Seth D and Stamler JS (2011) The SNO-proteome: causation and classifications. Current Opinion in Chemical Bioogyl 15: 129-136

Shaikhali J, Heiber I, Seidel T, Stroher E, Hiltscher H, Birkmann S, Dietz K-J and Baier M (2008) The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. BMC Plant Biology 8: 48

Shi YJ, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA and Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear arnine oxidase homolog LSD1. Cell 119: 941-953

Spedaletti V, Polticelli F, Capodaglio V, Schinina ME, Stano P, Federico R and Tavladoraki P (2008) Characterization of a lysine-specific histone demethylase from *Arabidopsis thaliana*. Biochemistry 47: 4936-4947

Spoel SH, Tada Y and Loake GJ (2010) Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. New Phytologist 186: 333-339

Sridha S and Wu K (2006) Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. Plant Journal 46: 124-133

Stamler JS, Singel DJ and Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science 258: 1898-1902

Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ and Thomashow MF (2001) Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. Nucleic Acids Research 29: 1524-1533

Strahl BD and Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403: 41-45

Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K and Ishihama Y (2008) Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. Molecular System Biology 4

Sung SB, He YH, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, Nakahigashi K, Goto K, Jacobsen SE and Amasino RM (2006) Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. Nature Genetics 38: 706-710

Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J and Dong X (2008) Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. Science 321: 952-956

Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD and Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. Nature Structiral & Molecular Biology 14: 1025-1040

Teige M, Scheikl E, Eugelm T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl J and Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. Molecular Cell 15: 141-152

Tian L and Chen ZJ (2001) Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 200-205

Tian L, Fong MP, Wang JJ, Wei NE, Jiang H, Doerge RW and Chen ZJ (2005) Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. Genetics 169: 337-345

Tian L, Wang J, Fong MP, Chen M, Cao H, Gelvin SB and Chen ZJ (2003) Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (AtHD1) expression. Genetics 165: 399-409

Tör M, Lotze MT and Holton N (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. Journal of Experimental Botany 60: 3645-3654

Trujillo M and Shirasu K (2010) Ubiquitination in plant immunity. Current Opinion in Plant Biology 13: 402-408

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P and Zhang Y (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature 439: 811-816

Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G and Colot V (2007) Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. Plos Genetics 3: 855-866

Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T and Shinozaki K (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 106: 17588-17593

Vaillant I and Paszkowski J (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. Current Opinion in Plant Biology 10: 528-533

van Dijk K, Ding Y, Malkaram S, Riethoven JJM, Liu R, Yang JY, Laczko P, Chen H, Xia YN, Ladunga I, Avramova Z and Fromm M (2010) Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology 10

Varotto S, Locatelli S, Canova S, Pipal A, Motto M and Rossi V (2003) Expression profile and cellular localization of maize Rpd3-type histone deacetylases during plant development. Plant Physiology 133: 606-617

Vidal M, Buckley AM, Hilger F and Gaber RF (1990) Direct selection for mutants with increased K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 125: 313-320

Vitecek J, Reinohl V and Jones RL (2008) Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. Molecular Plant 1: 270-284

Wang C, Gao F, Wu J, Dai J, Wei C and Li Y (2010) Arabidopsis putative deacetylase AtSRT2 regulates basal defense by supressing PAD4, EDS5 and SID2 expression. Plant Cell Physiology 51: 1291-1299

Wang X, Zhang Y, Ma QB, Zhang ZL, Xue YB, Bao SL and Chong K (2007) SKB1-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in Arabidopsis. EMBO Journal 26: 1934-1941

Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD and Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. Science 306: 279-283

Wawer I, Bucholc M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wyslouch-Cieszynska A, Zareba-Koziol 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. Biochemical Journal 429: 73-83

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB and Johnson GL (1999) Mitogen-Activated Protein Kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiological Reviews 79: 143-180

Witte C-P, Keinath N, Dubiella U, Demoulière R, Seal A and Romeis T (2010) Tobacco Calcium-dependent Protein Kinases are differentially phosphorylated *in vivo* as part of a kinase cascade that regulates stress response. Journal of Biological Chemistry 285: 9740-9748

Wormuth D, Heiber I, Shaikali J, Kandlbinder A, Baier M and Dietz K-J (2007) Redox regulation and antioxidative defence in Arabidopsis leaves viewed from a systems biology perspective. Journal of Biotechnology 129: 229-248

Wu K, Malik K, Tian L, Brown D and Miki B (2000) Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 44: 167-176

Wu K, Tian L, Zhou C, Brown D and Miki B (2000) Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 hitone deacetylases. Plant Journal 34: 241-247

Xiong T-C, Bourque S, Lecourieux D, Amelot N, Grat S, Brière C, Mazars C, Pugin A and Ranjeva R (2006) Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1763: 1209-1215

Yan D, Zhang Y, Niu L, Yuan Y and Cao X (2007) Identification and characterization of two closely related histone H4 arginine 3 methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical Journal 408: 113-121

Yap Y-K, Kodama Y, Waller F, Chung KM, Ueda H, Nakamura K, Oldsen M, Yoda H, Yamaguchi Y and Sano H (2005) Activation of a novel transcription factor through phosphorylation by WIPK, a wound-induced mitogen-activated protein kinase in tobacco plants. Plant Physiology 139: 127-137

Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S and Nakashita H (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. Plant Cell 20: 1678-1692

Yoo CY, Miura K, Jin JB, Lee J, Park HC, Salt DE, Yun DJ, Bressan RA and Hasegawa PM (2006) SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. Plant Physiology 142: 1548-1558

Yoo S-D, Cho Y-H, Tena G, Xiong Y and Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C_2H_4 signalling. Nature 451: 789-795

Zhang K, Sridhar VV, Zhu J, Kapoor A and Zhu JK (2007) Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabisopsis thaliana*. PLoS One 2: e1210

Zhang KL, Tang H, Huang L, Blankenship JW, Jones PR, Xiang F, Yau PM and Burlingame AL (2002) Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and

nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry 306: 259-269

Zhang LW, Eugeni EE, Parthun MR and Freitas MA (2003) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. Chromosoma 112: 77-86

Zhang S and Klessig DF (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 7225-7230

Zhang X, Germann S, Blus BJ, Khorasanizadeh S, Gaudin V and Jacobsen SE (2007) The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. Nature Structural & Molecular Biology 14: 869-871

Zhang XY, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J and Jacobsen SE (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. Plos Biology 5: 1026-1035

Zhang Y and Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes & Development 15: 2343-2360

Zhang ZL, Zhang SP, Zhang Y, Wang X, Li D, Li QL, Yue MH, Li Q, Zhang YE, Xu YY, Xue YBA, Chong K and Bao SL (2011) Arabidopsis floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. Plant Cell 23: 396-411

Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B and Wu K (2005) HISTONE DEACETYLASE 19 is involved in jasmonic acid and ethylene signalling of pathogen response in *Arabidopsis*. Plant Cell 17: 1196-1204

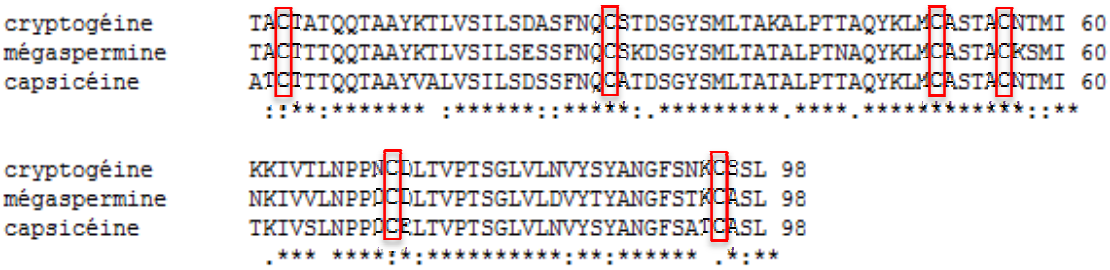


Figure 3 : **Alignement de séquences d'élicitines sécrétées par différentes espèces de *Phytophthora*.** La cryptogéine et la mégaspermine sont des élicitines basiques. La capsicéine est une élicitine acide. Les acides aminés présentant des identités de séquences sont annotés par une étoile (*) à l'aide de l'application ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). Les six résidus cystéine conservés et impliqués dans la formation de ponts disulfure sont encadrés en rouge.

2.2. Le modèle Tabac/élicitines

Les *Phytophthora* constituent un genre du groupe des oomycètes qui comprend environ 500 espèces. Ce sont des micro-organismes hétérotrophes qui ont la particularité de ne pouvoir synthétiser les stérols nécessaires à leur reproduction (Hendrix & Guttman, 1970).
Certaines espèces de *Phytophthora* peuvent être pathogènes : par exemple, *Phytophthora infestans* est l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre, entre autres à l'origine d'une famine sans précédent en Irlande au milieu du XIX^{ème} siècle. Par ailleurs, parmi les différentes espèces de *Phytophthora*, *P. parasitica var. nicotianae* constitue la seule espèce pathogène pour le tabac. L'interaction compatible entre *P. parasitica var. nicotianae* et le tabac provoque la maladie du pied-noir, qui se traduit par l'envahissement et le pourrissement du pied de tabac. En revanche, d'autres espèces de *Phytophthora* comme *Phytophthora cryptogea* interagissent de manière incompatible avec le tabac, ce qui se traduit par l'apparition de nécroses foliaires qui témoignent de la mise en place d'une RH et par l'établissement de la RSA vis-à-vis d'un large spectre d'agents pathogènes dont *Phytophthora parasitica var. nicotianae* (Bonnet *et al.*, 1986 ; Keller *et al.*, 1996). Des travaux menés à l'INRA d'Antibes, par l'équipe de P. Ricci, sur la perception des *Phytophthora* par le tabac associée à la mise en place de réactions de défense, ont conduit à la caractérisation de petites protéines sécrétées appelées élicitines (Bonnet *et al.*, 1986 ; Ricci *et al.*, 1989).

2.2.1. Les élicitines des oomycètes

2.2.1.1. Caractéristiques et fonctions

Les élicitines sont des protéines globulaires d'environ 10 kDa sécrétées par plus de 30 espèces de *Phytophthora* et quelques espèces de *Pythium* (Panabières *et al.*, 1997). Elles présentent plusieurs caractéristiques structurelles communes. En effet, les élicitines sont pour la plupart constituées de 98 acides aminés et présentent 68 à 94 % d'identité de séquences (Ricci *et al.*, 1993). La composition en acides aminés de la cryptogéine (sécrétée par *P. cryptogea*), de la capsicéine (sécrétée par *P. capsici*) et de la mégaspermine (sécrétée par *P. megasperma*) est présentée dans la Figure 3. La comparaison des séquences indique une position invariable

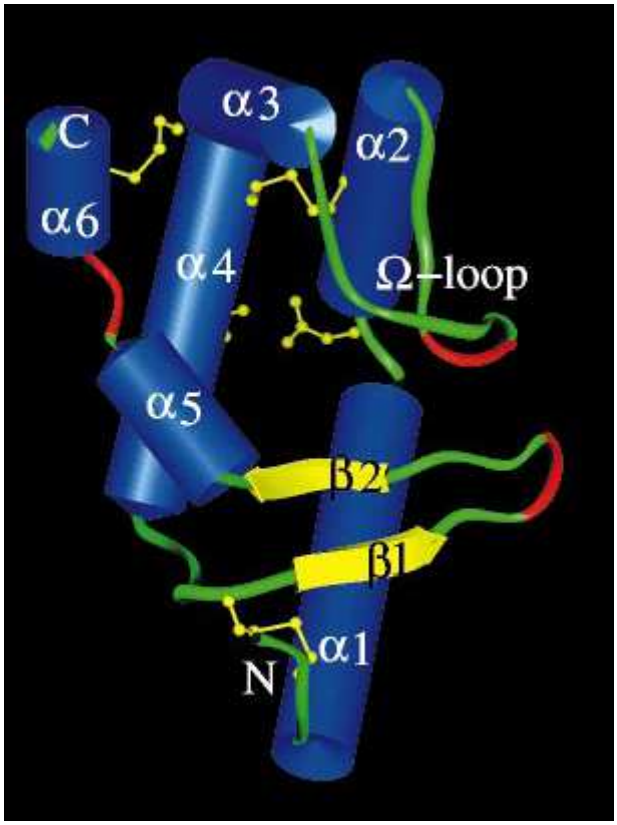


Figure 4 : **Structure tridimensionnelle de la cryptogéine (D'après Boissy *et al*., 1996).** La cryptogéine est composée de six hélices α (représentées en bleu), de deux feuillets β (représentés en jaune) et d'une boucle Ω. Cette structure est obtenue par l'établissement de trois ponts disulfure (représentés en jaune) entre les six résidus cystéine conservés.

pour 6 résidus cystéine impliqués dans la formation de trois ponts disulfure intramoléculaires essentiels pour l'activité des élicitines (Boissy *et al.*, 1996 ; Fefeu *et al.*, 1997). L'analyse des séquences des élicitines révèle également que 4 acides aminés sont majoritairement représentés (leucine, sérine, alanine, thréonine) alors que 3 autres sont absents (histidine, tryptophane, arginine). Mis à part l'élimination d'une séquence N-terminale de sécrétion, les élicitines ne subissent pas de modifications post-traductionnelles (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992). La structure tridimensionnelle de la cryptogéine, obtenue par diffraction aux rayons X, révèle la présence de 6 hélices α, constituant une face hydrophile en contact avec le solvant, ainsi que 2 feuillets β et une boucle Ω qui définissent une cavité hydrophobe. La boucle Ω pourrait correspondre au site d'interaction de l'éliciteur avec un récepteur potentiel (Boissy *et al.*, 1996 ; Figure 4).

Malgré leur forte similarité de séquences, les élicitines présentent des charges nettes qui diffèrent et sont ainsi réparties en 2 classes distinctes : les élicitines α ou acides, telles que la capsicéine ou la parasiticéine, présentent un point isoélectrique inférieur à 5 et ne sont nécrosantes qu'à forte concentration (au-delà du µM) ; les élicitines β ou basiques, comme la cryptogéine, la cinnamomine ou la mégaspermine, présentent un point isoélectrique supérieur à 7 et sont nécrosantes à faible concentration (de l'ordre de 10 nM ; Bonnet *et al.*, 1996). Le traitement des plants de tabac par les élicitines s'accompagne d'une protection de la plante hôte, les élicitines basiques étant plus efficaces que les élicitines acides (Ricci *et al.*, 1989). Toutes les espèces de *Phytophthora* produisent des élicitines α alors que les élicitines β sont sécrétées par un nombre restreint d'espèces (Ponchet el al., 1999). L'une des fonctions des élicitines serait de capturer les stérols dans les membranes des cellules hôtes au profit du micro-organisme (Ponchet *et al.*, 1999 ; Vauthrin *et al.*, 1999). Le besoin essentiel des espèces de *Phytophthora* en stérols pourrait donc justifier la conservation au cours de l'évolution des gènes codant les élicitines.

2.2.1.2. Implication dans le développement de réactions de défense des plantes

Les différents travaux effectués chez les monocotylédones et les dicotylédones ont rapporté que seules les espèces de tabac mais également quelques espèces de la famille des Brassicacées telles que le colza ou le radis développent une réponse de type RH après un traitement par les élicitines de *Phytophthora* par infiltration ou application au niveau du

pétiole de feuilles détachées (Bonnet *et al.*, 1996). L'intensité des réponses induites varie selon l'espèce et le cultivar. L'origine de cette différence de réactivité entre les espèces végétales vis-à-vis des élicitines reste peu documentée à ce jour.

Les élicitines de *Phytophthora* sont également capables d'induire une réponse de type RSA contre un large spectre d'agents pathogènes fongiques et bactériens. Par exemple, certaines variétés de radis préalablement traitées par des élicitines deviennent résistantes à la bactérie phytopathogène *X. campestris* pv. *armoraciae* (Kamoun *et al.*, 1993). De la même manière, des plants de tabac prétraités par des élicitines, par application pétiolaire ou au niveau de la tige de plants décapités, sont résistants à une inoculation ultérieure avec des agents pathogènes tels que *P. parasitica* var. nicotianae, *Sclerotinia sclerotium, Erysiphe cichoracearum* ou encore *Peronospora tabacina* (Bonnet *et al.*, 1996 ; Blancard *et al.*, 1998). Pour certaines espèces comme la tomate ou le poivron, les élicitines sécrétées par des *Phytophthora* n'induisent pas de protection : les interactions avec les champignons correspondants sont de type compatible (Bonnet *et al.*, 1996).

Cependant, l'oligandrine, une élicitine qui est sécrétée par *Pythium oligandrum* et présente des propriétés biochimiques comparables à celles des élicitines de *Phytophthora*, n'induit aucune réponse de type RH chez la tomate ou le tabac (Picard *et al.*, 2000). L'oligandrine est en revanche capable d'induire une réponse de type RSA, rendant notamment la tomate résistante aux agents pathogènes *P. parasitica* et *Fusarium oxysporum*, et protège également le tabac contre les espèces pathogènes de *Phytophthora* (Picard *et al.*, 2000 ; Benhamou *et al.*, 2001).

Au cours de la mise en place de ces réponses de résistance, divers éléments de défense peuvent être observés, comme par exemple une augmentation du taux de transcrits de gènes codant des protéines PR, une production d'ET et de phytoalexines comme le capsidiol, ou encore la peroxydation de lipides membranaires (Milat *et al.*, 1990 ; Keller *et al.*, 1996 ; Rustérucci *et al.*, 1996).

2.2.2. La cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense

La cryptogéine est une élicitine β qui présente un pI de 8,49 et qui a été initialement purifiée du filtrat de culture de l'oomycète *P. cryptogea* (Ricci *et al.*, 1989). L'utilisation de suspensions cellulaires de tabac a permis de montrer que la cryptogéine constituait l'une des

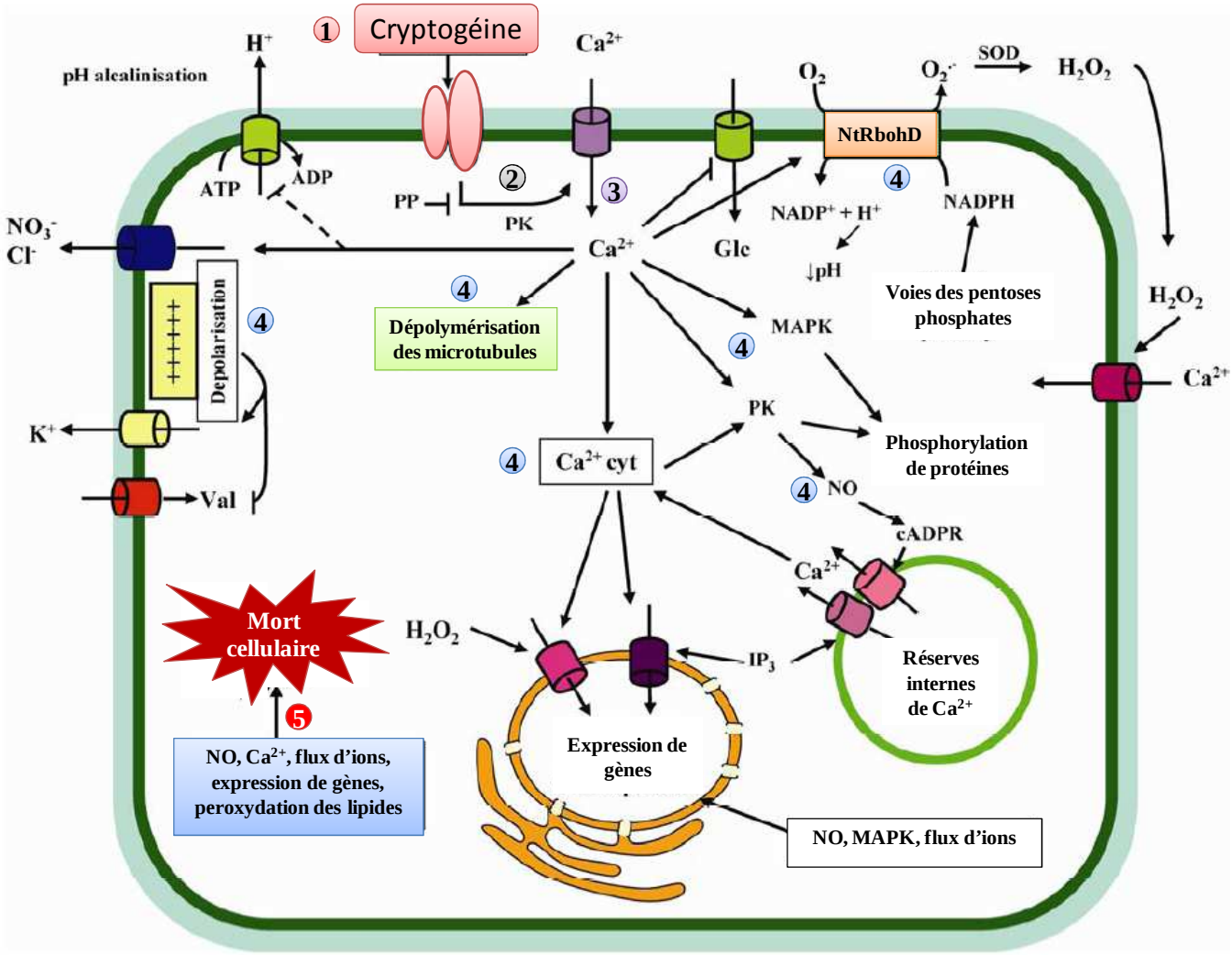


Figure 5 : Représentation schématique des événements déclenchés par la cryptogéine dans des suspensions cellulaires de tabac. La cryptogéine est reconnue par des sites de haute affinité au niveau de la membrane plasmique qui présentent les caractéristiques biochimiques de récepteur (**1**). La perception de la cryptogéine s'accompagne d'événements de phosphorylation impliquant des protéines kinases (PK; **2**) agissant en amont d'un influx de Ca^{2+} (**3**). Cet influx de Ca^{2+} est nécessaire à la mobilisation d'autres acteurs de signalisation (**4**). Parmi ceux-ci, figurent des efflux d'anions concourant à une dépolarisation membranaire compensée par un efflux de potassium, l'activation de la NtRbohD membranaire impliquée dans la formation de FAO à partir du NADPH et du dioxygène, une production de NO et l'activation de protéines kinases incluant des MAPK. Ces événements contribuent à une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique (Ca^{2+} cyt). Une dépolimérisation des microtubules est également observée. L'ensemble de ces événements conduit à l'expression de réponses de défense de la cellule (**5**) manifestées par une modulation de l'expression génique conduisant notamment à une mort cellulaire programmée. Une flèche indique un contrôle positif alors qu'une barre indique un contrôle négatif. **D'après Garcia-Brugger *et al*. (2006).**

élicitines les plus actives dans l'induction des réponses de défense (Rustérucci *et al.*, 1996 ; Bourque *et al.*, 1998). Les suspensions cellulaires de tabac *N. tabacum cv.* Xanthi ont ainsi constitué un modèle biologique de choix pour décrypter les événements de signalisation cellulaire impliqués dans la mise en place des réponses de défense déclenchées par la cryptogéine.

2.2.2.1. La reconnaissance spécifique de la cryptogéine

La reconnaissance de l'éliciteur par les cellules de tabac est une étape sous-jacente à la mise en place de réactions de défense. Une étude menée avec de faibles concentrations de cryptogéine marquée à l'iode 125 a permis de mettre en évidence l'existence de sites de haute affinité pour la cryptogéine, situés au niveau de la membrane plasmique des cellules de tabac. L'affinité de la cryptogéine pour ces sites de fixation est de l'ordre de 2 nM, la fixation étant saturable, réversible et dépendante du pH, des caractéristiques attendues d'un récepteur (Wendehenne *et al.*, 1995). De travaux complémentaires réalisés avec trois autres élicitines (cinnamomine, capsicéine, parasiticéine) sécrétées par diverses espèces de *Phytophthora* ont révélé que ces élicitines, acides ou basiques, interagissaient avec ces mêmes sites de fixation (Bourque *et al.*, 1998). La capacité à fixer les stérols et l'affinité pour ces sites de fixation diminuent simultanément lors de mutations de la cryptogéine, suggérant que les sites de haute affinité interagiraient préférentiellement avec le complexe cryptogéine/stérol (Osman *et al.*, 2001). L'interaction entre les élicitines et ces sites de haute affinité est primordiale pour l'induction de leur activité biologique (Bourque *et al.*, 1998). Ces sites de haute affinité seraient constitués de deux N-glycoprotéines plasmalemmiques, de masses moléculaires respectives de 162 et 50 kDa, qui seraient directement impliquées dans la reconnaissance de l'éliciteur (Bourque *et al.*, 1999). L'identité de ces sites de fixation reste inconnue à ce jour.

2.2.2.2. La signalisation induite par la cryptogéine

La reconnaissance de la cryptogéine par les cellules de tabac déclenche une cascade complexe de signalisation cellulaire dès les premières secondes qui suivent sa perception, ce qui conduit à la mise en place de défenses (Figure 5). Cette cascade de signalisation implique en premier lieu des réactions de phosphorylation de protéines (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000),

conséquence de l'activation de protéines kinases (PK ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). L'utilisation d'inhibiteurs généraux des PK tel que la staurosporine bloque les effets de la cryptogéine dans les cellules de tabac alors que l'inhibition de phosphatases par la calyculine A mime un grand nombre d'entre eux (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000), suggérant qu'un mécanisme très dynamique de phosphorylation / déphosphorylation est nécessaire pour l'induction des réponses de défense. Ces événements de phosphorylation sont suivis par un influx massif et continu de Ca^{2+} extracellulaire (Tavernier *et al.*, 1995). Cet influx de Ca^{2+} est déterminant pour l'initiation des événements en aval dans la cascade de signalisation induite par la cryptogéine. En effet, aucun de ces effets n'est induit lorsque l'influx de Ca^{2+} est inhibé par l'ion La^{3+}, un compétiteur du Ca^{2+} pour les canaux perméables au Ca^{2+}, ou lorsque le Ca^{2+} extracellulaire est chélaté par l'EGTA (Tavernier *et al.*, 1995 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Bourque *et al.*, 2002). L'influx de Ca^{2+} est à l'origine d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Lecourieux *et al.*, 2002) et de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ (Lecourieux *et al.*, 2005) mais est aussi indispensable à des efflux d'anions, notamment Cl^- et NO_3^-, qui participent à la dépolarisation membranaire (Pugin *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002). Cette dernière est compensée par un efflux de K^+ (Pugin *et al.*, 1997). L'efflux d'anions participerait à la modulation de l'expression de gènes de défense tels que *HSR203J* (*hypersensitive-related gene 203 J)* ou *VPE (vacuolar processing enzymes),* des gènes classiquement associés à la RH (Pugin *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002 ; Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Gauthier *et al.*, 2007).

L'influx initial de Ca^{2+} est également indispensable à l'activation de PK et en particulier de MAPK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Les MAPK jouent un rôle clé dans la transduction du signal qui conduit à l'expression des défenses de la plante en modulant l'expression de nombreux gènes de défense (Pitzchke, 2009). En réponse à la cryptogéine, les protéines kinases SIPK (Zhang & Klessig, 1998) et WIPK (Zhang *et al.*, 2000) sont phosphorylées après quelques minutes de traitement des cellules de tabac. Ces deux MAPK seraient impliquées dans la régulation de gènes de défense et de la RH déclenchées par la cryptogéine chez le tabac (Zhang & Klessig, 2001). Parmi les PK nucléaires, SIPK a récemment été mise en évidence comme étant rapidement activée en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009).

Une production de monoxyde d'azote (NO) est également dépendante de l'influx initial de Ca^{2+}. Le NO produit en réponse à la cryptogéine contribue à l'enrichissement du cytosol en Ca^{2+} libre en mobilisant le Ca^{2+} provenant des réserves internes de la cellule (Lamotte *et al.*, 2006). Le NO participerait également à la modulation de l'expression de gènes de défense et

contribuerait de manière partielle à l'établissement de la mort cellulaire de type RH (Lamotte *et al.*, 2004).

Enfin la cryptogéine déclenche également dans les cellules de tabac la dépolymérisation des microtubules et la perturbation de certains réseaux de filaments d'actines, ce qui conduit à la rupture du tonoplaste et à la mort de la cellule (Binet *et al.*, 2001 ; Higaki *et al.*, 2007).

OBJECTIFS DE THESE

Les événements de signalisation cellulaire induite par des éliciteurs tels que la cryptogéine convergent vers le noyau ou s'effectue la modulation très fine de l'expression de gènes et concourant à l'élaboration des réponses de défense adaptées. Toutefois, comme nous avons pu le voir dans ce chapitre d'introduction, si de nombreux événements de signalisation sont maintenant bien caractérisés à la fois dans le cytosol et au niveau de la membrane plasmique, il n'en va pas de même pour le compartiment nucléaire où finalement seules des variations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ libre ont été décrites (Lecourieux *et al.*, 2005). Récemment, des approches biochimiques menées au laboratoire ont permis d'identifier deux isoformes nucléaires redondants d'HDAC de type 2, nommés NtHD2a et NtHD2b, sur la base de leur phosphorylation très précoce en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac. Mon travail de thèse s'est inscrit dans l'étude de ces deux protéines *via* deux principaux axes :

1. **Le premier axe a été centré sur l'étude du rôle de NtHD2a/b dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans les cellules de tabac.** Pour ceci, nous avons utilisé des approches pharmacologiques, *via* l'utilisation d'inhibiteurs d'activité HDAC, mais également des approches de surexpression et d'interférence à ARN pour mettre en évidence l'importance de NtHD2a/b dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine.

2. **Le deuxième axe a concerné l'étude des événements de signalisation cellulaire impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine et dépendants de NtHD2a/b.** Nous avons pour cela essayé d'identifier, dans une lignée cellulaire de tabac invalidée pour l'expression de *NtHD2a/b*, les événements de signalisation cellulaire qui permettent d'expliquer quel(s) mécanisme(s) contrôle(nt) la mort cellulaire sous la dépendance de NtHD2a/b.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Suspensions cellulaires

La suspension cellulaire de tabac utilisée en routine (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) a été générée au laboratoire à partir de cals issus de tissus foliaires. La lignée de cellules CL5, invalidées pour l'expression des gènes *NtHD2a/b* par une approche d'interférence à ARN, a été obtenue au laboratoire (décrit § 2.1 de cette section ; Dutartre, 2008).

Les cellules sont cultivées dans le milieu de Chandler (Chandler *et al.*, 1972). Les cultures sont maintenues sous agitation (120 rpm) et lumière (2.10^3 ergs.cm^{-2}.s^{-1}) constantes en salle climatisée (24°C). Les suspensions cellulaires sont repiquées en fin de phase exponentielle de croissance tous les 7 jours. Pour la mesure des activités biologiques, les suspensions cellulaires saturées, soit au bout de 7 jours de croissance, sont diluées au demi par addition de milieu de culture neuf 24 h avant leur utilisation.

Pour mesurer la production de H_2O_2 et de monoxyde d'azote (NO), les suspensions cellulaires diluées au demi 24 h auparavant sont lavées 3 fois successivement avec le tampon H10 (HEPES-KOH 10 mM, D-mannitol 175 mM, K_2SO_4 0,5 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM, pH 6,2) et resuspendues à raison de 0,1 g de poids frais de cellules (PFC) par mL de tampon pour équilibration pendant 1 h à 24°C sous agitation permanente (130 rpm).

1.2. Plants de tabac

Les plants de tabac, sauvages ou correspondant à la lignée CL5 (lignées stables CL5-1 et CL5-2, issues d'un même cal), sont cultivés en serre sans contrôle d'hygrométrie dans les conditions suivantes : 16 h de jour à 22°C ($68,8.10^3$ ergs.cm^{-2}.s^{-1}) et 8 h de nuit à 18°C.

Les graines de tabac sont semées soit dans le terreau de culture soit sur un milieu de Hoagland.

1.3. Eliciteurs

La cryptogéine (Cry) et la β-mégaspermine (Méga) sont produites et purifiées au laboratoire respectivement à partir de filtrats de culture de *Phytophthora cryptogea* et *Phytophthora*

megasperma selon le protocole décrit par Bonnet *et al.* (1996). Elles sont préparées dans de l'eau ultra pure à une concentration de 100 µM et conservées à -20°C.

La capsicéine (Cap) et l'oligandrine (Olig), fournies par le Dr. M. Ponchet (INRA Sophia Antipolis, France), sont stockées à -20°C sous forme de solutions mères à une concentration de 100 µM dans de l'eau ultra pure.

Flag22 est un peptide de 22 acides aminés conservé de la partie N-terminale de la flagelline bactérienne, fournie par le Pr. J. Dürner (Institute of Biochemical Plant Pathology, Munich, Allemagne), stocké à -20°C sous forme de solution mère à une concentration de 100 $mg.mL^{-1}$ dans de l'eau ultra pure.

Les oligogalacturonides (OG, polymères d'acide α-1,4-D-galacturonique) sont fournis sous forme lyophilisée par la société Goëmar SA (Roscoff, France). La solution mère est préparée extemporanément à une concentration de 50 $mg.mL^{-1}$ dans de l'eau ultra pure.

1.4. Outils pharmacologiques

Les solutions mères de 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-l-oxyl-3-oxide (cPTIO), de cycloheximide (CHX), de butyrate de sodium (ButNa) sont préparées respectivement à 100 mM, 50 mM et 1 M dans de l'eau stérile. Le diphénylène iodonium (DPI) est préparé à 10 mM dans le DMSO. Le cPTIO, le CHX, le ButNa et le DPI sont utilisés à des concentrations finales respectives de 250-500 µM, 50 µM, 10 mM et 10 µM. Pour les témoins, les mêmes volumes en eau ou en DMSO sont ajoutés. Dans les expériences utilisant le DPI, la concentration finale de DMSO n'excède pas 0,25 %.

2. Méthodes

2.1. Obtention d'une lignée de tabac déficiente pour l'expression de *NtHD2a/b*

Une lignée de tabac dénommée CL5 (plantes et suspension cellulaires) et déficiente pour l'expression de *NtHD2a/b* a été obtenue au laboratoire (Dutartre, 2008). Brièvement, un

	Séquence des amorces 5'- 3'		
Annotation Amorce	**Sens**	**Antisens**	**Tm (°C) d'hybridation**
Sens (S)	ATC TCG AGG CGG AGG CAG AGA AGT CTA ATG	ATC TCG AGG GAC ACT CAA CTC AGA TAA GG	60
Antisens (AS)	CAA GAT CTA GCG GAG GCA GAG AAG TCT AAT	GCG GAT CCG CGG AGG CAG AGA AGT ATG TTG	60

Tableau 4 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le clonage de *NtHD2a/b* dans le vecteur pHANNIBAL.

fragment conservé de *NtHD2a/b* de 107 paires de bases (pb) est cloné dans les orientations sens (S) et antisens (AS) séparées d'un intron PDK dans le vecteur pHANNIBAL. Ce vecteur permet la synthèse d'un ARN dans la configuration « épingle à cheveux » pour initier l'extinction des gènes *NtHD2a/b* par un mécanisme d'interférence à ARN (Wesley *et al.*, 2001). Les amorces utilisées pour obtenir cette construction sont listées dans le Tableau 4. Des bactéries *E. Coli* JM109 compétentes sont transformées par choc thermique (42°C, 2 mn) par le vecteur pHANNIBAL ainsi obtenu. Les bactéries transformées sont sélectionnées à 37°C sur milieu LB gélosé contenant de l'ampiciline à 50 $\mu g.mL^{-1}$.

Après extraction du plasmide ci-dessus (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit ; Invitrogen), la construction « S-PDK intron-AS » sous le contrôle du promoteur fort CaMV35S est clonée dans le vecteur binaire pART27 (contenant les gènes de résistance à la spectinomycine et à la kanamycine). Des cellules d'*Agrobacterium tumefasciens* LBA4404 sont transformées par le vecteur ainsi obtenu par choc thermique (37°C, 2 mn) et sont ensuite sélectionnées à 28°C sur un milieu gélosé LB additionné de rifampicine et de spectinomycine ($50\ \mu g.mL^{-1}$).

Cette souche d'*A. tumefasciens* est soit utilisée pour éteindre de manière transitoire l'expression de *NtHD2a/b* par agroinfiltration de tissus foliaires de tabac selon la méthode décrite par English *et al.* (1997), soit pour transformer des disques foliaires de tabac et ainsi générer des cals avec une extinction stable de *NtHD2a/b*. Un de ces cals a été utilisé pour générer la lignée CL5.

2.2. Surexpression de NtHD2a fusionnée à la protéine GFP dans les plants de tabac

L'ADN complémentaire pleine longueur, sans le codon stop, codant NtDH2a est cloné dans le vecteur binaire pH7FWG2 (fourni par l'Institut de recherche en Sciences de la Vie VIB; Ghent, Belgique) en vue de la fusion de la séquence codant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) à l'extrémité N-terminale de NtHD2a (construction GFP-NtHD2a), le tout sous le contrôle du promoteur CaMV35S (Hammoudi, 2011). Des cellules d'*A. tumefasciens* LBA4404 sont transformées par le vecteur ainsi obtenu par choc thermique (37°C, 2 mn) et sont ensuite sélectionnées à 28°C sur un milieu gélosé LB additionné de

rifampicine et de spectinomycine (50 µg.mL^{-1}). Cette souche d'*A. tumefasciens* est utilisée pour induire l'expression transitoire de *NtHD2a* par agroinfiltration de tissus foliaires de tabac selon la méthode décrite par English *et al.* (1997).

Le vecteur pB7F2, fourni par le Dr. Garcion (INRA Bordeaux) et permettant la surexpression de la protéine GFP seule, est utilisé comme témoin de l'efficacité de transformation et de surexpression.

2.3. Traitement des cellules de tabac

Après dilution au demi 24 h avant l'expérience (voir § 1.1 de cette section), les cellules en suspension sont traitées directement dans leur milieu de culture par 100 nM d'élicitines (cryptogéine, capsicéine, mégaspermine ou oligandrine), par 0,1 mg.mL^{-1} de Flg22 ou par 0,1 mg.mL^{-1} d'OG. Les cellules en suspension contrôles sont traitées par un volume équivalent en eau. A l'issue du traitement, des aliquotes de 2,5 mL (environ 0,25 g) de cellules sont prélevées et filtrées sous vide sur des filtres GF/A, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Lors de l'utilisation d'inhibiteurs, les cellules sont incubées avec la molécule inhibitrice 10 minutes avant le traitement, un volume équivalent de solvant étant ajouté aux cellules contrôles le cas échéant.

2.4. Traitement des plants de tabac

2.4.1. Agroinfiltration des plants de tabac

2.4.1.1. Préparation de la solution d'A. tumefaciens

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Batoko *et al.* (2000), avec quelques modifications. Les cultures d'*A. tumefasciens* transformées par la construction « S-intron-AS » dans le vecteur pART27, par la construction GFP-NtHD2a dans le vecteur pH7FWG2 ou par le vecteur pB7F2 sont entretenues sur la nuit dans le milieu LB rifampicine / spectinomycine (50 µg.mL^{-1}) additionné d'acétosyringone (100 µM) sous agitation (220 rpm) à 28°C. Les suspensions bactériennes sont alors centrifugées pendant 5 mn à 2200 g à

température ambiante. Le culot est alors lavé successivement deux fois par un volume de tampon d'agroinfiltration (50 mM MES-KOH pH 5,6 ; 2 mM Na_3PO_4 ; 0,5 % glucose w/v ; 100 µM d'acétosyringone), puis au final repris dans ce même tampon de sorte que l'absorbance à 600 nm des suspensions obtenues soit comprise entre 0,1 et 0,2.

2.4.1.2. Méthodes d'agroinfiltration

L'agroinfiltration de la suspension d'*A. tumefasciens* transformée par la construction « S-intron-AS » dans le vecteur pART27 est réalisée sur de jeunes plants de tabac au stade 4 feuilles. La suspension d'*A. tumefasciens* est infiltrée dans l'ensemble des feuilles à l'aide d'une seringue de 1 mL (English *et al.*, 1997).

L'agroinfiltration de la suspension d'*A. tumefasciens* transformée par la construction GFP-NtHD2a dans le vecteur pH7FWG2 est réalisée dans des feuilles de tabac adultes à l'aide d'une seringue de 1 mL. Au bout de 48 h, la fluorescence de la protéine GFP est observée par microscopie optique à épifluorescence (Leica). En parallèle, des infiltrations de suspension d'*A. tumefaciens* transformée par le vecteur pB7F2 sont réalisées comme contrôle positif de l'expression de la GFP.

2.4.2. Observation de la réaction hypersensible (RH)

Les plants de tabac sont traités par infiltration suivant le protocole décrit par Wendehenne *et al.* (2002). Une feuille de chaque plante est infiltrée avec 500 µL de cryptogéine à 100 nM. Les plantes témoins sont infiltrées avec de l'eau. La réponse hypersensible, caractérisée par une nécrose de la zone infiltrée, est observée après 24 h de traitement.

2.5. Analyse des événements cellulaires

2.5.1. Mort cellulaire

La mort cellulaire est évaluée en utilisant le rouge neutre, un colorant vital qui colore en rouge la vacuole des cellules dont l'intégrité membranaire est conservée. Les cellules dont la vacuole est incolore sont considérées comme mortes (Naton *et al.*, 1996). Après 6 h et 24 h de

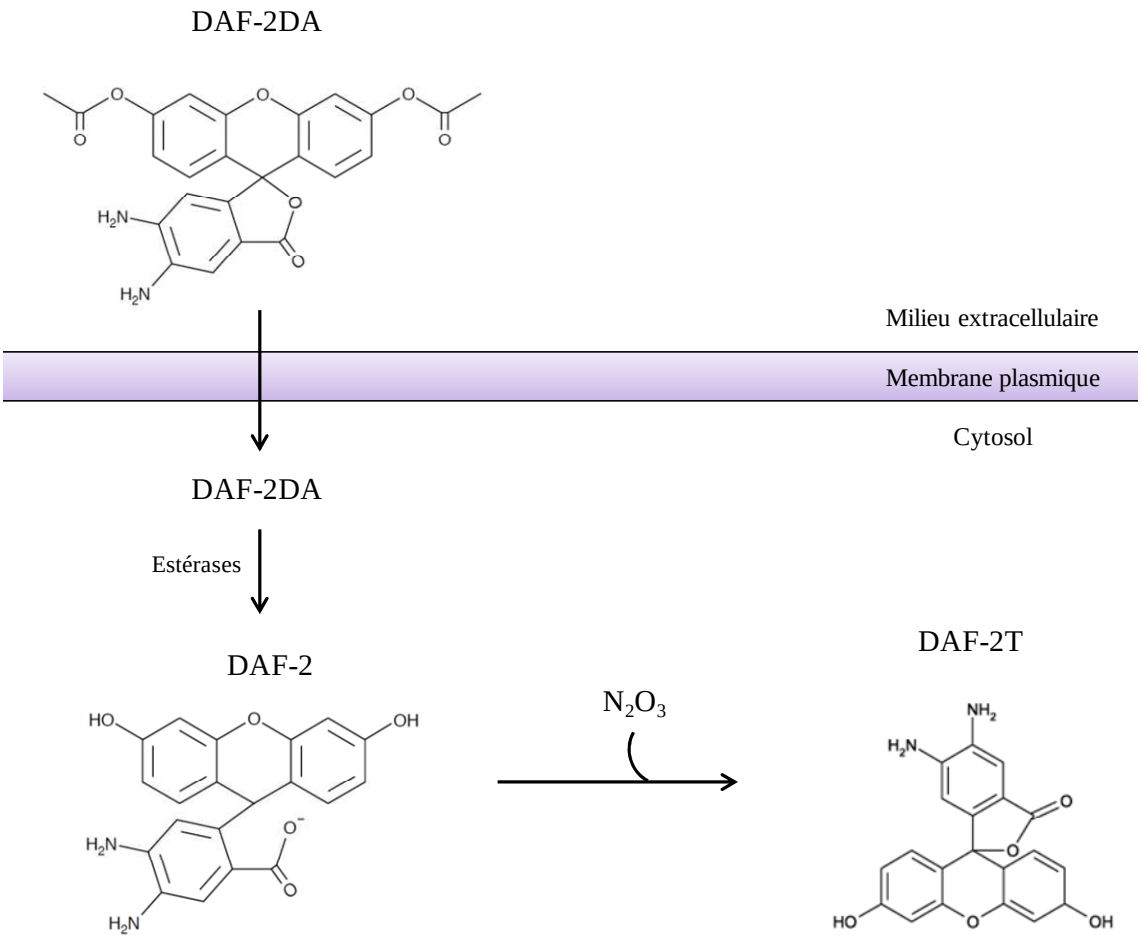
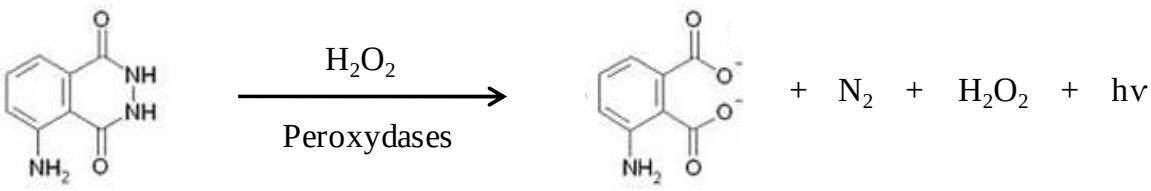


Figure 6 : Mesure de l'accumulation de NO intracellulaire avec la sonde DAF-2DA.
Le fluorophore DAF-2DA internalisé dans la les cellules est converti en DAF-2 suite au clivage de ses deux groupements acétates par des estérases. Le DAF-2 libéré est nitrosylé par des produits d'oxydation de NO (notamment N_2O_3) en un dérivé triazole (DAF-2T) fluorescent (λexc. = 488 nm; λém. = 510 nm).



Luminol

3-aminophtalate dianon

Figure 7 : Mesure de la production de H_2O_2 par chimioluminescence du luminol.

traitement, les cellules sont lavées deux fois dans un tampon HEPES-KOH 25 mM à pH 7,5, puis colorées au rouge neutre à 0,01 % (m/v). La mort cellulaire est évaluée par observation au microscope optique de 500 cellules pour chaque condition.

2.5.2. Production de monoxyde d'azote intracellulaire

La production de NO est estimée par mesure de la fluorescence du 4,5-diaminofluorescéine diacétate (DAF-2DA), une sonde fluorescente qui pénètre dans la cellule grâce à ses deux groupements acétate (Lamotte *et al.*, 2004). Après clivage de ces deux groupements acétate par des estérases intracellulaires, le DAF-2 libéré réagit spécifiquement avec des produits d'oxydation du NO (principalement le N_2O_3 et le NO^+) pour former un dérivé triazole fluorescent (DAF-2T ; $\lambda_{exc.}$ = 488 nm, $\lambda_{ém.}$ = 515 nm ; Figure 6).

2.5.3. Mesure de la production de H_2O_2 par chimioluminescence

La production de H_2O_2 est mesurée par chimioluminescence du luminol. La réaction de ce dernier avec H_2O_2 en présence de peroxydases conduit à la formation d'un intermédiaire chimioluminescent (3-aminophtalate dianon ; $\lambda_{ém.}$ = 466 nm ; Thorpe & Kricka, 1986 ; Figure 7). En pratique, 250 µL de suspension cellulaire sont ajoutés à 350 µL de tampon H50 (HEPES-KOH 50 mM pH 6,5 ; D-mannitol 175 mM ; K_2SO_4 0,5 mM ; $CaCl_2$ 5 mM) et 50 µL de luminol 0,3 mM. La luminescence, mesurée sur une période de 10 s avec un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold Technologies), est intégrée et exprimée en nmoles de $H_2O_2.g^{-1}$ de PFC grâce à une gamme étalon établie par addition de concentrations croissantes en H_2O_2 dans des suspensions cellulaires témoins.

2.5.4. Etude de l'accumulation de transcrits par RT- PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux sont extraits à partir de 0,25 g de cellules de tabac, préalablement broyées au mortier dans l'azote liquide, à l'aide du trizol suivant les recommandations du fabriquant (TRIzol Reagent, Invitrogen). Après transcription inverse sur 3 µg d'ARN dans un volume total de 20 µL (Superscript III reverse transcriptase, Invitrogen), 2 µL d'ADN complémentaires (ADNc) dilués au 1/30 dans l'eau ultra pure sont soumis à une PCR en

Etape cycle PCR	Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation	95 °C	15 min	1
Dénaturation	95 °C	45 sec	40
Hybridation	60 °C	45 sec	
Amplification	72 °C	30 sec	
Etape finale	95 °C	15 sec	1
	72 °C	15 sec	
	95 °C	15 sec	

Tableau 5 : Caractéristiques des cycles d'amplification des ADNc par PCR quantitative en temps réel.

		Séquence des amorces 5'- 3'		
Gènes	**Annotation**	**Sens**	**Antisens**	**Tm (°C) d'hybridation**
NtEF1-α	Elongation Factor 1-alpha	AAC TGG TGT CCT CAA GCC TGG TAT	AAG CAC CCA TTG CTG GGA CAT	60
NtHD2a/b	Nicotiana tabacum histone deacetylase type 2 a/b	AGG AAG GCA GAT TCG GCT ACA	TGA TTT TGG AGT CTG CTG GTT	60
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	TCC CCT TGT CCT ACA TTG CTG GTT	TCA ATT TGT CCG GGG TGA TGC TTC	60
PR-3	Pathogenesis-related protein 3	GCC ATA GGA GTG GAC CTG CTA AAC	AAA AGA CCT CTG GTT GCC GC	60

Tableau 6 : Caractéristiques des gènes de défense étudiés chez *N. tabacum*.

temps réel dans un volume final de 5 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 LightCycler® 480 System (Roche) dont les conditions sont résumées dans le Tableau 5. Grâce à la fluorescence mesurée, à l'aide du logiciel Light Cycler 480 (Roche) le facteur d'activation de l'accumulation du transcrit cible est calculé selon la méthode de Livak & Schmittgen (2001) comme étant égal à $2^{\Delta\Delta Ct}$; avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$(échantillon) - ΔCt(échantillon contrôle) et ΔCt = Ct(gène cible) – Ct(gène de référence). Le transcrit du gène *Elongation Factor 1-α* (*EF1- α*) est utilisé comme référence (Tableau 6).

2.5.5. Dosage des composés phénoliques solubles par le réactif de Folin-Ciocalteu

Le dosage des composés phénoliques solubles peut être réalisé avec le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus (absorbant à 760 nm), de tungstène et de molybdène.

Les cellules sont congelées et broyées au mortier dans l'azote liquide. Toutes les étapes suivantes sont réalisées sur glace ou à 4°C pour les centrifugations. Le broyat de cellules (l'équivalent de 300 mg) est repris dans 5 mL d'éthanol à 80 %, puis incubé sous agitation (150 rpm) en chambre froide pendant 30 mn. Après centrifugation (10 mn, 3000 g), le surnageant obtenu est soumis à une centrifugation sous vide durant 2 h pour éliminer les résidus d'éthanol. Cinq cents µL d'extraits sont incubés pendant 3 mn à température ambiante, avec 2,5 mL de solution Folin-Ciocalteu diluée au 1/10. Après 3 mn d'incubation, 2 mL de Na_2CO_3 à 75 g/L sont ajoutés et le tout est incubé à 50°C pendant 5 mn. Après avoir stoppé la réaction en plongeant chaque tube dans la glace, l'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 760 nm. Une gamme étalon est préparée avec des quantités croissantes d'acide gallique, utilisé comme acide phénolique de référence standard.

2.6. Analyse des modifications post-traductionnelles des protéines

2.6.1. Préparation des noyaux

Les cellules congelées sont broyées au mortier dans l'azote liquide. Toutes les étapes suivantes sont réalisées sur glace ou à 4°C pour les centrifugations. Le broyat de cellules est repris dans 1 à 2 volumes de tampon d'extraction des noyaux (NB1 ; Tris-Mes 25 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, DTT 10 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, β-glycérophosphate 50 mM, hexylène-glycol 0,5 M, PMSF 1 mM). Ce broyat est filtré sur une toile à bluter de porosité 31 µm, puis centrifugé 10 mn à 500 g. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 10 mL de tampon NB1, puis déposé sur 5 mL d'un coussin d'Iodixanol (Optiprep, AbCys) à 25 % (densité de 1,137) préparé dans le tampon NB1. Le tout est ensuite centrifugé 30 mn à 3000 g, puis le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot est ensuite lavé dans 15 mL de tampon NB1 sans hexylène-glycol (NB2) par centrifugation (10 mn, 300 g).

2.6.2. Préparation des protéines nucléaires et cytosoliques

2.6.2.1. Extraction des protéines nucléaires par lyse saline

Toutes les étapes sont réalisées sur glace et à 4°C pour les centrifugations. Le culot de noyaux est resuspendu dans 2 volumes de tampon NB2 concentré deux fois. Puis, à partir de solutions salines concentrées, une concentration finale de 250 mM de $MgCl_2$ et de NaCl est obtenue. L'ensemble est incubé pendant 30 mn à 4°C sous agitation douce. Après une première centrifugation à 24000 g pendant 15 mn, le surnageant est ultracentrifugé 35 mn à 120000 g. Le surnageant, qui constitue la fraction des protéines nucléaires solubles, est ensuite dessalé et concentré dans le tampon NB2 sans hexylène glycol par ultrafiltration sur filtre Amicon (Millipore; seuil de coupure 30 kDa). Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la SAB comme standard et dénaturées dans le tampon d'échantillon (Laemmli, 1970) à 95°C pendant 5 mn puis conservées à -20°C.

2.6.2.2. Extraction des protéines cytosoliques

Des aliquotes de 2,5 mL (0,25 g) de cellules sont congelées dans l'azote liquide et broyées au mortier. Le broyat est ensuite repris dans 200 µL de tampon NB2 sans hexylène glycol. Après centrifugation (20 mn, 24000 g, 4°C), une aliquote du surnageant est prélevée pour quantifier les protéines par la méthode de Bradford (1976) en utilisant la SAB comme standard. Les protéines cytosoliques sont ensuite dénaturées dans le tampon d'échantillon (Laemmli, 1970) à 95°C pendant 5 mn puis conservées à -20°C.

2.6.3. Analyse des protéines par électrophorèse

2.6.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Des extraits contenant 20 à 30 µg de protéines sont soumis à une électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) sur gel de polyacrylamide 10 % selon la technique de Laemmli (1970).

2.6.3.2. Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie

Après électrophorèse, le gel de polyacrylamide est coloré pendant 1 h dans une solution de bleu de Coomassie (Coomassie R-250 0,25 %, méthanol 40 %, acide acétique 10 %), puis décoloré pendant 2 h dans un mélange méthanol 15 %, acide acétique 10 %. Le gel est ensuite scanné puis séché sur papier Whatman à l'aide d'un sécheur à gel (GelDryer, Bio-Rad) pour conservation.

2.6.3.3. Immunodétection des protéines par western blot

Après séparation par électrophorèse SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Bio-Rad) et d'une solution de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,019 % m/v, méthanol 20 % v/v) pendant 40 mn à 15 V. Le transfert des protéines sur la membrane est vérifié par coloration au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5 % m/v, acide

acétique 1 % v/v) puis lavage à l'eau osmosée. La membrane est ensuite incubée 1 h à température ambiante dans le 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 toute la nuit à 4°C dans ce même tampon en présence de l'anticorps primaire.

Quatre anticorps primaires ont été utilisés :

- Anti-NtHD2a/b : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le peptide PEAKVKEAEKSNVA spécifique de NtHD2a/b (dilution au 1/8000ème, RD-Biotech)
- Anti Ac-Lys : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les lysines acétylées (dilution au 1/10000ème, Sigma A5463)
- Anti-MAPK totales : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les MAPK humaines inactives ERK1/2 (dilution au 1/1000ème, Cell Signaling)
- Anti-MAPK phosphorylées : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un peptide synthétique contenant Thr202/Tyr204 phosphorylées correspondant aux résidus Thr202/Tyr204 de ERK1/2 phosphorylées (dilution au 1/1000ème, Cell Signaling).

La membrane est alors lavée successivement trois fois 10 mn dans le tampon TBST, puis incubée 75 mn à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la peroxydase (dilué au 1/60000ème, Bio-Rad) dans le tampon TBST. Après 3 autres lavages de 10 mn dans le tampon TBST, la révélation du western blot est réalisée à l'aide d'un kit de chimioluminescence (LumiGlo, Cell Signaling).

2.6.3.4. Essai kinase en gel

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Kameshita & Fujisawa (1989) avec quelques modifications. Des aliquotes de cellules (0,25 g) sont congelées dans l'azote liquide et broyées au mortier. Le broyat est repris dans 350 µL de tampon d'extraction (HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, β-glycérophosphate 50 mM, NaF 10 mM, leupeptine 5 mg/L, antipaïne 5 mg/L, PMSF 1 mM et DTT 5 mM). Vingt à trente µg de protéines sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel à 10 % d'acrylamide contenant comme substrat des PK l'histone IIIS à 0,14 mg.mL^{-1}. Après électrophorèse, le gel subit pendant 1 h deux lavages successifs dans le tampon A (Tris HCl

50 mM pH 8,0, isopropanol 20 %), puis deux dans le tampon B (Tris HCl 50 mM pH 8,0, β-mercaptoéthanol 5 mM). Les protéines contenues dans le gel sont ensuite dénaturées par 2 lavages de 30 mn dans le tampon C (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, guanidine 6 M, β-mercaptoéthanol 5 mM), avant d'être renaturées par 5 lavages successifs à 4°C pendant 16 h avec le tampon D (Tris HCl 50 mM pH 8,0, Tween 40 0,04 % v/v, β-mercaptoéthanol 5 mM). Les gels sont ensuite équilibrés pendant 30 mn à température ambiante dans le tampon de phosphorylation (HEPES-KOH 40 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 25 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM, DTT 2 mM) puis la réaction de phosphorylation est réalisée dans ce même tampon additionné d'ATP 25 µM et de 0,375 MBq de [γ-^{32}P]-ATP (Amersham Biosciences), pendant 1 h à température ambiante. La réaction de phosphorylation est stoppée par 5 lavages de 30 mn du gel dans une solution contenant 5 % (m/v) d'acide trichloroacétique (TCA) et 1 % (m/v) de pyrophosphate de potassium. Les gels sont ensuite séchés sur un sécheur à gel (GelDryer, Bio-Rad) et les activités kinase sont révélées par exposition d'un écran PhosphorImager (Molecular Dynamics). Une autoradiographie du gel sur film Biomax XAR (Kodak) est également réalisée. La masse moléculaire apparente des PK est estimée à l'aide de marqueurs moléculaires précolorés (Fermentas).

2.6.4. Identification de protéines acétylées nucléaires

2.6.4.1. Purification des protéines nucléaires acétylées

Environ 1 kg de cellules est congelé dans l'azote liquide et broyé au mortier. L'enrichissement en noyaux et l'extraction des protéines nucléaires par lyse saline sont réalisés comme décrit au § 2.6.2 de cette section. Les protéines nucléaires sont alors dessalées et concentrées dans le tampon Q (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, DTT 2 mM, β-glycérophosphate 50 mM, $MgCl_2$ 25 mM, glycérol 5 %, PMSF 1 mM). Les protéines concentrées sont ensuite clarifiées par ultracentrifugation pendant 35 mn à 120000 g.

La fraction obtenue, qui contient environ 10 mg de protéines nucléaires, est déposée sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q HP 5 mL, Amersham Biosciences) préalablement équilibrée par 5 fois son volume de tampon Q. Après élution des protéines non fixées par 5 volumes de tampon Q, les protéines retenues sont éluées par un gradient linéaire de NaCl (0-700 mM en 20 volumes de colonne) formé par un mélange des tampons Q et QE (tampon Q

contenant 1 M de NaCl). La colonne est ensuite régénérée par passage de 5 volumes de tampon QE seul puis est ré-équilibrée avec 10 volumes de tampon Q. Pendant l'élution, des fractions de 2,5 mL sont collectées à un débit de 1 $mL.mn^{-1}$. Chacune des fractions issues de la colonne échangeuse d'anions est analysée en western blot à l'aide de l'anticorps anti Ac-Lys afin de repérer celles contenant les protéines acétylées d'intérêt. Les fractions retenues sont concentrées et lavées dans le tampon P (Tris HCl 25 mM, pH 7,5, DTT 2 mM, β-glycérophosphate 50 mM, $MgCl_2$ 25 mM, glycérol 5 %, NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM) par ultrafiltration, puis clarifiées par ultracentrifugation (120000 g, 35 mn) préalablement à la chromatographie d'affinité. La fraction concentrée est alors déposée sur une colonne d'affinité (Sepharose 4 Fast Flow couplé à l'anticorps anti AC-Lys, Amersham Biosciences) équilibrée par 10 volumes de colonne de tampon P. Après élimination des protéines non fixées par 5 volumes du même tampon, l'élution des protéines retenues est réalisée par un gradient linéaire parallèle de NaCl (de 500 à 0 mM) et d'éthylène-glycol (de 0 à 60 %), mis en place par un mélange des tampons P et PE (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, DTT 2 mM, β-glycérophosphate 50 mM, $MgCl_2$ 25 mM, glycérol 5 %, PMSF 1 mM, éthylène-glycol 60 %). Pendant l'élution, des fractions de 500 µL sont collectées, à un débit de 0,5 $mL.mn^{-1}$. La colonne est ensuite régénérée par 5 volumes de colonne de tampon PE, puis rééquilibrée par 20 volumes de tampon P.

La ou les fractions contenant les protéines retenues spécifiquement par la colonne sont concentrées. Les protéines sont alors séparées par électrophorèse SDS-PAGE en vue du prélèvement pour le séquençage des bandes d'intérêt.

2.6.4.2. Préparation des échantillons pour séquençage

Les bandes excisées (voir § 2.6.4.1 de cette section) sont centrifugées quelques secondes et l'eau excédentaire est éliminée. Les bandes sont ensuite lavées 2 fois dans 100 µL d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM et acétonitrile 50 %, sous agitation pendant 10 mn. Après élimination du dernier lavage, les bandes d'acrylamide sont séchées sous vide à l'aide d'un SpeedVac puis sont envoyées au Dr. M. Rossignol (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse) pour digestion trypsique puis analyse des peptides générés par spectrométrie de masse.

2.6.4.3. Analyse par spectrométrie de masse

L'ensemble des séquençages et des analyses ont été réalisés par le Dr. M. Rossignol. Les peptides générés par la digestion des protéines d'intérêt par la trypsine sont séparés et analysés à l'aide d'un système LC-MS/MS LTQ-OrbiTrap^{TM} (Thermo Electron). L'identification des peptides, ainsi que des protéines correspondantes, est réalisée par l'application de l'algorithme MASCOT.

CHAPITRE RESULTATS :

NtHD2, DE NOUVEAUX REGULATEURS NEGATIFS DE LA MORT CELLULAIRE INDUITE PAR LA CRYPTOGEINE

Chapitre Résultats :
NtHD2a/b de nouveaux régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez le tabac

Les travaux de thèse de Jennifer Dahan (Dahan, 2008) ont montré qu'en réponse à un traitement par la cryptogéine au moins 7 PK nucléaires étaient spécifiquement activées, chacune avec une intensité et une cinétique particulières. Deux de ces PK, nommées selon leur masse moléculaire PK36 et PK47, ont la particularité d'être activées très précocement, après environ 5 mn de traitement. Ces deux PK ont été identifiées après purification et séquençage par spectrométrie de masse. PK47 correspond à la forme nucléaire de SIPK, et il a été montré que l'activité de SIPK dans le noyau était corrélée à l'induction de la mort cellulaire en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009). PK36 a été identifiée comme une sous-unité catalytique d'une caséine kinase de type 2 (CK2). Toutefois, l'extinction de l'expression de cette PK étant létale, aucune approche n'a été développée pour définir le rôle de cette protéine dans la voie de signalisation conduisant à la mise en place des défenses en réponse à la cryptogéine (Dahan, 2008).

Des activités PK nucléaires étant induites en réponse à la cryptogéine, une démarche d'identification de protéines nucléaires phosphorylées en réponse à la cryptogéine a été entreprise dans le cadre de la thèse de Sabrina Blanc (Blanc, 2008). L'article présenté dans les pages suivantes est paru dans New Phytologist et présente les résultats obtenus lors de l'identification et de la caractérisation de l'une de ces protéines phosphorylées.

1. Résumé de la publication

La perception de l'agent pathogène par la plante se traduit par l'activation de voies de signalisation cellulaire qui conduisent à la mise de réponses de défense adaptées dont la RH, une forme de mort cellulaire programmée localisée au site de pénétration du microorganisme qui aurait pour but de confiner le pathogène. La description des mécanismes moléculaires sous-

jacents à la mise en place ainsi qu'à la modulation de la RH demeure toutefois rudimentaire à ce jour.

L'étude du mode d'action de la cryptogéine, un éliciteur protéique de 10 kDa secrété par *P. cryptogea*, sur des suspensions cellulaires de tabac a permis de mettre en évidence un certain nombre d'événements précoces de signalisation, concourant à la mise en place de réactions de défenses dont la mort cellulaire de type RH, parmi lesquels figurent un influx de Ca^{2+} du milieu extracellulaire, des flux ioniques ou encore la production de formes actives de l'oxygène. Les MPT, dont la phopshorylation, tiennent une place majeure dans la cascade de signalisation induite dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine. En effet, l'activation de PK par phosphorylation, incluant SIPK et WIPK, a été mise en évidence en réponse à la cryptogéine. Il s'avère que la signalisation cellulaire induite par les éliciteurs tels que la cryptogéine, et impliquant ces PK, converge entre autre vers le noyau à travers la modulation de l'activité d'éléments nucléaires par phosphorylation.

Dans le but de d'appréhender plus en détail les événements nucléaires, peu décrits à ce jour, d'importants travaux de purification/séquençage, visant à identifier les protéines nucléaires cibles de ces PK ont permis d'identifier deux isoformes redondantes d'HDAC de type 2 nommées NtHD2a et NtHD2b qui sont rapidement phosphorylées en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac.

L'implication de NtHD2a/b dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine a été démontrée par des approches de pharmacologie, d'interférence à ARN et de surexpression des NtHD2 : la mort cellulaire induite par la cryptogéine est réduite lorsque *NtHD2a/b* sont surexprimées alors qu'elle est accrue lorsque l'expression de *NtHD2a/b* est invalidée ou lorsque l'activité des HDAC est bloquée par des inhibiteurs. NtHD2a/b sont donc des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez le tabac. Bien que les événements dépendants de NtHD2a/b qui contrôlent l'intensité du processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine restent à élucider, nous avons pu montrer des modifications importantes du profil d'acétylation des protéines nucléaires extraites soit de cellules de tabac traitées par la cryptogéine, soit de cellules invalidées dans l'expression de *NtHD2a/b*. Ces protéines nucléaires, dont le niveau d'acétylation est ainsi modifié, pourraient potentiellement

correspondre à des cibles de NtHD2a/b qui participent à la régulation de l'intensité de la mort cellulaire induite par la cryptogéine.

Cet article a fait l'objet dans le même numéro de New Phytologist d'un commentaire du Prof. G. Berkowitz de l'Université du Connecticut (Etats-Unis ; voir Annexe 1). Selon G. Berkowitz, l'étude du rôle de NtHD2a/b dans la mort cellulaire induite par la cryptogéine constitue un travail original qui permettrait à terme de caractériser les événements de signalisation et les acteurs moléculaires impliqués dans le processus de mort cellulaire programmée développé en réponse à des agents pathogènes.

2. Publication

TYPE-2 HISTONE DEACETYLASES AS NEW REGULATORS OF ELICITOR-INDUCED CELL DEATH IN PLANTS

Stéphane Bourque [1,2*], Agnès Dutartre [1*], Valentin Hammoudi [1], Sabrina Blanc [1], Jennifer Dahan [1], Sylvain Jeandroz [3], Carole Pichereaux [4], Michel Rossignol [4] and David Wendehenne [1]

[1] UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne Plante-Microbe-Environnement, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France
[2] GDR CNRS N°2688 'Calcium et régulation de l'expression des gènes en contexte normal et pathologique', 31000 Toulouse, France
[3] UPSP PROXISS, AgroSup Dijon, 26 Boulevard du Dr Petitjean, BP 87999, 21079 Dijon cedex, France
[4] Plateforme Protéomique Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work.

Author for correspondence : Stéphane Bourque
E-mail : bourque@dijon.inra.fr

New Phytologist (2011) **192** : 127-139

New Phytologist

Research

Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants

Stéphane Bourque[1,2]*, Agnès Dutartre[1]*, Valentin Hammoudi[1], Sabrina Blanc[1], Jennifer Dahan[1], Sylvain Jeandroz[3], Carole Pichereaux[4], Michel Rossignol[4] and David Wendehenne[1]

[1]UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne Plante–Microbe–Environnement, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France; [2]GDR CNRS N°2688 'Calcium et régulation de l'expression des gènes en contexte normal et pathologique', 31000 Toulouse, France; [3]UPSP PROXISS, AgroSup Dijon, 26 Boulevard du Dr Petitjean, BP 87999, 21079 Dijon cedex, France; [4]Plateforme Protéomique Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France and Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France

Author for correspondence:
Stéphane Bourque
Tel: +33 3 80 69 34 76
Email: bourque@dijon.inra.fr

Received: *1 February 2011*
Accepted: *28 April 2011*

New Phytologist (2011) **192**: 127–139
doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03788.x

Key words: cell death, cryptogein, histone deacetylase, hypersensitive response (HR), *Nicotiana tabacum*, nuclear signalling, plant defence.

Summary

• Plant resistance to pathogen attack is often associated with a localized programmed cell death called hypersensitive response (HR). How this cell death is controlled remains largely unknown.

• Upon treatment with cryptogein, an elicitor of tobacco defence and cell death, we identified NtHD2a and NtHD2b, two redundant isoforms of type-2 nuclear histone deacetylases (HDACs). These HDACs are phosphorylated after a few minutes' treatment, and their rate of mRNAs are rapidly and strongly reduced, leading to a 40-fold decrease after10 h of treatment.

• By using HDAC inhibitors, RNAi- and overexpression-based approaches, we showed that HDACs, and especially NtHD2a/b, act as inhibitors of cryptogein-induced cell death. Moreover, in *NtHD2a/b*-silenced plants, infiltration with cryptogein led to HR-like symptoms in distal leaves.

• Taken together, these results show for the first time that type-2 HDACs, which are specific to plants, act as negative regulators of elicitor-induced cell death in tobacco (*Nicotiana tabacum*), suggesting that the HR is controlled by post-translational modifications including (de)acetylation of nuclear proteins.

Introduction

There is increasing evidence that plants use pathogen perception systems and defence pathways that closely resemble animal systems. For example, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), or more generally elicitors (Zipfel & Felix, 2005; van der Hoorn & Kamoun, 2008), are recognized through similar receptors to those of innate immunity in humans and *Drosophila*. The initial interaction between PAMPs and their corresponding receptors induces specific signal transduction pathways leading to a systemic acquired resistance (SAR) against a broad spectrum of pathogens. SAR can be reinforced by the induction of hypersensitive response (HR), a localized programmed cell death (PCD) which is believed to confine the pathogen at the site of infection (Ma & Berkowitz, 2007). In *Arabidopsis thaliana*, the characterization of spontaneous death mutants, as well as mutants in which the HR was compromised, has led to the identification of key HR suppressor and effector genes, respectively, such as *LSD1*, which regulates both suppressor and effector functions (Lorrain *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 2008). Furthermore, proteases, including caspase-like proteases such as vacuolar cysteine proteases, have been demonstrated to be HR effectors via pharmacological, biochemical and genetic approaches (Hatsugai *et al.*, 2004; Lam, 2005). Finally, several studies have also highlighted a key role for Ca^{2+}, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide and salicylic acid as HR-associated signals (Garcia-Brügger *et al.*, 2006). Notwithstanding these findings, our understanding of the molecular mechanisms underlying the HR is still rudimentary.

*These authors contributed equally to this work.

Protein and nucleic acid sequences: NtHD2 sequences were deposited at GenBank. NtHD2a, FJ903174; NtHD2b, FJ903175.

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

The characterization of the signal transduction pathway that takes place between pathogen recognition and the activation of defence responses is a widely studied area. More particularly, studies about the mode of action of cryptogein have contributed to our understanding of innate immunity in plants (Garcia-Brügger *et al.*, 2006). Cryptogein is a 10 kDa protein that is secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea* and belongs to the elicitin family (Ricci, 1997). When applied to tobacco plants, cryptogein triggers defence responses, including macroscopic HR, and protects tobacco plants against a wide spectrum of pathogens (Bonnet *et al.*, 1996). The signalling components of the cryptogein-induced transduction pathways leading to defence responses have been studied using tobacco cell suspensions. They include ion fluxes across the plasma membrane, mainly Ca^{2+} influx and anion effluxes, increases in the cytosolic and nuclear-free Ca^{2+} concentrations, cytosolic acidification and ROS and nitric oxide production (Tavernier *et al.*, 1995; Pugin *et al.*, 1997; Lecourieux *et al.*, 2002; Wendehenne *et al.*, 2002). These events appear to be required for cryptogein-induced late responses, including defence gene expression, phytoalexin synthesis and/or cell death (Garcia-Brügger *et al.*, 2006).

Protein post-translational modifications and particularly (de)phosphorylation also play a central role in cryptogein-induced effects. Notably, cryptogein has been shown to promote protein phosphorylation as well as the activation of protein kinases (PKs), including mitogen-activated protein kinases (MAPKs), a salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) and a wounding-induced protein kinase (WIPK; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). More generally, protein phosphorylation is a common process in PAMP signalling (Zhang & Liu, 2001; Garcia-Brügger *et al.*, 2006). Protein (de)phosphorylation first involves plasma membrane proteins, among them receptor-like kinases such as FLS2 involved in flagellin binding in *A. thaliana* (Gómez-Gómez & Boller, 2000), soluble PKs such as Ca^{2+}-dependent protein kinases (Romeis *et al.*, 2001) or MAP kinase modules (Jin *et al.*, 2003; Samuel *et al.*, 2005). A role for nuclear PKs, and particularly members of the MAP kinase family, has also been highlighted (Ligterink *et al.*, 1997; Menke *et al.*, 2005; Coronado *et al.*, 2007; Dahan *et al.*, 2009, 2010). Although numerous PKs have been identified, a better understanding of their function at the molecular level requires the identification of their substrate. Up to now such approaches have been poorly investigated. Interestingly, the putative PK substrates identified so far include ZmHD2, a maize nucleolar histone deacetylase (HDAC) of the type-2 family (HD2). ZmHD2 has been shown to be phosphorylated *in vitro* by a recombinant caseine kinase 2 (CK2), a well-known nuclear PK (Lusser *et al.*, 1997). Supporting a role for HDACs in mediating defence responses, it has been reported that HDA19, an *A. thaliana* HDAC of the RPD3 family (a well-conserved family in eukaryotes), participates in the resistance against *Pseudomonas syringae* by interacting with two type-III transcription factors, WRKY38 and WRKY62 (Kim *et al.*, 2008). It has also been shown that HDACs could be involved in the control of cell death. For example, knocking down the SIR2 HDAC in rice causes cell death (Huang *et al.*, 2007). Such results also suggest that nuclear protein (de)acetylation could play an important role in plants' resistance to pathogens. Histone acetylation and deacetylation, catalysed by histone acetyl transferase (HAT) and HDAC, respectively, are part of a well-characterized chromatin remodelling process that regulates gene expression (Chen & Tian, 2007). Based on their ability to act on proteins that are unrelated to histones, such as transcription factors or coregulators of gene transcription, HATs and HDACs are more generally considered as lysine acetyltransferases and lysine deacetylases (Chen & Tian, 2007). Plant HDACs are classified into different families (Pandey *et al.*, 2002): HDA1 (Histone Deacetylase 1), RPD3 (Reduced Potassium Dependency Protein 3) and SIR2 (Silent Information Regulator 2). HD2, the fourth family, is plant-specific (Pandey *et al.*, 2002), however very little information is currently available regarding their functions.

Taken together, these data suggest that the nucleus contributes to signal transduction as a subcellular site, and more particularly to the HR. Supporting this statement, cryptogein as well as other elicitors that trigger cell death have been shown to mediate high Ca^{2+} elevations in the nucleus of tobacco cell suspensions. These results imply that nuclear-free Ca^{2+} might act as a nuclear second messenger mediating the HR (Lecourieux *et al.*, 2005). Furthermore, we have recently shown that a set of seven nuclear PKs, including a SIPK, was rapidly activated in response to cryptogein treatment (Dahan *et al.*, 2009). Regarding the role of PKs in mediating cryptogein-induced cell death, as suggested by previous pharmacological-based experiments (Zhang *et al.*, 2000), the involvement of one or several of these nuclear PKs in the processes leading to the HR might also be assumed. In the present study, to provide a better view of the importance of phosphorylation events in HR-linked cell death, we first performed a proteomic analysis in order to identify tobacco nuclear proteins undergoing phosphorylation in response to cryptogein. This screening led to the identification of two HD2s. The role of HD2s in mediating elicitor-induced cell death was then evaluated by using pharmacological as well as RNAi-based approaches. Taken together, our results indicate that HD2s act as key negative regulators of elicitor-induced cell death in tobacco.

Materials and Methods

Cell culture and treatment

Nicotiana tabacum L. cv Xanthi cell suspensions were cultivated as previously described (Lamotte *et al.*, 2004). Briefly,

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

cell suspensions were maintained in Chandler's medium (Chandler *et al.*, 1972) on a rotary shaker (150 rpm, 25°C) under continuous light (photon flux rate 30–40 μmol m^{-2} s^{-1}). The cells were maintained in the exponential phase and subcultured 1 d before utilization. Treatment of the cell suspensions was carried out directly in the culture medium.

Cryptogein was purified as previously described (Bonnet *et al.*, 1996), and prepared as a 100 μM stock solution in water. Oligogalacturonides (degrees of polymerization from 25 to 30) were provided lyophilized by S. A. Goëmar (Roscoff, France) and resuspended in water. HDAC inhibitors were used as aqueous stock solutions and added 10 min before cryptogein treatment.

Preparation of nuclear extracts

All steps were performed on ice and centrifugations were performed at 4°C as previously described (Dahan *et al.*, 2009). The contamination rate of nucleus-enriched fractions was estimated by measuring the activity of marker enzymes (Mitsui *et al.*, 1994; Costa Rosa *et al.*, 1995; Kuzniak & Sklodowska, 2004).

In vivo phosphorylation experiments

Tobacco cells were incubated for 15 min with ^{32}P-H_3PO_4 (0.37 MBq ml^{-1} cell suspension) before cryptogein treatment. At the chosen times after treatment, cells were harvested by vacuum filtration and frozen in liquid nitrogen. Nuclear proteins were extracted from the nucleus-enriched fractions by the use of the TriReagent (Invitrogen) as previously described (Dahan *et al.*, 2009) and analysed by two-dimensional (2D) gel electrophoresis. Phosphoproteins were detected by autoradiography.

Phosphoprotein enrichment

Nuclear phosphoprotein enrichment was performed using the Phosphoprotein Enrichment kit from Qiagen according to the manufacturer's instructions. Enriched phosphoproteins were then separated by 2D electrophoresis. The gel was stained using a mass spectrometry-compatible silver-staining kit (Dodeca Silver-stain Kit, Bio-Rad). To collect the proteins phosphorylated in response to cryptogein treatment for further identification by mass spectrometry, the same enrichment protocol was performed with both ^{32}P-labelled and unlabelled nuclear proteins extracted from cryptogein-treated tobacco cells. The spot of interest was excised and the corresponding protein was characterized after trypsin in-gel digestion as previously described (Borderies *et al.*, 2003). The tryptic peptides were separated and analysed by nanoLC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, the Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

Cloning of NtHD2 cDNAs

A cDNA library was produced from cryptogein-treated (for 10 min) tobacco cells using the iScript Select cDNA synthesis kit from Bio-Rad using a poly-dT primer. NtHD2-encoding cDNAs were amplified using the following primers: 5′-TAATACGACTCACTATAGATGGAGTTTTGGGG-TGCTGAGGTG-3′ and 5′-TTCTGTCGGACAATTAA-CCCTCACTAAAAGTTTTTTTTTTNN-3′. PCR products were cloned in the pGMT-Easy plasmid in JM109 *E. coli* strain.

Expression of genes by quantitative real-time PCR

The mRNA content of *NtHD2a/b* and defence gene expression were assayed in H_2O- and cryptogein-challenged tobacco cells. RNAs were extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using an oligo-dT primer and the iScript Select cDNA synthesis kit (Bio-Rad). For the reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR), a QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen) was used, and PCR was performed using the ABI 7900 from Applied Biosystems (Carlsbad, California, USA). All samples were log-transformed and normalized to an *EF-1*-control. Primers for the RT-qPCR are listed in Supporting Information, Table S1.

Agrobacterium-mediated NtHD2a/b gene silencing

A construction in the pHannibal vector (Wesley *et al.*, 2001) was designed in order to induce an efficient RNAi mechanism to silence NtHD2a/b genes. A conserved 107 bp fragment of NtHD2a/b was cloned in both sense and antisense orientation spaced by an intron. The primers used for this construction are listed in Table S2. This construct under the control of the CaMV35S promoter was cloned into the pART27 binary vector in the LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* strain, which was used to agro-infiltrate young tobacco plants as previously described (English *et al.*, 1997). Three weeks later, the first nonagro-infiltrated leaves were infiltrated with 500 μl of 100 nM cryptogein, and leaf necrosis was monitored.

Overexpression of NtHD2a-GFP fused protein

The NtHD2a open reading frame without the stop codon was introduced in the pH7FWG2 (obtained at VIB; Ghent, Belgium) to obtain the fusion with the 5′ GFP coding sequence. A pB7F2 plasmid allowing the over expression of GFP alone was obtained from Dr Garçion (INRA,

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Bordeaux). The GV3101 (pMp90) *A. tumefaciens* strain was transformed by these plasmids and agroinfiltrated in tobacco leaves at Abs_{600} = 1. After 48 h, overexpression of the GFP was monitored using an epifluorescence microscope (Leica, Nanterre, France); 100 μl cryptogein (100 nM) was infiltrated in the corresponding zones and HR was monitored 24 h later.

Generation of a stable NtHD2a/b silenced cell line

The construction described in the previous section was used to generate a stable *N. tabacum* cv Xanthi transformed cell line in order to induce a sustained NtHD2a/b gene silencing. *N. tabacum* cv Xanthi leaf discs were transformed by the cocultivation method (Horsch *et al.*, 1985). Transformed *N. tabacum* cv Xanthi callusses expressing the NtHD2a/b silencing construct were used to generate cell suspensions. Transgenic tobacco cells have the same growth kinetics and the same morphology as wild-type (WT) tobacco cells.

Cell death

Cell death was estimated as previously described (Gauthier *et al.*, 2007) by using neutral red as a vital dye that accumulates in the acidic vacuole. Cells that did not accumulate neutral red were considered dead. Five hundred cells were counted for each treatment.

Results

Cryptogein induces a fast phosphorylation of nuclear proteins

In order to investigate the involvement of nuclear phosphoproteins in cryptogein-induced cell death, nucleus-enriched fractions were purified from tobacco cell suspensions as previously described (Dahan *et al.*, 2009). Highly purified nuclear fractions were obtained, displaying a very low cytosolic contamination (< 0.05%), as indicated by the measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity as a cytosolic and plastidic enzyme marker (Costa-Rosa *et al.*, 1995). As the main source of contaminating phosphoproteins is expected to originate from the cytosol, a low cytosolic contamination is essential, especially as cryptogein is known to induce the phosphorylation of *c.* 20 cytosolic proteins within the first 5 min of treatment (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000).

By combining ^{32}P-H_3PO_4 *in vivo* phosphorylation and nuclear protein 2D electrophoresis, *c.* 13 phosphoproteins were detected in nuclear extracts from 10 min cryptogein-treated tobacco cells (Fig. 1a). These phosphoproteins displayed apparent molecular masses ranging from 20 to 80 kDa and pIs between 4 and 6.7 (circled spots). Silver staining of the corresponding gels did not show the polypeptides that potentially corresponded to the phosphoproteins detected by autoradiography, indicating that they were low abundant proteins. A comparison of 2D-phosphorylated patterns from cytosolic (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000) and nuclear protein extracts after cryptogein treatment did not show any similarity, but we cannot exclude the hypothesis that the nuclear phosphoproteins detected after cryptogein treatment were phosphorylated in the cytosol and immediately translocated into the nucleus.

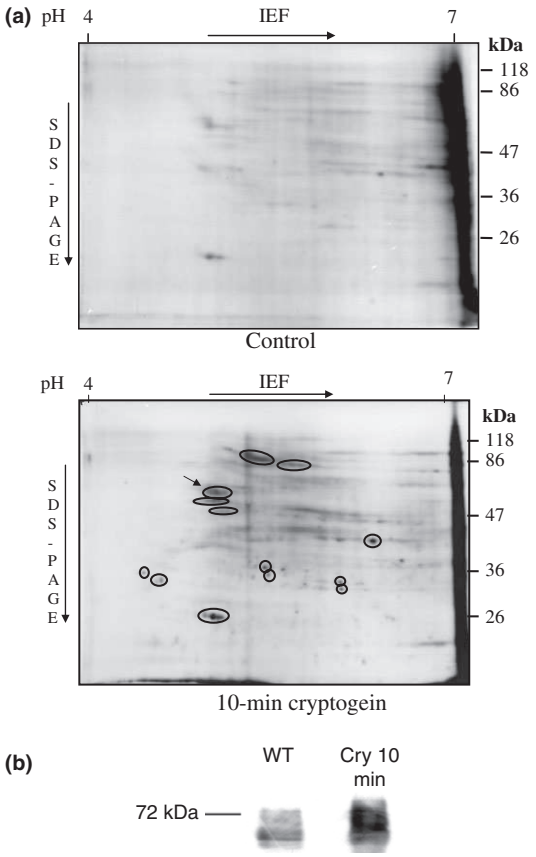


Fig. 1 *In vivo* phosphorylation of tobacco nuclear proteins in response to cryptogein. (a) Tobacco (*Nicotiana tabacum*) cells were pretreated for 15 min with [^{32}P]-H_3PO_4 (3.75 MBq g^{-1} Fresh Weight Cell (FWC)). Nuclear proteins from both control and cryptogein-treated (for 10 min) tobacco cells (Cry 10 min) were extracted as described in the Materials and Methods section and 100 μg of proteins was analysed by two-dimensional electrophoresis, using a linear 4–7 pH gradient. Phosphoproteins were detected by autoradiography. The spots corresponding to cryptogein-induced phosphorylated proteins are circled; the arrow points to the spot corresponding to NtHD2a/b [correction added after online publication 16 June 2011: the arrow within the lower panel of (a) now points to the correct location]. (b) Nuclear proteins from both control and 10 min cryptogein-treated tobacco cells were extracted as described in the Materials and Methods section and analysed in a western blot experiment using an antibody raised against a specific NtHD2a/b peptide (PEAKVKEAEKSNVA). WT, wild-type; IEF, IsoElectroFocusing; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Identification of NtHD2s as nuclear proteins phosphorylated in response to cryptogein

To overcome the difficulties related to the low abundance of the phosphoproteins of interest, the corresponding proteins were enriched using a phosphoprotein enrichment kit (Qiagen) before 2D electrophoresis. Using an MS-sequencing silver-staining protocol, we visualized a spot in a 2D gel corresponding to a phosphorylated peptide displaying a 60 kDa apparent molecular mass and a pI of 4.3, excised it and then had the tryptic fragments analysed by nanoLC-ESI (ElectroSpray Ionization)/MS/MS. Sequences corresponding to seven peptides were obtained (Table 1). A post-translational search revealed that the first peptide carried an acetylation site. Moreover, this peptide was partially found with an N-terminal methionine, indicating that it could correspond to the N-terminal part of the protein. A pBlast search indicated that all peptides showed a high sequence homology with a protein from *Solanum chacoense* (ScHD2a; Q6V9I6) identified as an HD2 (Table S3).

Specific primers were designed from the peptide sequences and used to clone the corresponding cDNAs. Two cDNAs synthesized from mRNAs extracted from 10 min cryptogein-treated tobacco cells and encoding putative HD2 proteins were cloned and named *NtHD2a* and *NtHD2b* (Fig. S1). The deduced protein sequences displayed high homology: NtHD2a and NtHD2b contain 295 and 294 amino acid residues, respectively (Fig. 2). The two sequences only differ by eight amino acids, and show > 96% sequence identity. NtHD2a and NtHD2b contain the three characteristic domains of HDACs: an N-terminal part carrying the catalytic activity, a C-terminal domain containing an incomplete Zn finger, and a typical acidic domain in the central part of the protein. This central domain contains a nuclear localization signal, consistent with the nuclear localization of the protein, and several putative phosphorylation sites by CK2. The first three peptides in Table 1 correspond to the N-terminal part of the protein. The partial lack of the N-terminal Met and its replacement by Glu could indicate a short half-life of the protein (Bachmair *et al.*, 1986). The acidic central domain could partially explain why NtHD2a/b exhibit a 60 kDa apparent molecular weight in 2D electrophoresis, although their predictive amino acid sequence contains 294 and 295 amino acids, respectively. The hydrophilic domain is well known to reduce the migration of proteins (Armstrong & Roman, 1993; Scheffel & Schuler, 2007), and particularly of plant HD2s in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Brosch *et al.*, 1996).

To confirm these data, polyclonal antibodies were designed against a specific peptide (PEAKVKEAEKSNVA) in the central domain of NtHD2a/b. These antibodies clearly recognized a band with an apparent molecular mass of *c.* 65 kDa in a nuclear extract prepared from WT cells (Fig. 1b). This size fits well with those of the candidate proteins identified by 2D electrophoresis (Fig. 1a). Furthermore, a comparison of nuclear protein extracts from both control and cryptogein-treated cells (30 min treatment) shows that the apparent molecular weight of NtHD2a/b was impacted by a 2 kDa shift that may reflect the phosphorylation of the protein, as previously suggested (see, for example, Romeis *et al.*, 2001). The use of cycloheximide as a protein synthesis inhibitor did not modify this labelling, which sug-

Table 1 Sequences and MASCOT scores of tryptic peptides obtained by nanol-LC/MS/MS (Ultimate 3000 System, Dionex, Amsterdam, the Netherlands)

PEPTIDES	MASCOT score
MEFWGAEVK.S + acetyl (N-term)	63
MEFWGAEVK.S + acetyl (N-term); oxidation (M)	44
EFWGAEVK	27
SGSVYFFGYK	53
VPQQQFDLVFDR	92
LVLGTLNSEKVPQQQFDLVFDR	15
SGEPLTVQPGDGMVLHLSQASLGELK.K + oxidation (M)	40

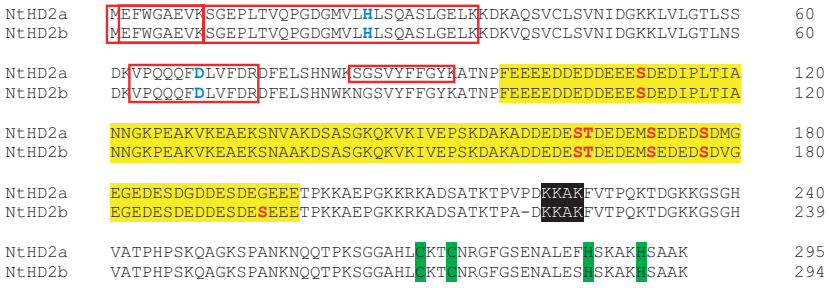


Fig. 2 Alignment of the two *Nicotiana tabacum* cv Xanthi type-2 histone deacetylases, NtHD2a and NtHD2b. Colours indicate the specific HD2 conserved domains: blue print, fundamental amino acids involved in the histone deacetylase (HDAC) catalytic site; yellow highlights, amino acids of the central acidic domain; black highlights, amino acids of the nuclear localizing signal; green highlights, Zn-finger domain in the C-terminal part of the proteins; red print, putative CK2 phosphorylation sites; red boxes, sequences of the tryptic peptides identified by mass spectrometry reported in Table 1.

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

gests that there is no *de novo* synthesis of the protein in response to cryptogein treatment (data not shown).

Phylogenetic analysis of the HD2 family in plants showed that *NtHD2a* and *NtHD2b* are grouped together (Fig. 3). This close phylogenetic relationship suggests that *NtHD2a* and *NtHD2b* could result from a recent duplication event (or allelic polymorphism). Amino acid divergence between *NtHD2a* and *NtHD2b* was very low (0.04%) compared with that between the closest isoforms found in *A. thaliana*, *HDT1* and *HDT2* (0.4%), which show the same expression pattern in response to various stimuli (http://www.genevestigator.ethz.ch). These observations allow us to hypothesize that *NtHD2a* and *NtHD2b* could be considered as redundant isoforms.

HDAC activity is involved in the control of tobacco cell death

We first analysed the abundance of transcripts of *NtHD2a/b* in different plant organs by using RT-qPCR (Fig. 4a). The transcripts accumulate in roots, stems, leaves and particularly in flowers. Remarkably, the rate of *NtHD2a/b* transcripts was strongly lower in senescent leaves compared with young ones and other organs, suggesting that the *NtHD2a/b* lower expression could be related to cell death. We further checked *NtHD2a/b* mRNA accumulation in tobacco cell suspensions exposed to cryptogein for 12 h. *NtHD2a/b* transcript abundance decreased over time and was reduced by 40-fold after 12 h of treatment (Fig. 4b), suggesting that cryptogein promotes the repression of the corresponding genes. Then we checked whether the decrease in *NtHD2a/b* mRNA content fitted with the disappearance of NtHD2a/b proteins. A kinetic analysis by a western blot experiment showed that NtHD2a/b content was strongly reduced after 3 h of cryptogein treatment (data not shown), confirming that cryptogein, in the end, induces an inhibition of NtHD2a/b expression.

To complete this analysis, we also analysed the profile of *NtHD2a/b* mRNA accumulation in tobacco cells exposed to oligogalacturonides (OGs) for 12 h. These elicitors activate the same signalling events as cryptogein (i.e. ROS production, Ca^{2+} influx, MAPK activation, defence gene activation, etc.) without triggering nuclear Ca^{2+} variations (Lecourieux *et al.*, 2005) or cell death (Garcia-Brügger *et al.*, 2006). As shown in Fig. 4(c), OGs did not induce a significant decrease in NtHD2a/b content.

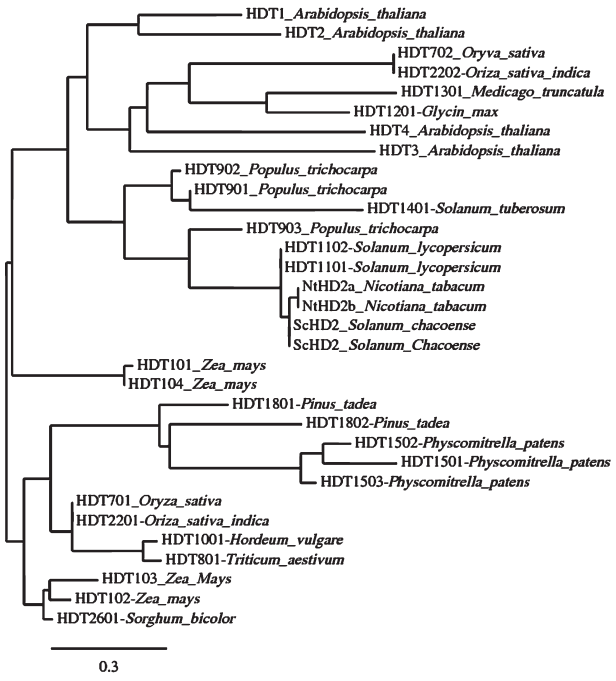


Fig. 3 Phylogenetic analysis of the HD2 protein family members in plants. Protein sequences were obtained from the plant chromatin database (http://www.chromdb.org) and named according to the ChromDB nomenclature, except for the two *Solanum* sequences (from the National Center for Biotechnology Information) and the two *Nicotiana tabacum* sequences (this study). The sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004) and an unrooted phylogenetic tree was reconstructed with PhyML on the Phylogeny.fr platform (Dereeper *et al.*, 2008). Bar, estimated number of substitutions per site.

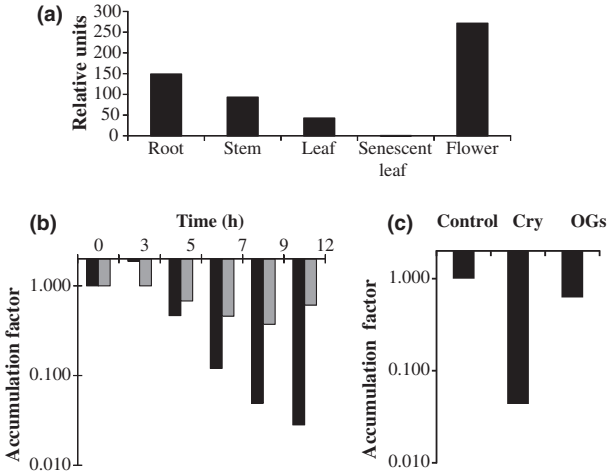


Fig. 4 *NtHD2* expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and in tobacco cells challenged by plant defence elicitors. (a) Accumulation of *NtHD2a/b* transcripts in tobacco organs was measured by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) using ef1 mRNA as a calibration gene by the ΔCt method. mRNA concentrations are expressed in relative units. The data correspond to one independent experiment out of five. (b) Time course evolution of *NtHD2a/b* mRNA content in control (grey bars) and 100 nM cryptogein (Cry)-treated tobacco cells (black bars). mRNA concentrations were measured by RT-qPCR using ef1 mRNA as a calibration gene by the ΔCt method. The data correspond to one independent experiment out of five. (c) *NtHD2a/b* mRNA content in control, 100 nM cryptogein- and 100 μg ml^{-1} oligogalacturonide (OG)-treated tobacco cells, after a 12 h treatment. mRNA concentrations were measured by RT-qPCR using ef1 mRNA as a calibration gene by the ΔCt method. The data correspond to one independent experiment out of three.

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

To further assess the involvement of HDAC activity in the cryptogein signalling pathway, we tested the effects of three HDAC inhibitors on cryptogein-induced events, namely sodium butyrate, apicidine and trichostatine A, which belong to three different chemical families. Their specificity towards plant HDACs is not known. None of them affected cryptogein-induced ROS production, Ca^{2+} fluxes or MAPK activation (data not shown). But interestingly they strongly amplified the rate of cell death triggered by cryptogein after 24 h (Fig. 5a). Indeed, in tobacco cells pretreated with sodium butyrate, apicidine or trichostatine A, the percentage of cell death reached > 90, 50 and 60%, respectively, whereas it reached *c.* 35% in tobacco cells exposed to cryptogein alone. In the same manner, when tobacco leaves were coinfiltrated with cryptogein and sodium butyrate, apicidine or trichostatine A, necrotic symptoms were much more pronounced (Fig. 5b). Yet tobacco cells or leaf treatments with these inhibitors alone did not induce any cell death or necrosis, respectively (Fig. 5a,b). Taken together, these data suggest that HDACs act as negative regulators of cryptogein-induced cell death.

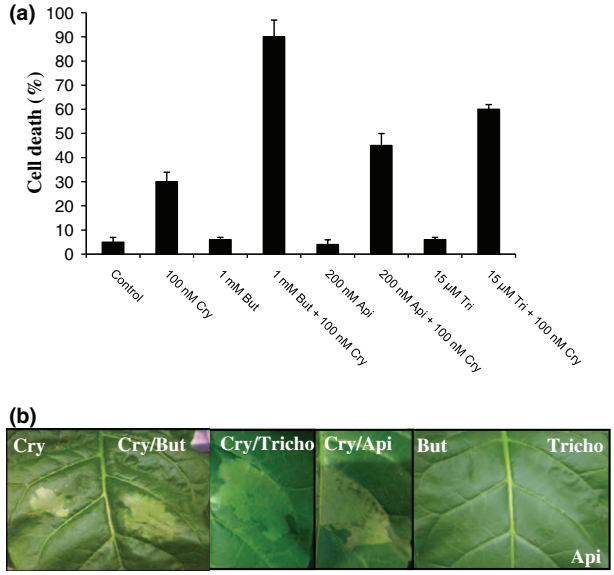


Fig. 5 Cryptogein-induced cell death is controlled by histone deacetylase (HDAC) activity. (a) Cell death induced by a 24 h treatment with 100 nM cryptogein (Cry) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell suspension pretreated for 10 min or not with 1 mM sodium butyrate (But), 200 nM apicidine (Api) or 15 µM trichostatine A (Tri). Cell death was measured using the neutral red coloration method. For each determination, 500 cells were analysed and the data in the figure are the mean of three independent experiments (± SD). (b) Hypersensitive response (HR)-like symptoms induced by infiltration of 100 nM cryptogein (500 µl) in tobacco leaves pretreated for 30 min or not with 1 mM sodium butyrate (But), 15 µM trichostatine A (Tricho) or 200 nM apicidine (Api). The figure corresponds to one representative experiment out of five.

NtHD2a/b are repressors of cryptogein-induced cell death

Complementary to the pharmacological approach that suggested a role for HDACs, and particularly NtHD2s, as repressors of cryptogein-induced cell death, an RNAi approach was carried out in order to specifically inhibit *NtHD2a/b* gene expression. The pHannibal vector system allows the cloning of a specific cDNA fragment in both sense and antisense orientations on both sides of an intron (Fig. 6a; Wesley *et al.*, 2001), leading to the transcription of a hairpin mRNA suitable to induce RNA interference. The *A. tumefaciens* LBA4404 strain was used to obtain a transitory or a stable expression of an *NtHD2a/b*-gene-specific hairpin cassette.

First, young tobacco plants (two- to four-leaf stage) were either fully agroinfiltrated in order to promote a transient expression of the hairpin construct, or agroinfiltrated with an *A. tumefaciens* strain transformed with an empty vector as a control. Three weeks later, 500 µl of 100 nM cryptogein was infiltrated in the first nonagroinfiltrated leaf. After 24 h, the entire cryptogein-infiltrated zone was necrotized in all *A. tumefaciens*-infiltrated plants, whether they carried the RNAi-inducing construct or not, as exemplified in Fig. 6(b, inset). Five to 7 d later, in the plants infiltrated with *A. tumefaciens* strains containing the RNAi-inducing construct, the leaves infiltrated with cryptogein were completely necrotized (Fig. 6c,d, arrow), whereas in the control plants infiltrated with *A. tumefaciens* containing a pHannibal empty vector, only the cryptogein-infiltrated zone was necrotized (Fig. 6b). Interestingly after 5–7 d, in contrast to tobacco plants infiltrated with the *A. tumefaciens* strain carrying the pHannibal empty vector, the necrotic symptoms appeared in the distal leaves of the plants infiltrated with the RNAi-inducing construct (Fig. 6c,d). According to the plants and the experiments, two phenotypes were observed. The distal necrosis either occurred on one-half of the leaf (Fig. 6c) or as a mosaic of small necrotic spots (Fig. 6d), although it has already been demonstrated that cryptogein does not migrate in the plant when it is infiltrated into the leaves (Devergne *et al.*, 1992). In order to confirm this silenced phenotype, an overexpression approach of NtHD2a fused at its C-terminal end with GFP was performed. Tobacco leaves were first inoculated with *A. tumefaciens* strains expressing GFP alone or NtHD2a fused to GFP and then infiltrated with cryptogein. Overexpression of both proteins was found to be optimal after 48 h (Fig. 6e). While GFP alone accumulated in the cytosol, NtHD2a/b fused to GFP was mainly located in the nucleus, confirming the finding that NtHD2a/b were nuclear proteins. Overexpression of NtHD2a was also confirmed by semiquantitative RT-PCR with an estimated 20-fold factor accumulation of the mRNA (data not shown). As expected, overexpression of *NtHD2a* in tobacco

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

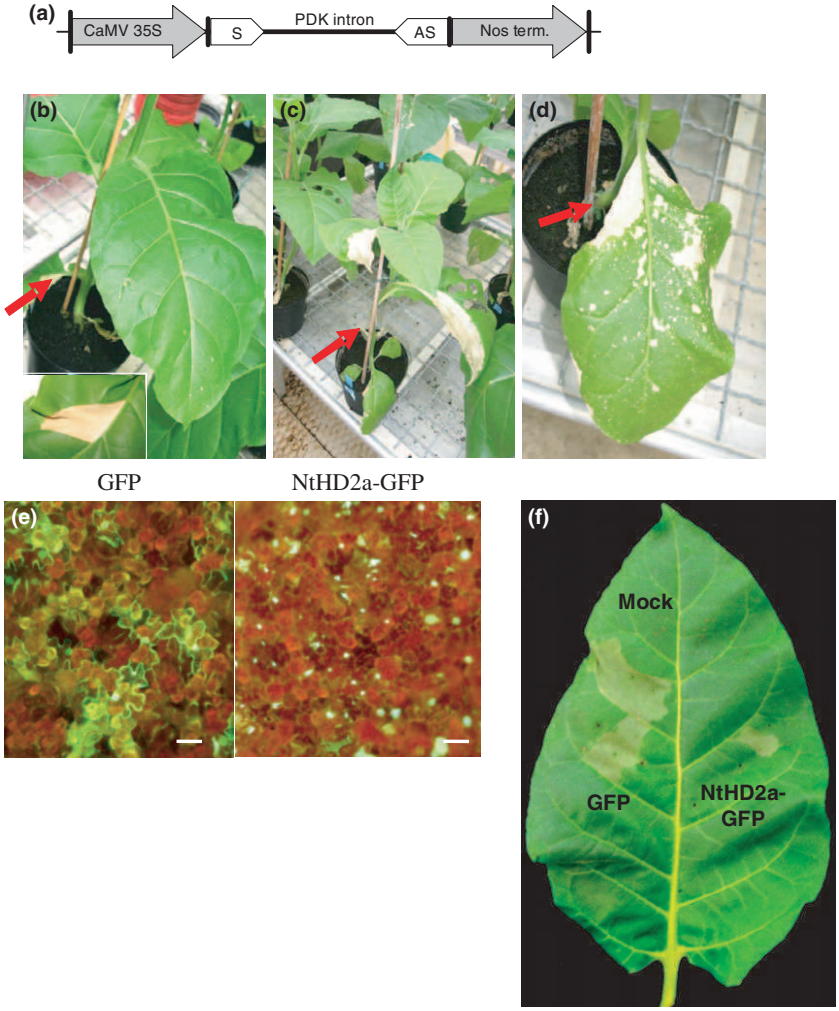


Fig. 6 Cryptogein-induced hypersensitive response (HR)-like necrosis in *NtHD2a/b*-deficient tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. (a) A construct in the pHANNIBAL vector (Wesley *et al.*, 2001) was designed in order to induce an efficient RNAi mechanism to silence *NtHD2a/b* genes. The same 107 bp fragment of NtHD2a/b was cloned in both sense (S) and antisense (AS) orientation spaced by the pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) intron. This construct under the control of the CaMV35S promoter was cloned into the pART27 binary vector in the LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* strain and used in transitory and stable transformation. (b–d) HR-like necrosis induced in tobacco plants deficient in NtHD2a/b. 100 nM cryptogein (500 μl) was infiltrated in the lower, nonagroinfiltated leaves of tobacco plants agroinfiltrated with an empty vector (b) and or with a vector containing the construct described in (a) (c, d). Photos were taken 7 d after cryptogein treatment. (e) Fluorescence linked to the overexpression of the GFP-alone construct (left) and of the GFP-fused NtHD2a construct (right). The pictures were obtained using an epifluorescence microscope 48 h postinfiltration by *A. tumefaciens* strains carrying constructs that led to overexpression of GFP or NtHD2a-GFP. Bars, 25 μm. (f) HR-like necrosis induced by cryptogein (100 nM) in a tobacco leaf that was either mock-infiltrated or infiltrated by *A. tumafaciens* strains that led to overexpression of GFP or NtHD2a/b. The leaf is representative of five independent experiments. Nos-term, Nos-terminator.

leaves strongly reduced the HR induced by cryptogein as compared with the overexpression of GFP alone (Fig. 6f), thus further confirming a role for NtHD2 as a negative repressor of cryptogein-induced HR.

Secondly, a stable transformed cell line expressing this construct was selected and termed CL5. *NtHD2a/b* transcript abundance in CL5 transformed cells was reduced by at least 75% compared with the WT (Fig. 7a). Importantly, the use of the NtHD2a/b-specific antibodies did not detect any proteins in the CL5 nuclear protein extract, confirming the efficiency of the RNAi approach used to inhibit *NtHD2a/b* gene expression (Fig. 7b). The reduced expression of NtHD2a/b did not impair the growth of the cells: it was similar to the growth of the WT cell suspension line. Remarkably, when exposed to 100 nM cryptogein, CL5 cells exhibited a higher and faster cell death than the WT cells. After 6 h of elicitor treatment, cell death reached 60% in CL5-transformed cells, whereas no significant cell death was observed in WT cells (Fig. 7c). After 24 h of cryptogein treatment, CL5 cells exhibited 90% cell death, whereas cell death only reached up to 35% in WT cells. OGs are not known to induce any cell death in WT cells. So we treated

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

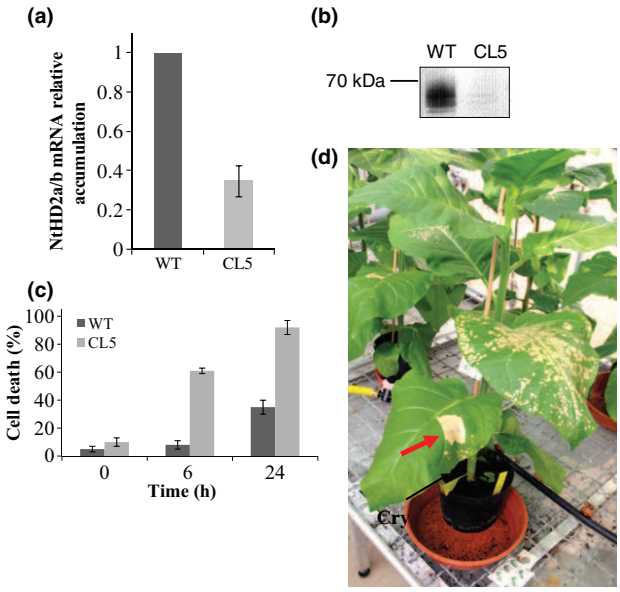


Fig. 7 Generation of a stable NtHD2a/b-deficient tobacco (*Nicotiana tabacum*) line. (a) Determination of *NtHD2a/b* transcript abundances in the CL5 transformed cells compared to the ones in WT cells by RT-qPCR. mRNA concentrations were measured by RT-qPCR using ef1 mRNA as a calibration gene by the ΔCt method. Data in the figure are the mean of three independent experiments (± SD). (b) NtHD2a/b protein content in WT and CL5 cells estimated by western blot using polyclonal antibodies raised against a specific NtHD2a/b internal peptide (PEAKVKEAEKSNVA). Twenty μg of nuclear proteins were analyzed per lane. (c) Cell death rate induced by cryptogein in the CL5 cells (grey bars) compared to the one induced in WT cells (black bars). Cell death was measured using the neutral red coloration method. For each determination, 500 cells were analyzed and the data in the figure are the mean of three independent experiments (± SD). (d) HR-like induced in CL5 tobacco plants (deficient for NtHD2a/b). 100 nM cryptogein (500 μl) was infiltrated in the second leaf (arrow) [correction added after online publication 16 June 2011: the arrows within (d) now point to their respective correct locations]. The photo was taken 7 d after cryptogein treatment.

CL5 cells with OGs, expecting the treatment to lead to an increase in cell death compared with untreated cells, but this was not the case (data not shown). These results fitted well with those obtained with our HDAC inhibitors and in transitory expression experiments, and they reinforce the hypothesis that NtHD2a/b act as repressors of cryptogein-induced cell death.

CL5-corresponding transgenic plants were also obtained and used in cryptogein infiltration experiments. As expected from transient expression of the hairpin construct (Fig. 6d), cryptogein also induced necrotic symptoms, but in distal leaves 8–10 d after infiltration (Fig. 7d), confirming that NtHD2a/b control cryptogein-induced cell death in plants too.

Since elicitor-induced plant defence is genetically controlled, we tested whether changes in the expression profile of different genes known to be up-regulated by cryptogein also occurred in CL5-transformed cells. We showed, for example, that *PR-3* and *HSR203J* transcripts strongly accumulated in CL5 cells as compared with WT cells, whereas *PAL A* mRNA did not (data not shown). A similar observation was performed in the cells pretreated with the HDAC inhibitor sodium butyrate which amplified the elicitor-induced cell death. Taken together, these data highlight a key role for NtHD2a/b in the control of cryptogein-induced local and systemic cell death.

Cryptogein induces a modification of nuclear protein acetylation

Since NtHD2a/b were identified as nuclear HDACs, we hypothesized that an inhibition of *NtHD2a/b* expression and the absence of the corresponding proteins in the CL5 cell line should result in the hyperacetylation of nuclear proteins which might represent putative NtHD2a/b targets. The acetylation status of nuclear proteins was monitored using antiacetylated lysine antibodies. As shown by western blot experiments, the up-acetylation of several nuclear proteins, and especially two with apparent molecular masses of 49 and 60 kDa, was detected in response to a 10-h-long cryptogein treatment (Fig. 8a). The accumulation of these acetylated proteins strongly correlates with the disappearance of NtHD2a/b proteins in the nucleus (Fig. 8b). Cycloheximide pretreatment of cryptogein-treated cells showed that this apparent up-acetylation of nuclear proteins does not correspond to the accumulation of newly synthesized nuclear proteins (data not shown). Neither does it correspond to the translocation of cytosolic acetylated proteins. Interestingly, in CL5 protein extracts, two nuclear proteins were also detected as up-acetylated when compared with WT protein extracts, and these proteins display the same apparent molecular masses as the ones observed in response to cryptogein treatment (Fig. 8a). This result supports the idea that cryptogein treatment finally induced the inhibition of nuclear deacetylase activities, especially NtHD2a/b. These up-acetylated proteins, which might not correspond to histones based on their apparent molecular masses, could be considered as nuclear effectors of the cryptogein-induced, acetylation-regulated cell death.

Discussion

The data reported in this paper highlight the importance of HDACs in mediating plant defence responses and particularly HR-like cell death. The identification of type-2 HDACs as nuclear proteins involved in response to cryptogein treatment implies that nuclear protein (de) acetylation could play a role in plant defence expression. While HDACs are well-known enzymes involved in the remodelling of chromatin (they deacetylate nuclear histones, which induces the repression of transcription) (Chen & Tian, 2007), they can also remove acetyl groups from non-

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

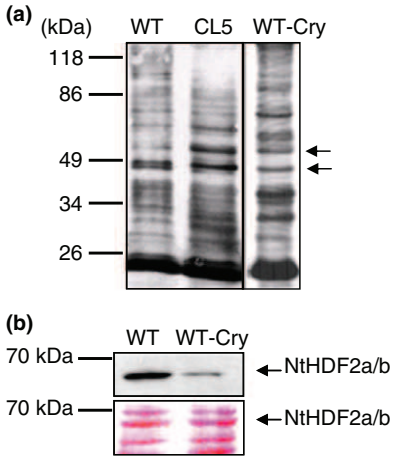


Fig. 8 Changes in the acetylation profile of nuclear proteins in nontreated wild-type (WT) and CL5 tobacco (*Nicotiana tabacum*) cells and cryptogein (Cry)-treated WT cells. (a) Nuclear proteins were prepared and analysed as described in the Materials and Methods section using a polyclonal antiacetylated-lysine antibody (Sigma A5463, 1/10000). Nuclear proteins were extracted from nontreated WT and CL5 cells, and from WT cells treated for 10 h with 100 nM cryptogein (WT, CL5 and WT-Cry, respectively). Bound primary antibodies were revealed using a secondary Bio-Rad antibody coupled to horseradish peroxidase and autoradiography. Arrows indicate major changes in the acetylation of nuclear proteins. Molecular marker masses are indicated on the left. (b) Nuclear proteins from nontreated WT cells and WT cells treated for 10 h with 100 nM cryptogein (WT, WT-Cry) were extracted as described in the Materials and Methods section and analysed with the NtHD2a/b-specific antibodies. The corresponding membrane was stained with Ponceau red to ensure equal loading of proteins in both lanes.

histone proteins, so they might also be considered more generally as lysine deacetylases (Walkinshaw *et al.*, 2008). Among nonhistone targets, it has been demonstrated in animal cells that HDACs can interact with various known transcription regulators such as the nuclear factor of activated T cells (NFTA) or p53 (Chen & Tian, 2007). HD2s form a plant-specific HDAC family. Little information is available regarding their physiological functions, although a role in controlling seed development by regulating the amount of rRNA in *A. thaliana* is expected (Wu *et al.*, 2000). An interesting feature of HD2s is that they might be phosphorylated by CK2s, as previously suggested in maize (Lusser *et al.*, 1997). The involvement of CK2s in HDAC regulation has also been described in animal cells for other classes of HDACs (Cabrero *et al.*, 2006; Pluemsampant *et al.*, 2008). This is of major interest as the only phosphorylation sites predicted in the NtHD2a/b sequences were specific for CK2. Furthermore, a preliminary study in our laboratory shows that cryptogein induces a fast and sustained activation of a nuclear CK2 activity, well above its constitutive level. These findings allow us to assume that NtHD2a/b phosphorylation occurs in the nucleus upon activation of a nuclear CK2.

The results presented in this paper show that NtHD2a/b act as negative regulators of cryptogein-induced cell death. Whether NtHD2a/b act through their enzymatic activities or by interacting with partner proteins is unresolved at present. The effect of phosphorylation on NtHD2a/b activity is not known either. Works in the animal field indicate that, depending on the physiological context, the catalytical domain of HDACs is not necessarily involved in the mediation of the biological response. For example, in lymphocytes, sodium butyrate was reported to block the tubuline deacetylase activity of HDAC6 without inhibiting its involvement in cell mobility (Cabrero *et al.*, 2006). Suppression of lymphocyte mobility required the inhibition of *HDAC6* gene expression by an RNAi approach. Furthermore, lymphocyte mobility was restored by expressing the N-terminal part of HDAC6 which does not contain any deacetylase domain. In our study, western blot experiments comparing nuclear protein patterns of acetylated proteins from WT and CL5 cells clearly show that *NtHD2a/b* expression is related to the deacetylation of nonhistone proteins. Although these data do not exclude the possibility that NtHD2a/b might mediate cryptogein effects through a nonenzymatic process, identification of the proteins deacetylated by NtHD2a/b should help in further deciphering the molecular mechanisms underlying cryptogein-induced cell death. Surprisingly, previous works have reported quite an apparent opposite role for HDACs in plant/pathogen interactions. Indeed, various HDAC inhibitors produced by plant pathogenic fungi have been associated with pathogen virulence (*Brosch et al.,* 1995; Ransom & Walton, 1997; Wight *et al.*, 2009). However, up to now none of the studies has identified the HDAC class(es) targeted by the fungal toxins. Furthermore, in the cryptogein/tobacco model, silencing of NtHD2 alone is not sufficient to promote plant resistance, indicating that inhibition of HD2 is necessary but not sufficient to lead to plant defence.

An interesting point concerns the results showing that, after 5–7 d, HR-like symptoms appeared in the leaves of NtHD2a/b-deficient tobacco plants at a distance from the cryptogein-infiltrated leaf, although it was previously shown that cryptogein did not migrate in the plant when infiltrated in leaves (Devergne *et al.*, 1992). Although speculative, at least two hypotheses could explain this phenotype. First, a chemical signal might be produced in cryptogein-infiltrated areas in both WT and NtHD2a/b-deficient tobacco, migrate through the vascular system but induce HR-like symptoms only in distant leaves in which the amount of NtHD2a/b protein is lowered due to the RNAi mechanism. Depending on its spatial foliar distribution and/or the heterogeneity of the RNAi mechanism, this signal could trigger HR-like necrosis either as a mosaic of necrotic spots or on one half of the leaf (Fig. 6). Second, in the leaves deficient in *NtHD2a/b* transcripts but not in WT leaves,

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

cryptogein infiltration could result in the synthesis of a new unexpected mobile compound able to migrate and to induce cell death in distant leaves. H_2O_2 could play a role in this mechanism as it has been suggested that H_2O_2 orchestrates a systemic signalling network leading to micro-HR in *A. thaliana* challenged by *Pseudomonas syringae* (Alvarez *et al.*, 1998). However, in tobacco cells challenged with cryptogein, the involvement of H_2O_2 in the control of cell death is still a matter of debate: Yoda *et al.* (2006) showed that H_2O_2 production under the control of the polyamine oxidase is a key element to induce programmed cell death, whereas Hirasawa *et al.* (2005) showed that H_2O_2 did not play any role in cryptogein-induced cell death.

To conclude, the results described in this study demonstrate that HD2s are a new class of cell death regulators. Since HD2-deficient tobacco cells and plants do not exhibit any spontaneous cell death, NtHD2a/b should not be considered as cell death inhibitors by themselves, but as inhibitors of a specific cryptogein-induced cell death process. Our next investigations will target the analysis of the mechanisms that underlie the effects of HD2s in regulating cell death and particularly the putative signal that induces cell death at a distance.

Acknowledgements

We thank Agnès Klinguer and Leslie Dutartre for their skilful help in tobacco transformation experiments and Annick Chiltz for technical assistance. We also thank Annie Buchwalter for English language editing. This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, and the Conseil Régional de Bourgogne. This work was also supported by grants from the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (FRM-contrat 'Grands Equipements'), the 'Genopole ToulouseMidi-Pyrénées', the 'Région Midi-Pyrénées and by ANR 'Grant ANR-Plates-Formes Technologiques du Vivant (PFTV)'. J.D. and S.B. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A.D. is supported by the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne.

References

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773–784.

Armstrong DJ, Roman A. 1993. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochemical Biophysical Research Communication* **192**: 1380–1387.

Bachmair A, Finley D, Varshavsky A. 1986. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**: 176–186.

Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitins in tobacco and others plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 181–192.

Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Jauneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A, Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* **24**: 3421–3432.

Brosch G, Lusser A, Goralik-Schramel M, Loidl P. 1996. Purification and characterization of a high molecular weight histone deacetylase complex (HD2) of maize embryos. *Biochemistry* **35**: 15907–15914.

Brosch G, Ransom R, Lechner T, Walton JD, Loidl P. 1995. Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum. The Plant Cell* **7**: 1941–1950.

Cabrero JR, Serrador JM, Barreiro O, Mittelbrunn M, Naranjo-Suarez S, Martin-Cofreces N, Vicente-Manzanares M, Mazitschek R, Bradner JE, Avila J *et al.* 2006. Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 3435–3445.

Chandler MT, Tandeau de Marsac N, De Kouchkovsky Y. 1972. Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* **50**: 2265–2270.

Chen ZJ, Tian L. 2007. Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochemical Biophysical Acta* **1769**: 295–307.

Coronado MJ, Testillano PS, Wilson C, Vicente O, Heberle-bors E, Risueño MC. 2007. *In situ* molecular identification of the Ntf4 MAPK expression sites in maturing and germinating pollen. *Biology of the Cell* **99**: 209–221.

Costa-Rosa LF, Curi R, Murphy C, Newsholme P. 1995. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O_2 metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP+-dependent 'malic' enzyme. *Biochemical Journal* **310**: 709–714.

Dahan J, Pichereaux C, Rossignol M, Blanc S, Wendehenne D, Pugin A, Bourque S. 2009. Activation of a nuclear localized-SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemical Journal* **418**: 191–200.

Dahan J, Wendehenne D, Ranjeva R, Pugin A, Bourque S. 2010. Nuclear protein kinases: still enigmatic components in plant cell signalling. *New Phytologist* **185**: 355–368.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M *et al.* 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acid Research* **36** (Suppl. 2): W465–W469.

Devergne JC, Bonnet P, Panabieres F, Blein JP, Ricci P. 1992. Migration of the fungal protein cryptogein within tobacco plants. *Plant Physiology* **99**: 843–847.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research* **32**: 1792–1797.

English J, Davenport G, Elmayan T, Vaucheret H, Baulcombe D. 1997. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and *trans*-inactivation. *Plant Journal* **12**: 597–603.

Garcia-Brügger 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 Signaling Behavior* **2**: 86–95.

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

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855–858.

Hirasawa KI, Amano T, Shioi Y. 2005. Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* **66**: 463–468.

van der Hoorn RAL, Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**: 2009–2017.

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229–1231.

Huang L, Sun Q, Qin F, Li C, Zhao Y, Zhou DX. 2007. Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiology* **144**: 1508–1519.

Jin H, Liu Y, Yang KY, Kim CY, Baker B, Zhang S. 2003. Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant Journal* **33**: 719–731.

Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z. 2008. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell* **20**: 2357–2371.

Kuzniak E, Sklodowska M. 2004. Comparison of two methods for preparing mitochondria from tomato leaves to study the ascorbate-glutathione cycle activity. *Biological Plantarum* **48**: 537–542.

Lam E. 2005. Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends in Cellular Biology* **15**: 124–127.

Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D. 2004. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**: 516–529.

Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A. 1998. Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant Journal* **15**: 773–781.

Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A. 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**: 527–538.

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

Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A. 2000. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 821–829.

Ligterink W, Kroj T, Nieden UZ, Hirt H, Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054–2057.

Lorrain S, Vailleau F, Balagué C, Roby D. 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* **8**: 263–271.

Lusser A, Brosch G, Loidl A, Haas H, Loidl P. 1997. Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* **277**: 88–91.

Ma W, Berkowitz GA. 2007. The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology* **9**: 2571–2585.

Menke FLH, Kang HG, Chen Z, Park JM, Kumar D, Klessig DF. 2005. Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1027–1034.

Mitsui T, Honma M, Kondo T, Hashimoto N, Kimura S, Igaue I. 1994. Structure and function of the golgi complex in rice cells (II. Purification and characterization of golgi membrane-bound nucleoside diphosphatase). *Plant Physiology* **106**: 119–125.

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.

Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW, Jorgensen RA. 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **30**: 5036–5055.

Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama KI, Morita I. 2008. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *International Journal of Cancer* **122**: 333–341.

Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, 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.

Ransom RF, Walton JD. 1997. Histone hyperacetylation in maize in response to treatment with HC-toxin or infection by the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum*. *Plant Physiology* **115**: 1021–1027.

Ricci P. 1997. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitins. In: Stacey G, Keen NT, eds. *Plant–microbe interactions*. New York, NY, USA: Chapman and Hall, 53–75.

Romeis T, Ludwig A, Martin R, Jones J. 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO Journal* **20**: 5556–5567.

Samuel MA, Hall H, Krzymowska M, Drzewiecka K, Hennig J, Ellis BE. 2005. SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco. *Plant Journal* **42**: 406–416.

Scheffel A, Schuler D. 2007. The acidic repetitive domain of the *Magnetospirillum gryphiswaldense* MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly. *Journal of Bacteriology* **189**: 6437–6446.

Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A. 1995. Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology* **109**: 1025–1031.

Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ. 2008. Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* **104**: 1541–1552.

Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, 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.

Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA *et al.* 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**: 581–590.

Wight WD, Kim KH, Lawrence CB, Wlaton JD. 2009. Biosynthesis and role in virulence of the histone deacetylase inhibitor depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1258–1267.

Wu K, Tian L, Malik K, Brown D, Miki B. 2000. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **22**: 19–27.

Yoda H, Hiroi Y, Sano H. 2006. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiology* **142**: 193–206.

Zhang S, Liu Y. 2001. Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* **13**: 1877–1889.

Zhang S, Liu Y, Klessig D. 2000. Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitins. *Plant Journal* **23**: 339–347.

Zipfel C, Felix G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 353–360.

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Supporting Information

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

Fig. S1 Full coding NtHD2a and NtHD2b nucleotidic sequences.

Table S1 Sequences used to determine the mRNA content of different genes in RT-qPCR experiments

Table S2 Primer sequences used to clone a specific NtHD2a/b fragment into the pHannibal vector

Table S3 Mascot scores corresponding to the peptides identified by mass spectrometry

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

About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at **www.newphytologist.org**.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *Early View* – our average submission to decision time is just 29 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £149 in Europe/$276 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (**np-centraloffice@lancaster.ac.uk**; tel +44 1524 594691) or, for a local contact in North America, the US Office (**newphytol@ornl.gov**; tel +1 865 576 5261).

© 2011 Université de Bourgogne
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Supporting Information Fig. S1 and Tables S1-S3

Fig. S1 Full coding *NtHD2a* and *NtHD2b* nucleotidic sequences

```
NtHD2a          ATGGAGTTTTGGGGTGCTGAGGTGAAAAGTGGAGAGCCTTTAACTGTACAGCCTGGAGAT 60
NtHD2b          ATGGAGTTTTGGGGTGCTGAGGTGAAAAGTGGAGAGCCTTTAACTGTACAGCCTGGAGAT 60
                ************************************************************

NtHD2a          GGGATGGTTTTGCATCTTTCACAGGCATCTCTCGGTGAGTTGAAGAAGGATAAAGCACAA 120
NtHD2b          GGGATGGTTTTGCATCTTTCACAGGCATCTCTTGGTGAGTTGAAGAAGGATAAAGTACAA 120
                ******************************** ********************** ****

NtHD2a          AGTGTTTGCTTGTCTGTGAACATCGATGGCAAGAAACTTGTCCTTGGGACACTCAGCTCA 180
NtHD2b          AGTGTCTGCTTGTCTGTGAACATTGATGGCAAGAAACTTGTCCTTGGGACACTCAACTCA 180
                ***** ***************** ****************************** ****

NtHD2a          GATAAGGTGCCTCAACAGCAGTTTGACCTGGTTTTTGATAGAGACTTTGAACTATCACAC 240
NtHD2b          GATAAGGTGCCTCAACAGCAATTTGACCTGGTTTTTGATAGAGACTTTGAGTTATCACAC 240
                ******************** ****************************  ********

NtHD2a          AACTGGAAAAGTGGCAGCGTGTACTTTTTTGGATACAAGGCCACTAACCCATTTGAGGAG 300
NtHD2b          AACTGGAAAAATGGCAGCGTCTACTTTTTTGGATACAAGGCCACTAATCCGTTTGAGGAG 300
                ********** ********* ************************** ** *********

NtHD2a          GAAGAGGATGATGAAGATGATGAAGAAGAGTCTGATGAGGACATCCCCCTCACTATTGCA 360
NtHD2b          GAAGAGGATGATGAAGACGATGAAGAAGAGTCTGATGAGGACATCCCTCTTACTATTGCA 360
                ***************** **************************** ** *********

NtHD2a          AACAATGGAAAACCCGAGGCTAAGGTTAAGGAGGCAGAGAAGTCTAATGTTGCTAAGGAT 420
NtHD2b          AACAATGGGAAACCTGAGGCTAAGGTTAAGGAGGCAGAGAAGTCTAATGCTGCAAAGGAT 420
                ******** ***** ********************************** *** ******

NtHD2a          TCTGCTTCAGGTAAGCAGAAGGTGAAGATTGTGGAACCTAGTAAAGATGCCAAGGCTGAT 480
NtHD2b          TCTGCTTCAGGTAAGCAGAAGGTTAAGATTGTGGAACCTAGTAAAGATGCCAAGGCAGAT 480
                ********************** ******************************** ***

NtHD2a          GATGAAGATGAGAGCACTGATGAAGATGAAATGTCTGAGGATGAAGATTCTGACATGGGA 540
NtHD2b          GATGAAGATGAGAGCACTGATGAAGATGAAATGTCTGAGGATGAAGATTCAGACGTGGGA 540
                ************************************************ *** *****

NtHD2a          GAGGGTGAAGATGAGAGTGATGGGGATGATGAGTCTGACGAGGGCGAGGAGGAGACACCA 600
NtHD2b          GAGGGCGAAGATGAGAGCGACGAGGATGATGAGTCTGATGAGAGTGAGGAGGAGACACCA 600
                ***** *********** ** * *************** *** * ***************

NtHD2a          AAGAAGGCTGAACCTGGCAAAAAGAGGAAGGCAGATTCGGCTACAAAAACACCTGTCCCA 660
NtHD2b          AAGAAGGCTGAACCTGGCAAAAAGAGGAAGGCAGATTCGGCTACAAAAACACCCG---CG 657
                ************************************************** *   *

NtHD2a          GATAAGAAGGCAAAATTTGTAACTCCTCAAAAAACTGATGGCAAAAAAGGTAGCGGCCAT 720
NtHD2b          GATAAGAAGGCAAAATTTGTAACTCCTCAAAAAACTGATGGCAAAAAAGGTAGCGGCCAT 717
                ************************************************************

NtHD2a          GTAGCAACCCCTCACCCCTCAAAACAGGCTGGTAAATCTCCTGCAAACAAGAACCAGCAG 780
NtHD2b          GTAGCGACCCCTCATCCCTCAAAACAGGCTGGCAAGTCTCCTGCAAACAAGAACCAGCAG 777
                ***** ******** ***************** ** ************************

NtHD2a          ACTCCAAAATCAGGCGGCGCTCATCTTTGCAAGACATGCAACAGGGGTTTTGGTTCTGAA 840
NtHD2b          ACTCCAAAATCAGGGGGCGCTCATCTCTGCAAGACATGCAACAGAGGTTTTGGTTCTGAA 837
                ************** *********** ***************** ***************

NtHD2a          AATGCTTTGGAATTTCACTCGAAAGCTAAGCACAGCGCTGCAAAGTAA 888
NtHD2b          AATGCTCTTGAATCTCACTCCAAAGCTAAGCACAGTGCTGCAAAGTAA 885
                ****** * **** ****** ************** ************
```

Table S1 Sequences used to determine the mRNA content of different genes in RT-qPCR experiments

Gene	Forward	Reverse
NtHD2a/b	AGG AAG GCA GAT TCG GCT ACA	TGA TTT TGG AGT CTG CTG GTT
NtEF-1	AAC TGG TGT CCT CAA GCC TGG TAT	AAG CAC CCA TTG CTG GGA CAT
PR3	GCC ATA GGA GTG GAC CTG CTA AAC	AAA AGA CCT CTG GTT GCC GC
PAL	TCC CCT TGT CCT ACA TTG CTG GTT	TCA ATT TGT CCG GGG TGA TGC TTC
HSR203J	TGT GTC AGC CAT GCT GAT TGG T	GTT CTA GCT CCG ATT TGC TCC GAT

Table S2 Primer sequences used to clone a specific NtHD2a/b fragment into the pHannibal vector

Primer	Sequence	Restriction site
FS	ATCTCGAGGCGGAGGCAGAGAAGTCTAATGTTG	Xho1
RevS	ATCTCGAGGGACACTCAACTCAGATAAGG	Kpn1
FAS	CAAGATCTAGCGGAGGCAGAGAAGTCTAATGTTG	Xba1
RevAS	GCGGATCCGCGGAGGCAGAGAAGTATGTTG	BamH1

Underlined sequences correspond to the restriction sites used to clone the NtHD2a/b in the pHannibal.

Table S3 Mascot scores corresponding to the peptides identified by mass spectrometry

PEPTIDES	MASCOT score
MEFWGAEVK.S + Acetyl (N-term)	63
MEFWGAEVK.S + Acetyl (N-term); Oxidation (M)	44
EFWGAEVK	27
SGSVYFFGYK	53
VPQQQFDLVFDR	92
LVLGTLNSEKVPQQQFDLVFDR	15
SGEPLTVQPGDGMVLHLSQASLGELK.K + Oxidation (M)	40

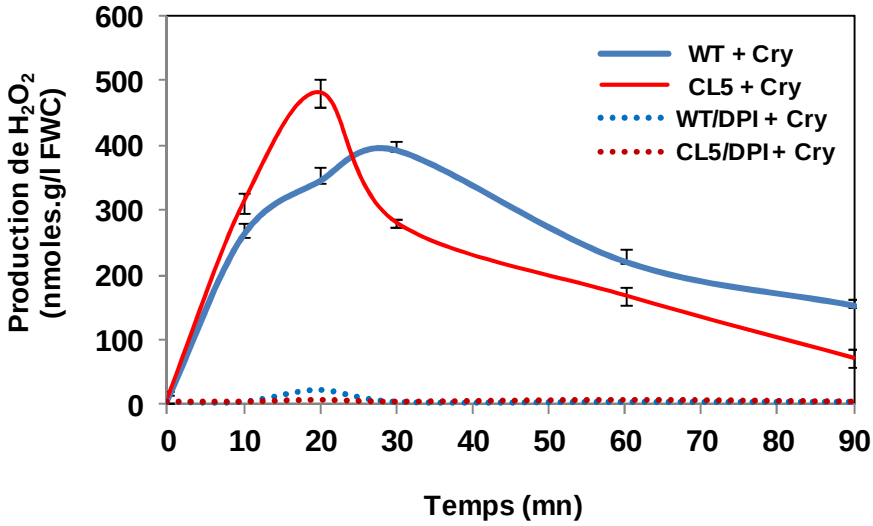


Figure 8 : Production de H_2O_2 dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5, prétraitées ou non par 10 µM de DPI, en réponse à 100 nM de cryptogéine. La production de H_2O_2 consécutive au traitement est mesurée par chimioluminescence du luminol. La production de H_2O_2 dans les cellules non traitées est retranchée à l'échantillon correspondant pour chaque point de la cinétique. Les valeurs ± ESM (erreur sur la moyenne de triplicats) sont issues d'une expérience représentative parmi trois expériences indépendantes.

3. Résultats complémentaires

Si les résultats présentés dans ce manuscrit démontrent sans équivoque que NtHD2a/b contrôlent l'intensité de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, ils ne permettent pas d'expliquer pourquoi ce taux de mort cellulaire induit par la cryptogéine atteint 90 % après 24 h de traitement dans les cellules invalidées pour l'expression de NtHD2a/b. En complément de ce travail, nous avons donc recherché dans un premier temps si un ou plusieurs événements de la cascade de signalisation cellulaire induite par la cryptogéine pouvaient être modifiés dans leur cinétique et / ou leur amplitude, et ainsi corréler ou expliquer le taux de mort cellulaire dans les cellules CL5.

3.1. Des événements de signalisation cellulaire comparables dans les cellules WT et CL5

3.1.1. Production de H_2O_2 induite par la cryptogéine

De nombreuses études ont montré qu'une activité NADPH oxydase est la source enzymatique de la production de H_2O_2 impliquée dans les mécanismes de défense des plantes (Pugin *et al*., 1997 ; Simon-Plas *et al*., 2002 ; Torres *et al*., 2002 ; Torres & Dangl, 2005). Dans les cellules de tabac, la NADPH oxydase responsable de la production de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine est codée par le gène *NtRbohD* (Simon-Plas *et al*., 2002).

La production de H_2O_2 a été suivie par mesure de la chimioluminescence du luminol. La production basale de H_2O_2 est similaire dans les cellules WT et CL5 et atteint environ 10 nmoles de $H_2O_2.g^{-1}$ PFC. Cette production basale sera retranchée de la valeur obtenue pour chaque point de cinétique (Figure 8). Le traitement des cellules WT par la cryptogéine s'accompagne d'une production de H_2O_2 qui est maximale après 30 mn, atteignant 400 nmol de $H_2O_2.g^{-1}$ PFC, puis diminue progressivement dans les 60 mn suivantes. La production de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine est similaire dans les cellules CL5, avec un pic de l'ordre de 480 nmol de $H_2O_2.g^{-1}$ PFC atteint après 20 mn de traitement, suivi d'une décroissance progressive durant les 70 mn suivantes.

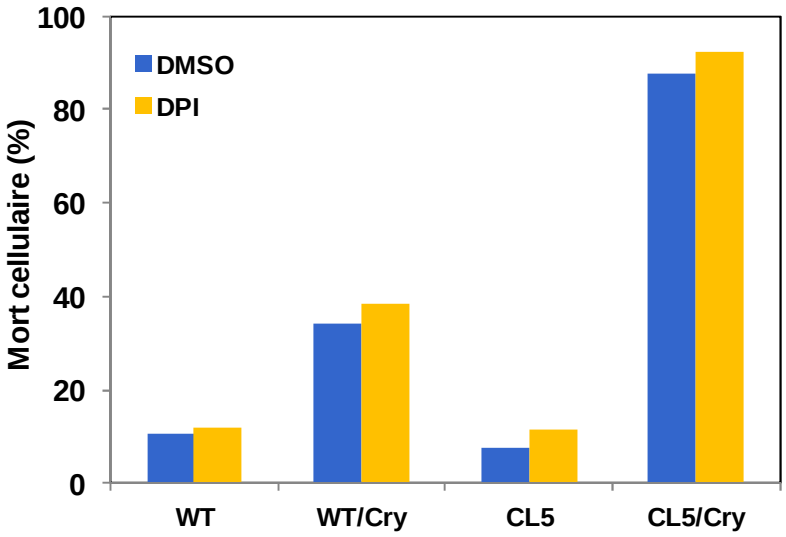


Figure 9 : Mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 traitées prétraitées ou non par le DPI. Les cellules de tabac sont prétraitées pendant 10 minutes par 10 µM de DPI ou par un volume équivalent de DMSO, puis traitées par 100 nM de cryptogéine. Le taux de mort cellulaire est évalué par coloration des cellules au rouge neutre (0,01 %) après 24 heures de traitement. Les valeurs sont représentatives de la moyenne de 2 expériences indépendantes.

Afin de vérifier que la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine dans les cellules CL5 est bien, comme dans les cellules WT, catalysée par une NADPH oxydase, nous avons utilisé le diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur des NADPH oxydases qui abolit complètement la production de H_2O_2 dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine (Pugin *et al.*, 1997). Comme il était attendu, en présence de DPI, la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine dans les cellules CL5 et WT est inhibée, confirmant l'implication d'une NADPH oxydase.

Ces résultats montrent que l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* dans les cellules CL5 n'est pas associée à une modification de la production de H_2O_2 dans les cellules de tabac élicitées par la cryptogéine.

Bien que l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* n'affecte pas quantitativement la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que cette production de H_2O_2 soit catalysée par deux NADPH oxydases différentes, et qu'elle n'ait donc pas les mêmes conséquences sur la mort cellulaire dans les cellules WT et CL5. Nous avons donc étudié l'implication potentielle de la production de H_2O_2 dans le processus de mort cellulaire dans les cellules CL5. Pour estimer le taux de mort cellulaire dans les suspensions de *N. tabacum cv.* Xanthi, qui présentent des agrégations plus ou moins importantes, seule la technique du rouge neutre (un colorant vital des cellules) est utilisable, bien qu'elle ne soit pas très précise. Les autres techniques de mesure du taux de mort cellulaire, telles que le diacétate de fluorescéine ou le bleu Evans, n'ont pu être utilisées avec ces cellules. Après 24 h de traitement par la cryptogéine, le taux de mort cellulaire des suspensions cellulaires WT et CL5 atteint respectivement 40 et 90 % (Figure 9). En présence de DPI dans les suspensions cellulaires WT et CL5, ces taux de mort cellulaire ne sont pas significativement différents (variations n'excédant pas 11%), confirmant d'une part que la production de H_2O_2 ne constitue pas un événement de signalisation déterminant dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans les cellules sauvages, et indiquant d'autre part que ce n'est pas un élément fondamental contrôlant la mort cellulaire plus intense dans la lignée cellulaire CL5.

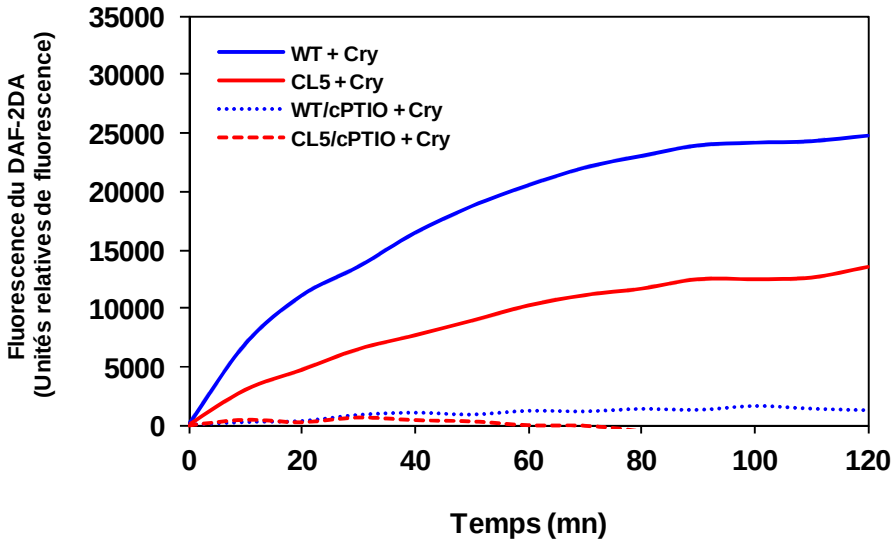


Figure 10 : Estimation de l'accumulation du monoxyde d'azote (NO) intracellulaire par mesure de la fluorescence du DAF-2DA dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 traitées avec 100 nM de cryptogéine en présence ou non de 500 µM de cPTIO. L'augmentation de fluorescence de la sonde DAF-2DA mesurée par spectrofluorométrie consécutive au traitement cryptogéine est fonction de la quantité de NO produite par les cellules (Besson-Bard *et al*., 2008). La production basale dans les témoins correspondants est retranchée de la valeur de chaque échantillon. Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative de 5 expériences indépendantes.

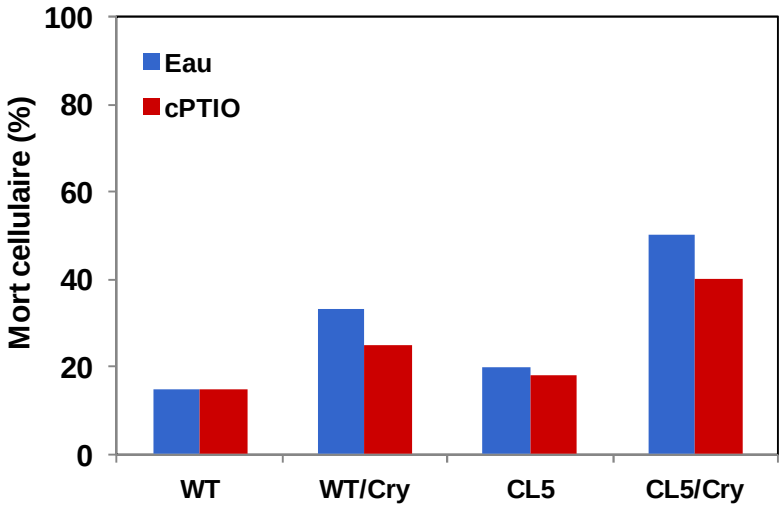


Figure 11 : Mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 prétraitées ou non par le cPTIO. Les cellules de tabac sont prétraitées pendant 10 minutes par 250 µM de cPTIO ou par un volume équivalent d'eau, puis traitées par 100 nM de cryptogéine. Le taux de mort cellulaire est évalué par coloration des cellules au rouge neutre (0,01 %) après 24 heures de traitement. Les valeurs sont représentatives de la moyenne de 2 expériences indépendantes.

3.1.2. Production de NO induite par la cryptogéine

Afin de mettre en évidence la production de NO intracellulaire dans les cellules de tabac WT et CL5 en réponse à la cryptogéine, nous avons utilisé le DAF-2DA, un fluorophore diffusant à travers les membranes biologiques. En l'absence de traitement, la fluorescence mesurée dans les cellules WT et CL5 est équivalente et sera ensuite retranchée de la valeur mesurée pour chaque point de la cinétique. Le traitement des cellules WT et CL5 par la cryptogéine s'accompagne d'une augmentation de fluorescence observable après 5 mn de traitement et qui atteint un plateau après 90 mn (Figure 10). Cependant, si les cinétiques de production sont très similaires, l'élévation de fluorescence induite par la cryptogéine dans les cellules CL5 est réduite d'environ 50 % pour la valeur du plateau. Aucune augmentation de fluorescence dans les suspensions cellulaires WT et CL5 n'est mesurée en présence de cPTIO, un piégeur de NO (Durner *et al.*, 1998), ce qui argumente le fait que la fluorescence mesurée en réponse à la cryptogéine correspond bien à une production de NO. Ces résultats suggèrent donc que l'accumulation de NO dans les cellules CL5 serait réduite de moitié par rapport à celle mise en évidence dans les cellules sauvages, sans toutefois pouvoir déterminer si la production ou le métabolisme, voire les deux simultanément, sont modifiés.

Sur la base de cette différence d'accumulation du NO, nous avons étudié son implication potentielle dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans les cellules WT et CL5. Pour cela, nous avons prétraité les cellules en suspension par du cPTIO afin de piéger le NO produit en réponse à la cryptogéine et évalué le taux de mort cellulaire par la coloration au rouge neutre. Comme le montre la Figure 11**,** après 24 h de traitement par la cryptogéine, le piégeage du NO par le cPTIO diminue le taux de mort dans les suspensions cellulaires WT et CL5 de respectivement 24 et 20 %. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Lamotte *et al.*, 2004), et suggèrent que la production de NO induite par la cryptogéine n'est pas l'événement de signalisation principal du processus de mort cellulaire chez le tabac. De plus, bien qu'une différence importante d'accumulation de NO dans les cellules WT et CL5 soit mesurée, il ne semble pas que ce soit un événement majeur permettant d'expliquer la différence de taux de mort cellulaire entre les deux lignées.

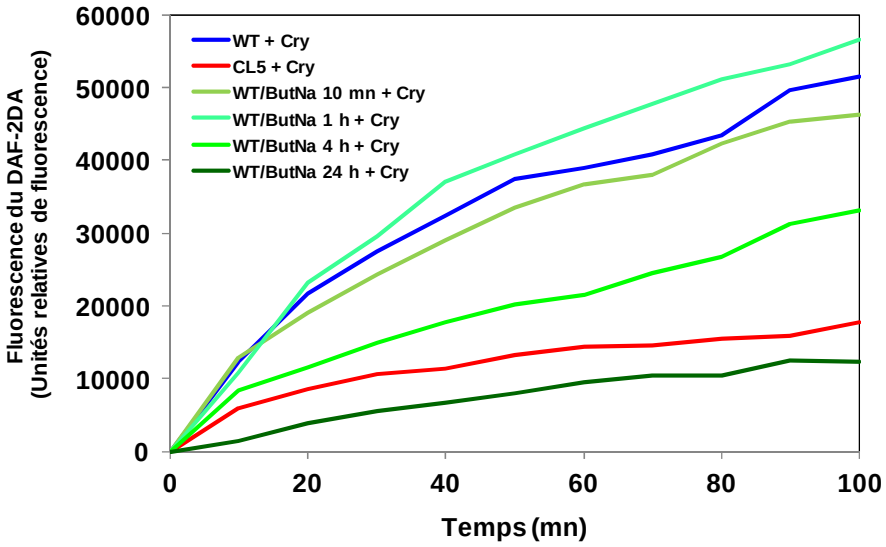


Figure 12 : Estimation de l'accumulation du monoxyde d'azote (NO) intracellulaire par mesure de la fluorescence du DAF-2DA dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 traitées avec 100 nM de cryptogéine avec un prétraitement ou non de 10 mM de ButNa (pendant 10 minutes ; 1, 4 ou 24 heures). L'augmentation de fluorescence de la sonde DAF-2DA mesurée par spectrofluorométrie consécutive au traitement cryptogéine est fonction de la quantité de NO produite par les cellules (Besson-Bard *et al*., 2008). La production basale dans les témoins correspondant est retranchée de la valeur de chaque échantillon. Les valeurs présentées correspondent à une expérience représentative de 2 expériences indépendantes.

Afin d'étudier plus en détail les liens entre l'extinction de l'expression de *NtHD2a/b* et la diminution de l'accumulation de NO, nous avons testé l'effet d'un inhibiteur général des activités HDAC, le butyrate de sodium (ButNa). Lorsque les cellules WT sont traitées au ButNa 10 mn avant l'ajout de cryptogéine, aucune diminution de l'accumulation de NO n'est mesurée, suggérant qu'aucune acétylation de protéines induite par la cryptogéine n'est impliquée dans la synthèse et / ou le métabolisme du NO (Figure 12). Toutefois lorsque la durée de prétraitement des cellules au ButNa est prolongée de 4 à 24 h, on peut noter que plus ce prétraitement est long, plus l'accumulation du NO est réduite (Figure 12). Après 4 h de prétraitement par le ButNa, l'accumulation de NO en réponse à la cryptogéine est similaire dans les cellules WT et CL5. Ces résultats suggèrent d'une part que l'accumulation de NO dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine ne dépend pas d'un changement d'acétylation de protéines induit *de facto* par la cryptogéine et d'autre part que « l'homéostasie » du NO serait contrôlée par le niveau d'acétylation d'un certain nombre de protéines impliquées dans sa synthèse et / ou son métabolisme.

Le DAF-2DA, utilisé dans nos expériences pour mettre en évidence l'accumulation de NO dans les cellules de tabac, est souvent controversé dans la littérature à propos de sa spécificité (Mur *et al.*, 2011). Afin de s'assurer que la diminution de fluorescence du DAF-2DA mesurée dans les cellules CL5 correspond bien à une accumulation moindre de NO, nous avons cherché à déterminer si un événement dépendant de la production de NO était modifié dans les cellules CL5 par rapport aux cellules sauvages. Différentes études ont montré que le NO modulait l'activité d'un certain nombre de protéines dont des PK. NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase) est une protéine kinase de la famille des SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2 (SnRK2) spécifique des plantes qui est rapidement activée lors de l'exposition de suspensions cellulaires de tabac à des stress hyperosmotique ou salin (Hoyo & Zhang, 2000 ; Mikolajczyk *et al.*, 2000 ; Wawer *et al.*, 2010) mais également de façon moins reproductible en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009). Une étude réalisée au laboratoire a montré que l'activation d'une PK assimilée à NtOSAK est modulée par le NO produit lorsque les suspensions cellulaires de *N. plumbaginifolia* sont soumises à un choc hyperosmotique ou à un donneur exogène de NO (Lamotte *et al.*, 2006). L'activation de

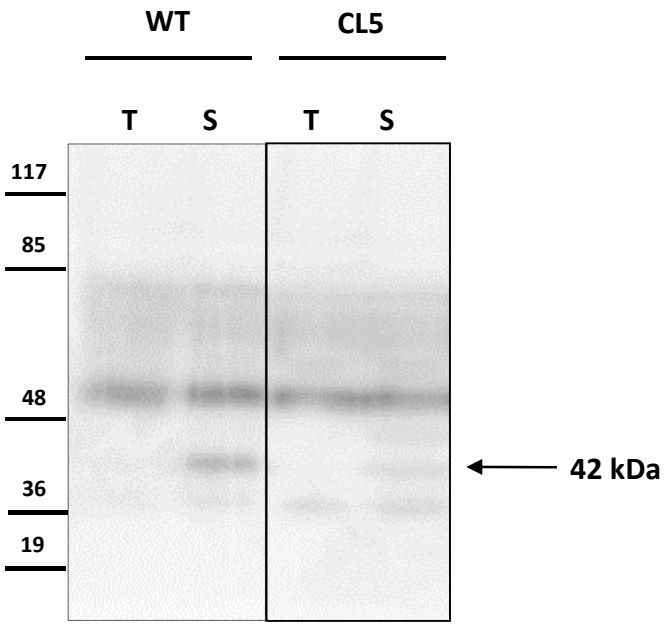


Figure 13 : Activation de NtOSAK dans les cellules WT et CL5 en réponse à un choc hyperosmotique. Des extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules WT et CL5 témoins (T) ou traitées par 250 mM de sorbitol (S) pendant 10 mn. Vingt-cinq µg de protéines ont été analysés par essai kinase en gel utilisant l'histone IIIS comme substrat général des PK. La phosphorylation du substrat est réalisée en présence de 15 µCi de [γ-^{32}P]-ATP. Le gel est ensuite séché et soumis à une autoradiographie. La position de NtOSAK est indiquée par une flèche. Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences indépendantes.

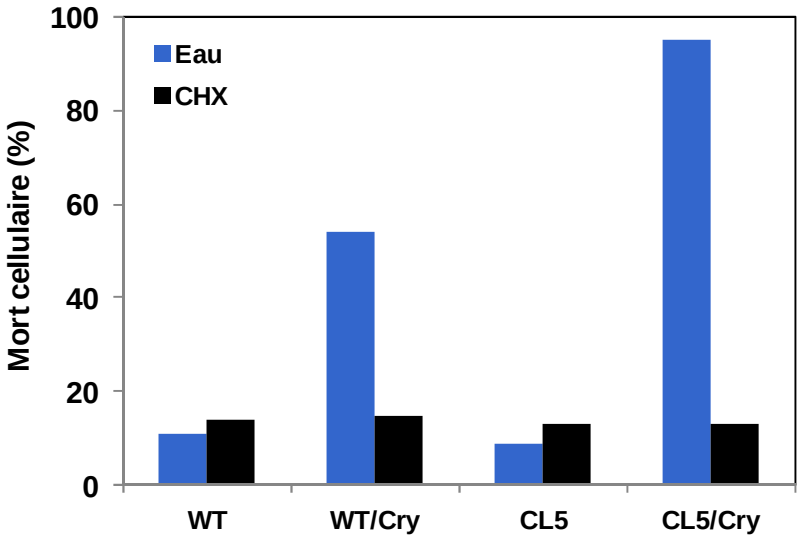


Figure 14 : Mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 prétraitées ou non par le cycloheximide. Les cellules de tabac sont prétraitées pendant 10 mn par 50 µM de cycloheximide (CHX) ou par un volume équivalent d'eau, puis traitées par 100 nM de cryptogéine. Le taux de mort cellulaire est évalué par coloration des cellules au rouge neutre (0,01 %) après 24 heures de traitement. Les valeurs sont représentatives de la moyenne de 2 expériences indépendantes.

NtOSAK en réponse à la cryptogéine n'étant pas systématiquement observée, nous avons choisi de vérifier si l'activation de NtOSAK lors d'un stress hyperosmotique provoqué par l'ajout de 250 mM de sorbitol était similaire ou non dans les suspensions cellulaires WT et CL5. Un essai kinase en gel, en utilisant l'histone IIIS comme substrat, a été réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules WT et CL5 traitées au sorbitol pendant 10 mn. Dans ces conditions, l'activité d'une protéine kinase de 42 kDa, précédemment identifiée comme NtOSAK (Mikolajczyk *et al.*, 2000) est clairement détectée dans les cellules WT (Figure 13). En revanche, dans les cellules CL5, l'activation de la PK de 42 kDa par le sorbitol est fortement réduite. Ces résultats confirment que l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* dans les cellules de tabac s'accompagne d'une accumulation atténuée de NO et de la réduction des événements NO-dépendants.

3.2. Des événements cellulaires significativement différents dans les cellules CL5 et WT

3.2.1. Relation entre la synthèse protéique et l'induction de la mort cellulaire par la cryptogéine

Un des éléments fondamentaux pour l'induction de la mort des cellules de tabac en réponse à un traitement par la cryptogéine est la néosynthèse de protéines, processus à mettre en relation avec l'accumulation d'ARNm d'un certain nombre de gènes associés à la défense. Ceci a été démontré grâce à l'utilisation du cycloheximide (CHX), un composé connu pour bloquer la traduction et qui réduit fortement la mort cellulaire induite par la cryptogéine (Gauthier *et al.*, 2007). Nous avons donc utilisé le CHX pour vérifier si l'augmentation du taux de mort cellulaire en réponse à la cryptogéine dans les cellules CL5 était également dépendante d'une synthèse de protéines *de novo*. Comme le montre la Figure 14, après 24 h de traitement par la cryptogéine le taux de mort cellulaire dans les suspensions cellulaires WT et CL5 est respectivement de 55 et 95 %. En présence de CHX, ce taux de mort cellulaire est respectivement réduit d'environ 70 et 90 % dans les suspensions cellulaires WT et CL5,

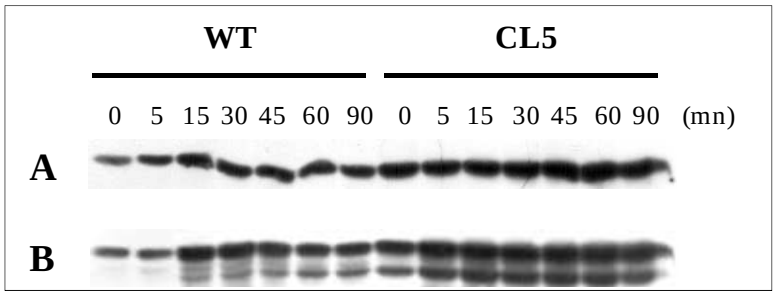


Figure 15 : Régulation de la phosphorylation des MAPK en réponse à la cryptogéine dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5. Les cellules de tabac sont traitées pendant 6 heures par 100 nM de cryptogéine ou par un volume équivalent d'eau. Les protéines cytosoliques ont été extraites pour chaque temps de traitement des cellules WT et CL5. **A**, les MAPK totales ont été analysées par western blot avec l'anticorps polyclonal anti-ERK 1/2 humaines (dilution au 1/1000ème). **B**, les MAPK phosphorylées ont été analysées par western blot avec l'anticorps polyclonal anti-ERK 1/2 phosphorylées humaines (dilution au 1/1000ème). Le résultat présenté correspond à une expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

confirmant que la synthèse *de novo* de protéines est également requise dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans la lignée cellulaire CL5. Ce résultat est à rapprocher du fait qu'un certain nombre de gènes de défense voient leur ARNm s'accumuler davantage dans les cellules CL5 que dans les cellules WT (Cf. Article publié dans New Phytol).

3.2.2. Activation des MAPK dans les cellules CL5

Il a précédemment été montré chez le tabac que l'activation de la MAPK SIPK est corrélée à l'induction de la mort cellulaire par la cryptogéine (Zhang & Klessig, 1998 ; Zhang & Klessig, 2001 ; Lebrun-Garcia *et al*., 2002). Nous avons donc recherché si l'élévation du taux de mort cellulaire dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine s'accompagnait ou non d'une augmentation de l'activité SIPK. Pour cela, des extraits de protéines cytosoliques de cellules WT et CL5, traitées ou non par la cryptogéine, ont été analysés par western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ERK 1/2 phosphorylées humaines. De précédents travaux ont en effet montré que cet anticorps reconnaît spécifiquement les MAP kinases activées chez les plantes (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998). Dès 10 mn de traitement, une protéine d'une masse moléculaire apparente de 47 kDa correspondant à SIPK phosphorylée et donc activée, est détectée dans les extraits de cellules WT et CL5 (Figure 15A). Une deuxième protéine d'une masse moléculaire d'environ 45 kDa est également détectée après 10 mn de traitement et correspond potentiellement à WIPK, une MAP kinase proche de SIPK (Zhang *et al*., 2000). L'activation des deux MAP kinases est maximale pendant environ 90 mn, puis décroît progressivement durant les 6 h de l'expérience. Toutefois, si les cinétiques d'activation sont comparables dans les deux lignées WT et CL5, l'activité globale des deux MAP kinases est plus importante dans les extraits de cellules CL5 que dans les extraits de cellules WT. Pour déterminer si cette augmentation apparente de l'activité est due à une activation plus intense de ces deux MAP kinases ou à une augmentation de la quantité de ces deux protéines dans le cytosol, nous avons détecté dans les mêmes extraits protéiques de cellules WT et CL5, les MAP kinases totales à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ERK 1/2 humaines. Les résultats présentés dans la Figure 15B montrent clairement que la quantité globale de SIPK et WIPK est similaire dans l'ensemble des échantillons. L'augmentation de l'activité des deux MAP kinases dans les

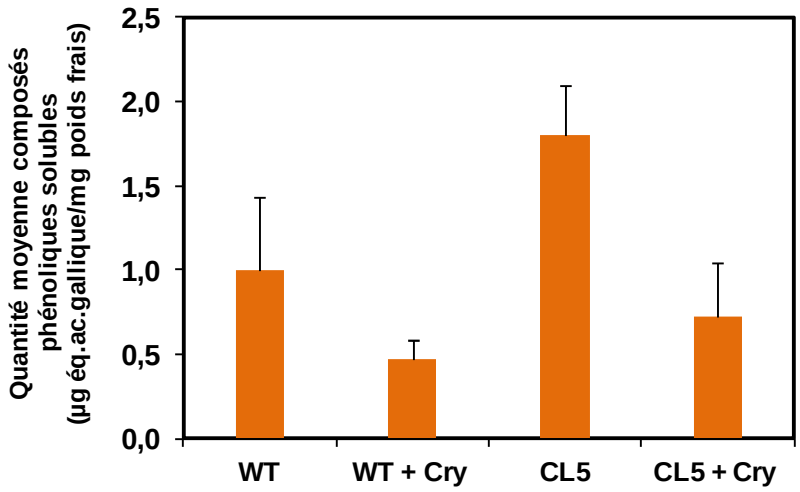


Figure 16 : Dosage des composés phénoliques solubles selon la méthode de Folin-Ciocalteu dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 traitées ou non par la cryptogéine. Les cellules de tabac sont traitées pendant 3 heures par 100 nM de cryptogéine ou par un volume équivalent d'eau, puis les composés phénoliques totaux sont extraits à l'aide d'éthanol à 80 %. La quantité moyenne en composés phénoliques solubles est évaluée par mesure de l'absorbance à 750 nm et par rapport à l'acide gallique défini comme standard. Les valeurs ± ESM (erreur sur la moyenne) sont représentatives de la moyenne de 3 expériences indépendantes.

extraits de cellules CL5 serait donc due à une augmentation de l'activation de ces deux PK. L'activité accrue de SIPK dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT pourrait donc expliquer, tout ou en partie, le taux de mort cellulaire plus élevé dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine. De plus, le fait que l'activité de SIPK ne soit pas détectable en absence de traitement par la cryptogéine est à rapprocher de l'absence de mort cellulaire spontanée dans les cellules CL5.

3.2.3. Accumulation de composés phénoliques dans les cellules CL5

Des études ont rapporté l'activation des voies métaboliques des composés de type phénylpropanoïdes durant la mort cellulaire de type RH des plantes et notamment chez *N. tabacum* en réponse au virus de la mosaïque du tabac (Tanguy & Martin, 1972 ; Nicholson & Hammerschmidt, 1992) ou à la cryptogéine (Amelot *et al.*, 2011). Nous avons donc recherché si l'élévation du taux de mort cellulaire dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine s'accompagnait ou non de variations dans l'accumulation des phénylpropanoïdes.

Pour cela, nous avons choisi de doser les composés phénoliques solubles avec le réactif de Folin-Ciocalteu dans les cellules WT et CL5 traitées ou non par la cryptogéine. La quantité moyenne de composés phénoliques solubles dans les cellules est évaluée par rapport à l'acide gallique, composé phénolique de référence majoritairement présent dans les plantes. En l'absence de traitement, la quantité moyenne de composés phénoliques solubles est environ deux fois plus élevée dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT : 1,8 contre 1 µg éq. acide gallique par mg de poids frais de cellule (Figure 16). Le traitement par la cryptogéine s'accompagne d'une diminution d'environ 50 % de la quantité moyenne de composés phénoliques solubles, à la fois dans les cellules WT et CL5. Ces observations suggèrent que NtHD2a/b pourraient être impliquées dans la régulation de l'accumulation des composés de type phénylpropanoïdes, ou du moins des composés phénoliques solubles, sans qu'il soit possible toutefois d'établir un lien avec l'induction de la mort cellulaire induite par la cryptogéine.

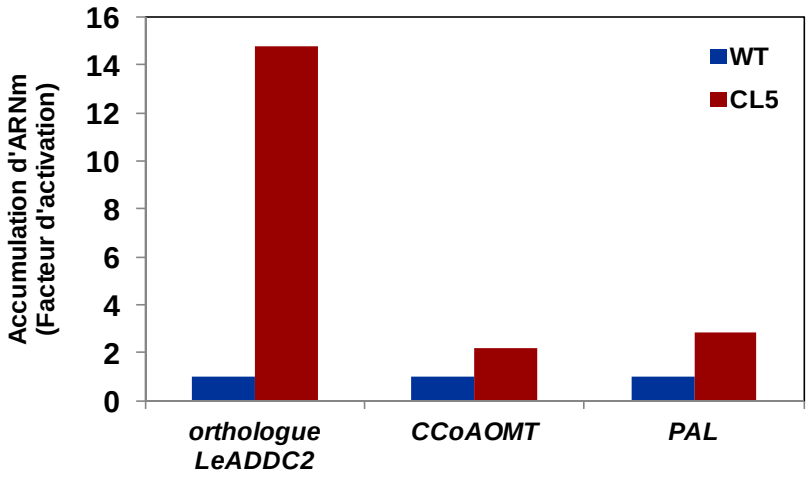


Figure 17 : Accumulation des transcrits de gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5. Les ARN sont extraits des cellules de tabac WT et CL5 non traitées. L'accumulation des transcrits du gène orthologue de *LeADDC2* (*Lycopersicon esculentum Aromatic Amino Acid decarboxylase 2*) et des gènes *CCoAOMT* (*caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase*) et *PAL* (*phenylalanine ammonia-lyase*) est analysée par RT-PCR quantitative. Après normalisation par le gène de référence *Elongation factor-1α* (EF-1α), les résultats sont exprimés selon le niveau d'expression par rapport aux cellules WT, en utilisant la méthode des Δ^{ct} (Livak & Schmittgen, 2001).

L'accumulation constitutive de composés phénoliques solubles dans les cellules CL5 pourrait avoir comme origine une modification de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Nous avons donc étudié l'accumulation des ARNm de trois gènes dont les produits sont impliqués dans cette voie métabolique dans les cellules de tabac :

1. Le gène *PAL* (*phénylalanine ammonia-lyase*) code une enzyme impliquée dans la première étape de la voie métabolique des phénylpropanoïdes, en catalysant la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique. De précédents travaux ont rapporté une forte accumulation du taux de transcrits du gène *PAL* dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine (Suty *et al.*, 1995 ; Lecourieux *et al.*, 2002).
2. Le gène *CCoAOMT* (*caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase*) code une enzyme catalysant la méthylation du caféoyl-coenzyme A dans le métabolisme des phénylpropanoïdes.
3. Un gène orthologue de *LeAADC2* (*Aromatic Amino Acid decarboxylase 2*, identifié chez la tomate) code une enzyme impliquée dans le métabolisme des composés phénoliques volatils (Tieman *et al.*, 2006) ; les transcrits de ce gène sont fortement accumulés dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine (Amelot *et al.*, 2011).

Les analyses par RT-PCR quantitative montrent une accumulation des transcrits du gène orthologue de *LeAADC2* d'un facteur 15 dans les cellules CL5 non traitées en comparaison avec les cellules WT (Figure 17). A l'inverse, l'accumulation des transcrits des gènes *PAL* et *CCoAOMT* est beaucoup moins importante, avec des facteurs d'accumulation respectifs de 2,5 et de 3. Ces résultats préliminaires ne permettent pas de conclure à une augmentation constitutive et significative de l'ensemble de la voie métabolique des phénylpropanoïdes. Les données de microarray actuellement en cours d'analyse au laboratoire pourraient apporter des précisions importantes à ce sujet. On ne peut pas exclure que cette augmentation de la teneur en composés phénoliques solubles soit due, tout ou en partie, à une redistribution des pools de composés phénoliques au sein de la cellule.

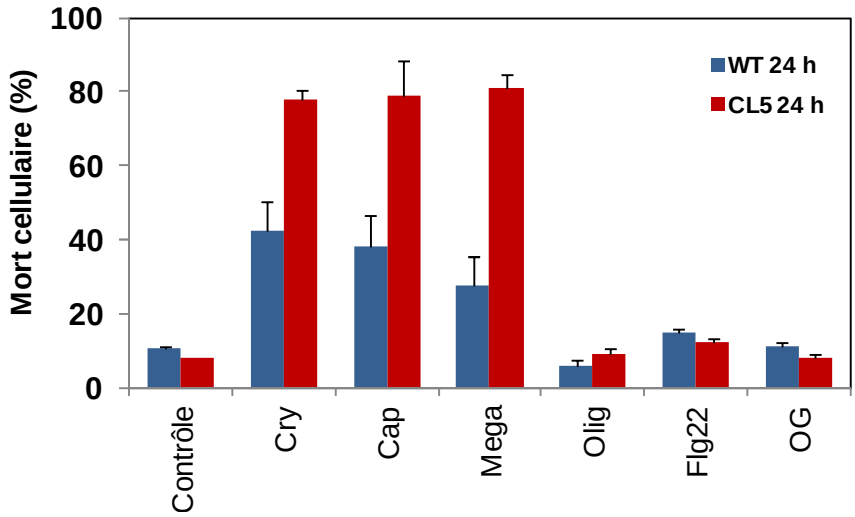


Figure 18 : Mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les suspensions cellulaires de tabac WT et CL5 en réponse au traitement par différents éliciteurs. Les cellules de tabac sont traitées par 100 nM de cryptogéine (Cry), capsicéine (Cap), mégaspermine (Mega) ou oligandrine (Olig), par 50 nM de flagelline (Flg22), ou par 100 µg.mL^{-1} d'oligogalacturonides (OG). Le taux de mort cellulaire est évalué par coloration des cellules au rouge neutre (0,01 %) après 24 heures de traitement. Les valeurs ± ESM (erreur sur la moyenne) sont représentatives de la moyenne de 3 expériences indépendantes.

3.3. NtHD2a/b sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite dans les cellules de tabac par les élicitines nécrosantes

Nos résultats démontrent clairement que NtHD2a/b sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac. Nous avons cherché à déterminer si ce constat était spécifique de la cryptogéine, ou si NtHD2a/b étaient des régulateurs plus généraux de la mort cellulaire en réponse à divers éliciteurs. Pour cela, nous avons utilisé différentes molécules connues pour induire des réactions de défense chez le tabac :

- La capsicéine (cap) et la mégaspermine (méga) qui appartiennent toutes deux à la famille des élicitines (comme la cryptogéine) induisent une RH lorsqu'elles sont appliquées sur des plants de tabac (Ricci *et al.*, 1989 ; Baillieul *et al.*, 1995).
- L'oligandrine (olig) qui est une élicitine conduisant au développement d'une RSA mais sans induire de RH (Lherminier *et al.*, 2003).
- Les OG, des éliciteurs polysaccharidiques, qui n'induisent pas de mort cellulaire chez le tabac bien qu'ils activent une cascade de signalisation cellulaire comparable à celle induite par la cryptogéine, à l'exception des variations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ (Lecourieux *et al.*, 2005).
- Flg22, un peptide de 22 acides aminés conservé de la flagelline bactérienne, qui a été également décrit comme un éliciteur n'induisant pas de RH chez le tabac (Lecourieux *et al.*, 2005).

Des suspensions cellulaires WT et CL5 ont donc été traitées par ces différents éliciteurs et le taux de mort cellulaire évalué après 24 h de traitement par la technique du rouge neutre. Avec les 3 élicitines dites « nécrosantes », le taux de mort cellulaire dans les suspensions cellulaires WT est compris entre 30 et 40 % alors qu'il dépasse 70 % dans les suspensions cellulaires CL5 (Figure 18). A l'opposé, l'oligandrine, qui est classée dans les « élicitines non nécrosantes » n'induit aucune mort cellulaire significative aussi bien dans les suspensions cellulaires WT que CL5. Ces premiers résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression de *NtHD2a/b* ne permet donc pas à un éliciteur qui n'induit pas de mort cellulaire dans les cellules sauvages, d'en induire lorsque NtHD2a/b ne peuvent jouer leur rôle de régulateurs négatifs de la mort cellulaire. De la même manière, aucune mort cellulaire significative n'est observée dans les

suspensions cellulaires WT et CL5 traitées par les deux autres éliciteurs non-nécrosants (OG et Flg22). Ces résultats confirment clairement que la ou les voie(s) de signalisation qui dépendent de NtHD2a/b ne sont impliquées que dans la régulation de l'intensité de la mort cellulaire. La voie de signalisation impliquée dans le déclenchement du processus de mort cellulaire pourrait donc être soit en amont de NtHD2a/b, soit complètement indépendante de NtHD2a/b.

3.4. Identification des protéines nucléaires cibles de NtHD2a/b

Lors de notre étude, nous avons montré qu'après 10 h de traitement par la cryptogéine le taux de messagers de *NtHD2a/b* est fortement réduit dans les cellules de tabac. Il en est de même pour les protéines NtHD2a/b qui ne sont plus détectables par western blot après 6 h de traitement environ (données non communiquées). NtHD2a/b ayant potentiellement une activité déacétylase, nous pouvons supposer que la disparition de NtHD2a/b, suite à traitement par la cryptogéine de cellules de tabac sauvage ou suite à l'approche d'interférence à ARN dans les cellules CL5, conduit à l'accumulation de protéines nucléaires « hyperacétylées » (Figure 8 de l'article). Ces protéines nucléaires qui ne sont probablement pas des histones, en raison de leur masse moléculaire apparente, pourraient potentiellement correspondre à des protéines de signalisation impliquées dans la mise en place des réactions de défense et notamment la mort cellulaire. A l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées, nous avons détecté un certain nombre de protéines nucléaires acétylées présentes à la fois dans les cellules WT traitées pendant 10 h par la cryptogéine mais également dans les cellules CL5 non traitées.
Sur la base de ces résultats, nous nous sommes proposé de mettre au point une stratégie de purification visant à terme à identifier des protéines nucléaires acétylées cibles de NtHD2a/b *via* des approches classiques de purification des protéines.

3.4.1. Enrichissement des protéines acétylées par chromatographie d'échanges d'anions

Un enrichissement en protéines acétylées sur colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q HP, Amersham Biosciences) a été réalisé à partir de 10 mg de protéines nucléaires. Les fractions retenues spécifiquement par la colonne ainsi que l'éluat ont été analysés par western blot à

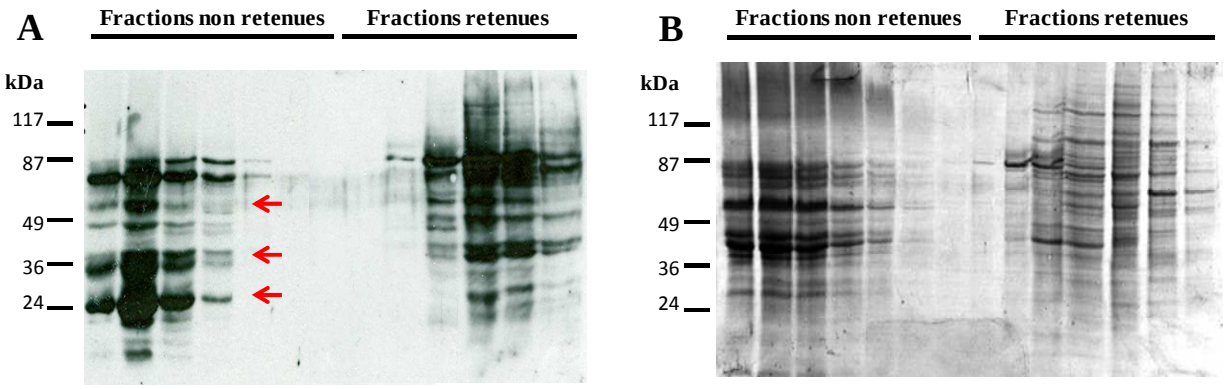


Figure 19 : Enrichissement en protéines nucléaires acétylées par chromatographie échangeuse d'anions. Des protéines nucléaires extraites à partir des cellules CL5 sont séparées sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrapQ, Amercham Biosciences) selon les paramètres définis dans le chapitre Matériels et Méthodes. **A,** Analyse du contenu protéique des fractions non retenues et retenues par la colonne par électrophorèse SDS-PAGE suivi d'un western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. Les flèches rouges indiquent les protéines acétylées d'intérêts. **B,** Analyse du contenu protéique des fractions non retenues et retenues par la colonne par électrophorèse SDS-PAGE et coloration du gel au nitrate d'argent.

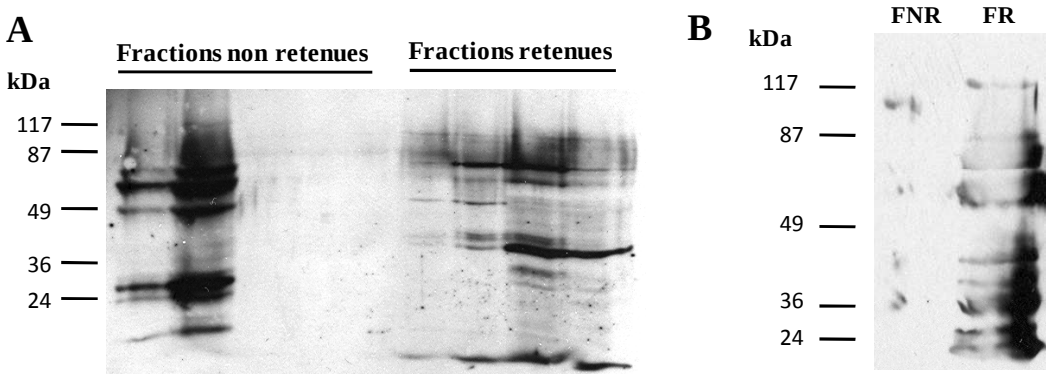


Figure 20 : Enrichissement en protéines nucléaires acétylées par chromatographie d'affinité. Les protéines nucléaires contenues dans les fractions non-retenues de la chromatographie d'échange d'anions ont été déposées sur une colonne d'affinité composée d'une matrice de Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) couplée à un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. **A,** Analyse du contenu protéique des fractions non-retenues et des fractions retenues par électrophorèse SDS-PAGE et coloration du gel au nitrate d'argent. **B,** Après avoir été rassemblées, les fractions non-retenues (FNR) et retenues (FR) sont analysées par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées.

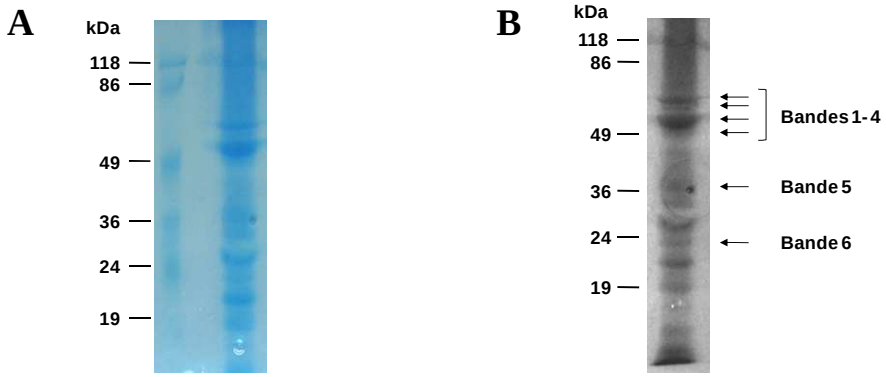


Figure 21 : Séparation de la fraction enrichie en protéines nucléaires acétylées par gel SDS-PAGE pour séquençage. La fraction enrichie en protéines nucléaires acétylées obtenue à partir de la colonne d'affinité, a été analysée par électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle. **A,** Coloration du gel d'électrophorèse SDS-PAGE au PageBlue™ (Protein Staining Solution, Thermo Scientific). **B,** Analyse de la fraction enrichie en protéines nucléaires acétylées par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. Les flèches à droite indiquent les six bandes protéiques qui seront prélevées pour analyse par spectrométrie de masse.

l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. Comme le montre la Figure 19A, à la valeur de pH 8,0 retenue pour effectuer la chromatographie d'échange d'anions, une grande majorité des protéines nucléaires acétylées n'est pas retenue par la colonne et constitue donc une première fraction enrichie. Lorsque ces mêmes fractions sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent, on peut noter d'un point de vue quantitatif qu'une majorité de protéines n'est pas retenue par la colonne (Figure 19B**)**. On peut donc en conclure que la majorité de ces protéines acétylées ont un pI plutôt basique ou que ces dernières appartiennent à des complexes protéiques globalement basiques.

3.4.2. Enrichissement des protéines acétylées par chromatographie d'affinité

Les fractions enrichies en protéines nucléaires acétylées obtenues au cours de la chromatographie échangeuse d'anions ont été rassemblées et les protéines concentrées par ultrafiltration. Cette fraction concentrée (soit environ 6 mg de protéines) a été déposée sur une colonne d'affinité composée d'une matrice de Sepharose 4 Fast Flow (Amersham, Biosciences) couplée à un anticorps dirigé contre les lysines acétylées (Sigma, A5463). Les fractions non retenues et retenues par la colonne ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE suivie d'une coloration au nitrate d'argent ; Figure 20A). Après avoir été rassemblées, les fractions non retenues (FNR) et retenues (FR) ont été analysées par western blot à l'aide de l'anticorps anti-lysines acétylées (Figure 20B). Comme le montrent les résultats de la Figure 20B, un certain nombre de protéines nucléaires sont retenues par la colonne et semblent correspondre à des protéines acétylées. La fraction enrichie en protéines nucléaires acétylées obtenue à partir de la colonne d'affinité a ensuite été séparée par électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle préparative suivie d'une analyse par coloration au Page Blue (PageBlue^{TM} Protein Staining Solution, Thermo Scientific ; Figure 21A) et par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées (Figure 21B). Parmi toutes ces protéines, nous avons indiqué par des flèches (Figure 21B) celles qui sont potentiellement « hyperacétylées » en réponse à la cryptogéine (nommées bande 1 à bande 6). Ces 6 bandes de gel ont été découpées et le contenu en protéines analysé par spectrométrie de masse LC MS/MS sur un

Bandes	Numéro d'accession	Description	Organisme	Peptide identifié	Point isolélectrique	Masse moléculaire (kDa)	Site potentiel d' acétylation (score ≥ 5)	
							Nombre de site	Score
B1	Q9C9C6	60S ribosomal protein L6	*Arabidopsis thaliana*	2	10.18	26	1	11.69
	A7QVS5	Chromosome chr7 scaffold_192, whole genome shotgun sequence	*Vitis vinifera*	1	8.86	106	1	11.83
B2	P93119	DNA topoisomerase 1	*Daucus carota*	8	9,43	90	1	20.64
	Q9LIH9	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 51	*Arabidopsis thaliana*	3	9,3	64	1	7,98
	Q9SI96	Histone H2B.3	*Arabidopsis thaliana*	2	10	16	3	16.69 12.19 16.16
	Q93YF5	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH1	*Nicotiana tabacum*	8	8,46	77	4	5.14 9.68 14.30 18,91
	Q9XEY6	Nt-iaa4.1 deduced protein	*Nicotiana tabacum*	1	8,82	24	0	
	P17786	Elongation factor 1-alpha	*Solanum lycopersicum*	2	9,19	49	0	
	Q9FJ79	DNA topoisomerase I	*Arabidopsis thaliana*	7	9,48	103	0	
B4	A5A393	Histone H1E	*Nicotiana tabacum*	1	11,04	20	3	**4.21** 13.54 19.35
	C0PDG6	Putative uncharacterized protein	*Zea mays*	1	9,22	75	0	
	O22582	Histone H2B	*Gossypium hirsutum*	2	10,08	16	1	16.80
	Q9LN13	Elongation factor 1-alpha	*Arabidopsis thaliana*	2	9,1	107	1	21.19
	Q6YS30	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 5	*Oryza sativa Japonica group*	4	9,03	56	3	8.79 12.96 18.73
	B9ST86	Dead box ATP-dependent RNA helicase, putative	*Ricinus communis*	3	9,22	70	0	
B5	Q40509	Histone H1	*Nicotiana tabacum*	1	10,6	30	1	**6.32**
	B7FLU4	Putative uncharacterized protein	*Medicago truncatula*	4	8,77	59	2	6.48 15.83
	A8JJQ6	Histone H2B	*Chlamydomonas reinhardtii*	1	9,85	16	2	11.77 7.25
	Q25C91	Tobacco fibrillarin homolog	*Nicotiana tabacum*	4	10,14	33	0	
B6	A5AJM2	Putative uncharacterized protein	*Vitis vinifera*	1	8,52	71	2	15.59 13.66
	Q9ST30	Histone H2A	*Solanum melongena*	2	10,69	29	2	9.86 13.44
	Q8LA80	Putative uncharacterized protein	*Arabidopsis thaliana*	1	7,12	34	0	
	B7FLU4	Putative uncharacterized protein	*Medicago truncatula*	3	8,81	74	2	6.48 15.83
	A8JJQ6	Histone H2B	*Chlamydomonas reinhardtii*	2	9,85	16	2	11.77 7.25
	A7PKZ8	Chromosome chr7 scaffold_20, whole genome shotgun sequence	*Vitis vinifera*	1	8,14	117	3	16.61 10.32 13.11
	Q9LUG5	Brix domain-containing protein 1 homolog	*Arabidopsis thaliana*	1	9,74	36	0	

Tableau 7 : Résultats des analyses de spectrométrie de masse. Les protéines identifiées pour chaque bande sur le gel d'électrophorèse préparatif (B1 à B6) sont annotées par numéro d'accession, nombre de peptides identifiés, masse moléculaire, point isoélectrique. Les banques de données interrogées pour l'identification sont celles de SpTRembl restreinte au règne « *Viridiplantae* » ainsi que Sol Genomic Network restreinte aux unigènes de tomate et de tabac. Les sites potentiels d'acétylation (avec un score minimum de 5) au niveau des résidus lysines des protéines identifiées ont été obtenus par analyse bioinformatique à l'aide de l'outil PAIL (Prediction of Acetylated on Internal Lysines). Les scores de référence des sites potentiels d'acétylation des histones figurent en gras.

appareil de type OrbiTrap^{TM} (Thermo Electron) par le Dr. M. Rossignol (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse).

3.4.3. Identification des protéines nucléaires acétylées par spectrométrie de masse LC MS/MS

Après digestion trypsique des protéines contenues dans les 6 bandes de gel découpées et séquençage des peptides obtenus, une analyse à l'aide du logiciel MASCOT a permis d'identifier 24 protéines prédites comme étant nucléaires à partir d'un ou plusieurs de leurs peptides (Tableau 7, Annexe 2). Nous avons, dans cette première analyse, volontairement fait le choix de ne pas tenir compte des protéines prédites comme cytosoliques ou localisées dans d'autres compartiments subcellulaires.

Les analyses des données de spectrométrie de masse n'ont pas permis de mettre en évidence de groupements acétyles au niveau des peptides séquencés. Nous avons alors entrepris une analyse bioinformatique à l'aide de l'outil PAIL (Prediction of Acetylation on Internal Lysines ; http://bdmpail.biocuckoo.org) afin de déterminer si les protéines nucléaires identifiées contenaient ou non des sites potentiels d'acétylation. Pour cela nous avons dû définir arbitrairement un score d'acétylation que l'on peut qualifier de « significatif ». Nous avons donc tout d'abord analysé les scores obtenus pour les différentes histones identifiées par spectrométrie de masse, ces protéines pouvant servir de bons marqueurs d'acétylation. Les scores de prédiction des sites potentiels d'acétylation obtenus ont des valeurs comprises entre 4,21 et 19,35. Sur la base des deux plus faibles scores de prédiction, à savoir 4,21 et 6,32 obtenus respectivement pour les histones H1E et H1 (voir Tableau 7, annotés en gras), nous avons fixé arbitrairement comme significatif un score minimum de 5 comme référence pour l'analyse des sites potentiels d'acétylation des autres protéines nucléaires identifiées. Ainsi, sur les 24 protéines nucléaires initiales, 18 contiennent, selon nos critères, des sites potentiels d'acétylation.

Si les 18 protéines retenues présentent bien un pI théorique basique (ce qui était attendu compte tenu des conditions de chromatographie d'échange d'anions utilisées), seul un nombre restreint d'entre elles ont une masse moléculaire théorique en accord avec la masse moléculaire

apparente estimée par électrophorèse SDS-PAGE. On ne peut toutefois pas exclure, pour les protéines qui ont une masse moléculaire théorique bien supérieure à celle estimée sur le gel d'électrophorèse, qu'il s'agisse de produits de protéolyse, malgré toutes les précautions prises au cours de l'extraction et de la purification.

Parmi les protéines pouvant constituer une cible potentielle de NtHD2a/b, l'homologue de la « DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 5 » identifiée chez *Oryza sativa*, et qui présente 3 sites potentiels d'acétylation, a retenu notre attention. En effet la « DEAD-box RNA helicase » est impliquée dans la résistance à des stress biotiques et abiotiques chez *O. sativa* et *A. thaliana* (Kant *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008). De manière intéressante, des orthologues de cette ARN hélicase dans les cellules humaines ont été caractérisés comme interagissant avec les histones déacétylases humaines HDAC 1, 2 et 3. Récemment, une première description de régulation des ARN hélicases par acétylation a été rapportée par Mooney *et al.* (2010), qui ont montré que le blocage des sites d'acétylation des ARN hélicases humaines conduit à la diminution voire la suppression de leur interaction avec les HDAC 1 et HDAC 2. Ils suggèrent ainsi que les ARN hélicases constituent des protéines cibles potentielles des HDAC. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que la déacétylation de ces RNA hélicases était corrélée au développement de l'apoptose. L'ensemble de ces données suggère que cette protéine pourrait constituer une cible importante de NtHD2a/b, dans l'hypothèse où son acétylation en réponse à la cryptogéine serait confirmée par d'autres analyses.

Une deuxième protéine du Tableau 7 pourrait constituer une cible intéressante de NtHD2a/b : l'histone-lysine N-méthyltransférase. En effet les travaux de Palma *et al.* (2010) suggèrent que chez *A. thaliana* la protéine LAZ2, qui code une histone-lysine méthyltransférase, est impliquée dans la mise en place des réactions de défense. De manière intéressante, les travaux de Zhou *et al.* (2008) ont pour leur part identifié l'histone méthyltransférase humaine DNMT1 : son expression est réprimée lors de l'inhibition de l'activité de HDAC 1 au sein de cellules cancéreuses humaines, suggérant l'implication des activités HDAC dans la régulation des histones méthyltransférases. Cependant à notre connaissance aucune régulation de cette famille d'enzymes par acétylation n'a été rapportée à ce jour.

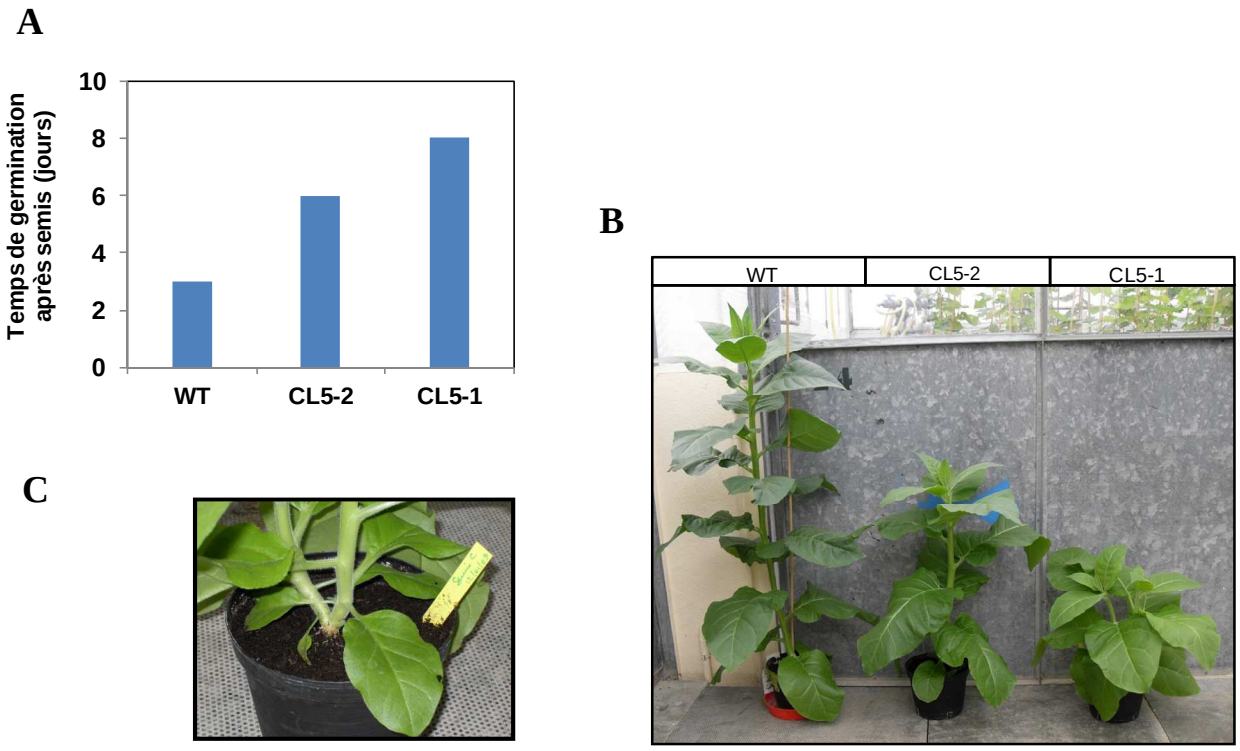


Figure 22 : Modifications phéntotypiques des plants de tabac liées à l'extinction de l'expression de *NtHD2a/b*. A, influence sur la vitesse de germination. **B,** croissance des plants de tabac âgés de 12 semaines. **C,** croissance d'un plant de tabac CL5 âgé de 12 semaines**.** Pour l'ensemble de ces observations, des plants de tabac WT ainsi que deux lignées de plants CL5 invalidées pour l'expression de *NtHD2a/b* et nommées CL5-1 et CL5-2 ont été semés et cultivés dans les mêmes conditions.

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe suggère que la méthodologie développée pour purifier et identifier des protéines nucléaires acétylées qui sont potentiellement les cibles de NtHD2a/b est adaptée à notre problématique. Toutefois ces résultats préliminaires doivent être validés par de nouvelles expériences de purification / séquençage / identification. De plus, il sera nécessaire d'intégrer à la démarche une approche « quantitative », c'est-à-dire de s'assurer que les protéines identifiées sont bien hyperacétylées en réponse à la cryptogéine, et pas seulement par exemple transloquées depuis le cytosol puis accumulées dans le noyau.

3.5. NtHD2a/b et le développement des plants de tabac CL5

Les résultats décrits dans les paragraphes précédents démontrent sans ambiguïté le rôle majeur joué par NtHD2a/b dans le contrôle de la mort cellulaire. L'acétylation étant une PTM majeure des protéines, il est raisonnable de penser que l'inhibition de l'expression de NtHD2a/b modifie d'autres paramètres physiologiques de la plante, et en premier lieu certaines phases du développement. En effet, un certain nombre de travaux ont rapporté l'implication de différentes HDAC dans des étapes précises de développement chez les plantes telles que le développement des ovules et des graines où par exemple les HDAC régulent négativement la transcription de gènes d'ARN ribosomaux au cours du développement de la graine chez *A. thaliana* (Wu *et al.*, 2000 ; Earley *et al.*, 2006 ; Chen et Tian**,** 2007).

Nous avons donc entrepris, en parallèle avec les travaux précédents, de suivre le développement de deux lignées de plants de tabac invalidés pour l'expression de NtHD2a/b, nommées CL5-1 et CL5-2. L'ensemble des observations effectuées, bien que préliminaires, est détaillé dans la figure 22 :

- Dans un premier temps, nous avons pu constater un fort ralentissement de la vitesse de germination des graines des plants CL5 par rapport à celle des graines WT. Ce ralentissement est observable à la fois pour des graines semées *in vitro* sur un milieu de Hoagland ou pour des graines semées directement dans un terreau classique. Nous avons en effet observé dans les deux conditions de culture que le temps de germination des plants WT, CL5-2 et CL5-1 était de respectivement 3, 6 et 8 jours après semis (Figure 22A).

- Nous avons également observé de manière générale un ralentissement global du développement des plants CL5 par rapport aux plants sauvages. A titre d'illustration, les trois plants de tabac de la Figure 22B montrent clairement le développement ralenti des tabacs CL5. Les trois plants présentés ont été semés à la même date et cultivés dans les mêmes conditions.
- Enfin, mais de manière non reproductible, certains plants CL5 possèdent un phénotype particulier dans le sens où, dès le développement des premières feuilles, deux tiges vont se développer simultanément, au dessus de l'épicotyle (Figure 22C).

L'ensemble de ces observations suggère que NtHD2a/b, en plus de leur rôle majeur dans le contrôle de la mort cellulaire, sont également impliquées dans la modulation de certaines phases du développement de la plante.

4. Discussion

4.1. NtHD2a/b sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine et d'autres élicitines nécrosantes dans les cellules de tabac

La mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac s'accompagne d'un certain nombre d'événements de signalisation, dont la régulation d'activités enzymatiques telles que des activités PK (Lebrun-Garcia *et al.*, 1998 ; Dahan *et al.*, 2009) ou l'activité d'une NADPH oxydase (Pugin *et al.*, 1997 ; Lherminier *et al.*, 2009). Cette mort cellulaire s'accompagne aussi de la régulation d'un certain nombre de canaux localisés sur la membrane plasmique, tels que des canaux perméables au Ca^{2+} (Tavernier *et al.*, 1995) ou aux anions (Wendehenne *et al.*, 2002). Les MPT, dont la (dé)phosphorylation, jouent un rôle central dans la modulation des fonctions et des propriétés des protéines nécessaires à la transduction du signal après perception de la cryptogéine. Des analyses protéomiques réalisées dans le cadre de notre étude ont révélé qu'une vingtaine de protéines nucléaires sont rapidement phosphorylées en réponse à la cryptogéine chez le tabac. Parmi celles-ci figurent deux isoformes redondantes d'HDAC de type 2 nommés NtHD2a et NtHD2b, présentant plus de 96 % d'identité de séquences. La phosphorylation de HDAC a été relatée par un certain nombre d'études, notamment dans le règne animal (Segré & Chiocca, 2011 ; Monteiro & Cano, 2011). Citons également les travaux de Zheng *et al.* (2011) qui ont mis en évidence que les mécanismes sous-jacents à la prolifération anormale des cellules musculaires lisses vasculaires résulteraient de la phosphorylation de HDAC2 et de la déacétylation du répresseur transcriptionnel Klf5 (*Krüppel-like factor 5*) aboutissant à l'expression du gène *p21*, primordial dans l'arrêt de la croissance cellulaire.

Un faisceau de résultats converge vers l'implication de NtHD2a/b dans le contrôle de l'intensité de la mort cellulaire induite par la cryptogéine. En effet, bien que fortement accumulés dans les différents organes des plants de tabac (racines, tiges, feuilles ou fleurs), les transcrits de *NtHD2a/b* sont en revanche très faiblement accumulés dans les feuilles

sénescentes, suggérant un lien potentiel entre l'expression de *NtHD2a/b* et le processus de mort (Blanc, 2008). Les profils d'accumulation des transcrits de *NtHD2a/b* dans les cellules de tabac ont de plus révélé une accumulation fortement réprimée après 12 h de traitement par la cryptogéine, alors qu'une exposition des cellules de tabac aux OG, qui n'induisent pas de mort cellulaire, n'affecte pas l'expression de *NtHD2a/b*. Rappelons que les OG sont des éliciteurs capables d'induire qualitativement les mêmes événements de signalisation que la cryptogéine dans les cellules de tabac, hormis des variations de la concentration en Ca^{2+} libre nucléaire (Lecourieux *et al.*, 2005 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Après plusieurs heures de traitement par la cryptogéine, la très forte diminution du taux de transcrits de *NtHD2a/b* est corrélée à une forte diminution de la quantité des protéines NtHD2a/b dans les cellules de tabac. Pour tester l'implication potentielle de NtHD2a/b dans la mort cellulaire induite par la cryptogéine, nous avons tout d'abord développé une approche de pharmacologie visant à évaluer, sur la mort cellulaire induite par la cryptogéine, l'incidence de trois inhibiteurs d'activité HDAC (l'apicidine, la trichostatine A et le butyrate de sodium ou ButNa). Ces trois inhibiteurs sont de classes chimiques différentes, ce qui permet *à priori* de limiter l'impact d'effets non spécifiques (Peixoto & Lansiaux, 2006). Bien que leurs propriétés vis-à-vis des HDAC végétales ne soient pas connues à ce jour, un certain nombre de travaux relatent leur utilisation dans le cadre de l'étude de modèles végétaux (Chua *et al.*, 2003 ; Fukaki *et al.*, 2006). Nous avons montré qu'un prétraitement des cellules de tabac avec ces différents inhibiteurs ne modifie pas significativement un certain nombre d'événements de signalisation induits par la cryptogéine (production de H_2O_2, activation de MAPK…). Cependant, il s'avère qu'un prétraitement de plants de tabac avec l'un ou l'autre de ces trois inhibiteurs conduit à une intensité accrue de la RH induite par la cryptogéine au niveau des feuilles de tabac et de la mort cellulaire plus intense dans les suspensions cellulaires en réponse à la cryptogéine, comprise entre 50 % et 90 %. L'ensemble de ces résultats obtenus avec trois inhibiteurs de HDAC de familles chimiques différentes, suggère fortement que NtHD2a/b contrôlent négativement la mort cellulaire induite par la cryptogéine.

Nous avons cherché à confirmer ces premiers résultats en étudiant l'impact de l'extinction de l'expression de *NtHD2a/b* dans les cellules de tabac par une approche d'interférence à ARN, ceci de manière transitoire ou stable (lignée CL5). L'extinction de l'expression de *NtHD2a/b*

conduit également à des nécroses foliaires plus intenses mais aussi à une mort cellulaire plus prononcée en réponse à la cryptogéine. Ces résultats liés à l'inhibition de l'expression de *NtHD2a/b* confirment donc ceux obtenus avec les inhibiteurs. De manière à prouver sans ambiguïté que NtHD2a/b sont bien des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, nous avons entrepris de surexprimer de manière transitoire *NtHD2a* dans des feuilles de tabac. Comme il est rapporté dans l'article publié dans New Phytologist, la surexpression de *NtHD2a* conduit bien à une forte diminution des nécroses développées en réponse à la cryptogéine, confirmant de manière formelle que NtHD2a/b sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine. L'ensemble de ces travaux démontre donc pour la première fois un rôle de régulateur négatif de la mort cellulaire pour les HD2. Le rôle de répresseur d'un processus de mort cellulaire a déjà été rapporté pour des HDAC animales. Par exemple SIRT1, une HDAC de classe II, est associée à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'apoptose des cellules cancéreuses de colon lorsque son expression est réprimée (Stunkel *et al.*, 2007).

Après avoir mis en évidence le rôle de NtHD2a/b en tant que régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, nous avons cherché à déterminer si NtHD2a/b ne constitueraient finalement pas des régulateurs généraux de la mort cellulaire en réponse à divers éliciteurs. Nous avons pour cela utilisé d'autres protéines de la famille des élicitines, telles que la capsicéine et la mégaspermine qui sont connues pour induire également une RH sur des plants de tabac, ainsi que des éliciteurs qui n'induisent pas de RH chez le tabac comme l'oligandrine, les OG ou la flagelline. Tout comme dans le cas de la cryptogéine, la mort cellulaire induite par la capsicéine et la mégaspermine est plus intense dans les cellules CL5 invalidées pour l'expression de *NtHD2a/b*, suggérant que ces dernières exerceraient un rôle plus général de régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par les élicitines. En revanche, les autres éliciteurs utilisés (oligandrine, OG, flagelline) n'induisent pas de mort cellulaire significative, aussi bien dans les cellules de tabac WT que dans les cellules CL5, confirmant l'hypothèse que NtHD2a/b sont bien impliquées dans la régulation de l'intensité de la mort cellulaire induite, mais en aucun cas dans son déclenchement. Il serait intéressant d'étudier l'implication potentielle de NtHD2a/b dans le contrôle de la mort cellulaire induite par d'autres éliciteurs nécrosants chez le tabac, tels que l'harpine ou les NLP (pour *Necrosis*

like proteins ; Gijzen & Nurnberger, 2006) pour déterminer si le contrôle exercé par NtHD2a/b est généralisable à l'ensemble des éliciteurs nécrosants, ou au contraire si cela est spécifiquement lié au mode d'action des élicitines.

4.2. La néosynthèse de protéines et l'activation accrue des MAPK semblent impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire induit par NtHD2a/b

Gauthier *et al.* (2007) ont démontré au laboratoire l'importance de la néosynthèse des protéines dans l'induction de la mort des cellules de tabac en réponse à la cryptogéine. En effet, l'inhibition de la traduction par le cycloheximide (CHX) conduit à une forte diminution de la mort cellulaire induite par la cryptogéine. Ce processus de néosynthèse des protéines est à rapprocher de l'accumulation importante d'ARNm d'un certain nombre de gènes notamment associés à la défense dans les cellules de tabac WT traitées par la cryptogéine ; parmi ces gènes, certains doivent donc coder des protéines fondamentales dans le processus de mort cellulaire. Comme nous l'avons montré de manière très ciblée par RT-PCR quantitative, les cellules de tabac invalidées pour l'expression de *NtHD2a/b* accumulent de manière constitutive les ARNm d'un certain nombre de gènes de défense, dont certains sont également accumulés en réponse à la cryptogéine dans les cellules WT. Un prétraitement des cellules avec le CHX s'accompagne d'une mort cellulaire réduite d'environ 90 % dans les cellules CL5 après 24 h de traitement par la cryptogéine. Ce résultat confirme bien l'importance du processus de néosynthèse des protéines dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans la lignée cellulaire CL5, tout en suggérant que l'induction du processus de mort cellulaire est bien un pré-requis pour le contrôle exercé par NtHD2a/b.

Il a précédemment été démontré chez le tabac que l'activation de la MAPK nommée SIPK est corrélée à l'induction de la mort cellulaire par la cryptogéine (Zhang & Klessig, 1998 ; Zhang & Klessig, 2001 ; Lebrun-Garcia *et al.*, 2002). Le rôle des MAPK cytosoliques SIPK et WIPK dans les réponses de défense a été relaté par un certain nombre de travaux. Ainsi Zhang *et al.* (2000) ont rapporté que la stauropsorine et le K-252a, deux inhibiteurs de sérine/thréonine kinases, conduisent à l'inactivation de WIPK qui s'accompagne de la suppression de la mort

cellulaire, suggérant que WIPK est impliquée dans le développement de la mort cellulaire de type RH chez le tabac en réponse à des élicitines. Un rôle similaire à été proposé pour SIPK, sur la base de la surexpression de NtMEK2 (*Nicotiana tabacum* MEK), une MAPK kinase (MKK) qui catalyse la phosphorylation et donc l'activation de différentes MAPK telle que SIPK, se traduisant par le développement de nécroses spontanées chez des plants de tabac. La modulation de l'activité cytosolique de SIPK résulterait plus de l'induction de MPT que d'une accumulation de la protéine. Nous avons donc recherché une potentielle corrélation entre l'élévation du taux de mort cellulaire dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine et une activité accrue de SIPK. Bien que les cinétiques d'activation de SIPK soient comparables dans les cellules WT et CL5 traitées par la cryptogéine pendant 6 h, l'activité cytosolique globale de SIPK est en revanche plus intense dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT, suggérant une « suractivité » de SIPK dans les cellules CL5. Ce constat est également valable pour une autre MAPK d'une masse moléculaire d'environ 45 kDa qui correspondrait potentiellement à WIPK (Zhang *et al.*, 2000). L'absence d'activité de SIPK détectée dans les cellules CL5 non traitées, ne présentant pas de mort cellulaire spontanée, est en accord avec le lien potentiel entre l'activité de SIPK et l'induction du processus de mort cellulaire en réponse à la cryptogéine. Comment expliquer cette augmentation globale de l'activité de SIPK dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine ?

Un certain nombre d'arguments convergent vers un mode de régulation de l'activité PK par MPT. En effet, dans un premier temps nous n'avons tout d'abord pas détecté, par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre SIPK, de différences significatives de la quantité globale de SIPK dans les extraits cytosoliques de cellules WT et CL5. Par ailleurs, l'accumulation des transcrits de SIPK est constante dans les cellules de tabac : elle ne varie pas quel que soit le stress appliqué (dont notamment certains éliciteurs) et conduit à une activation de SIPK (Zhang *et al.* 1998 ; Zhang & Klessig, 1998). Enfin, Dahan *et al.* (2009) ont montré qu'un prétraitement par le CHX n'avait aucun effet sur l'activation de SIPK, au niveau cytosolique mais également nucléaire, suggérant que la synthèse *de novo* de SIPK n'était pas la raison de son activation. La présence de SIPK dans le compartiment nucléaire des cellules végétales a notamment été rapportée par Takahashi *et al.* (2007) *via* l'obtention d'une protéine de fusion constituée de NbSIPK (orthologue de SIPK chez *N. benthamiana*) couplée à la GFP, qui

s'avère localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules de tabac en l'absence de tout stimulus. Dahan *et al.* (2009) ont par ailleurs mis en évidence que l'activation nucléaire de SIPK au niveau du noyau pouvait être corrélée avec la mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac. Il conviendra d'étudier plus en détail l'activité de SIPK au niveau d'extraits nucléaires des cellules de tabac CL5 en réponse à la cryptogéine. Sur la base de l'ensemble de ces résultats et des données bibliographiques, nous ne pouvons donc pas exclure que NtHD2a/b contribuent à la modulation de l'expression de gènes codant des enzymes telles que NtMEK2 impliquées dans la régulation de l'activité de SIPK. Toutefois sur la base d'une absence de mort spontanée des cellules de tabac CL5, cette hypothèse implique l'intervention d'autres acteurs moléculaires, non caractérisés à ce jour, qui seraient à l'origine du déclenchement de cette cascade d'activation enzymatique en réponse à la cryptogéine. Une PK proche de SIPK, Ntf4, a également été caractérisée chez le tabac comme pouvant être activée parallèlement à SIPK en réponse à la cryptogéine (Wilson *et al.*, 1995 ; Ren *et al.*, 2006). Il est donc envisageable que Ntf4 puisse également intervenir dans notre modèle.

4.3. Le NO et le H_2O_2 ne sont pas des événements majeurs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez les cellules de tabac

Plusieurs études ont montré chez le tabac que la cascade de signalisation induite par la cryptogéine comprend également la production de H_2O_2 et de NO (Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Lamotte *et al.*, 2004).

Il a précédemment été établi, toujours chez le tabac, que la NADPH oxydase codée par le gène *NtRbohD* est impliquée dans la production de H_2O_2 en réponse à la cryptogéine (Simon-Plas *et al.*, 2002). La production de H_2O_2 induite par la cryptogéine est abolie dans les cellules de tabac exprimant une construction antisens de *NtRbohD*, mais également par le DPI, un inhibiteur des enzymes NADPH oxydases (Pugin *et al.*, 1997 ; Simon-Plas *et al.*, 2002). L'implication de la production de H_2O_2 dans la mort cellulaire induite par la cryptogéine n'est pas toujours un sujet consensuel entre les équipes (Montillet *et al.*, 2005 ; Lherminier *et al.*, 2009). Nous avons donc voulu déterminer si la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine

était similaire dans les cellules de tabac CL5 et WT, et si cette production était également dépendante ou non d'une NADPH oxydase. Nous avons observé que le traitement des cellules de tabac par la cryptogéine se traduit par une production de H_2O_2 similaire dans les cellules WT et CL5, production qui est complètement abolie par un prétraitement des cellules par le DPI. Bien que l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* ne semble pas affecter quantitativement la production de H_2O_2 induite par la cryptogéine, nous avons étudié la potentielle implication du H_2O_2 dans le processus de mort cellulaire en réponse à la cryptogéine. Il s'avère qu'un prétraitement par le DPI ne modifie pas significativement le taux de mort cellulaire induit par la cryptogéine dans les cellules de tabac WT et CL5. La production de H_2O_2 n'est donc pas, dans nos conditions, un événement qui contrôle la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez le tabac. Cependant l'importance de la production de H_2O_2 dans l'établissement de la RH ou de la mort cellulaire déclenchée par certains microorganismes ou éliciteurs semble controversée à ce jour et pourrait dépendre du pathosystème. En effet, des plants de *N. benthamiana* invalidés pour l'expression des gènes *NbRbohA* ou *NbRbohB* deviennent susceptibles à une souche avirulente de *P. infestans* avec une RH réduite (Yoshioka *et al.*, 2003). En revanche, Lherminier *et al.* (2009) ont mis en évidence chez *N. tabacum* que la production de H_2O_2 dépendante de NtRbohD en réponse à la cryptogéine sur des suspensions cellulaires ne semble pas déterminante pour l'établissement de la RH. Torres *et al.* (2002) ont quant à eux proposé que RbohD et RbohF exerceraient des fonctions différentes dans la régulation de la RH chez *A. thaliana*, étant donné que le mutant *AtRbohF* présente une RH plus développée en réponse à *H. arabidospidis* que le mutant *AtRbohD*.

Lamotte *et al.* (2004) ont mis en évidence une production de NO en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac. Dans notre étude, nous avons constaté que si la cinétique d'accumulation de NO induite par la cryptogéine était similaire dans les cellules de tabac WT et CL5, cette accumulation était en revanche réduite de moitié dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT. Cependant cette différence d'accumulation de NO ne constitue pas un événement majeur dans le processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine. En effet, comme il a été précédemment montré par Lamotte *et al.* (2004), un prétraitement des cellules

de tabac WT et CL5 par le cPTIO, un piégeur de NO, s'accompagne d'une diminution de la mort cellulaire induite par la cryptogéine restant inférieure à 25 %.

Afin de déterminer si la moindre accumulation de NO observée dans les cellules CL5 en réponse à la cryptogéine était potentiellement liée ou non à la dérégulation de l'état d'acétylation de protéines impliquées dans la synthèse et / ou la régulation de l'accumulation du NO, nous avons évalué la production de NO induite par la cryptogéine dans les cellules WT prétraitées par le ButNa. En réponse à la cryptogéine, la réduction de l'accumulation du NO dans les cellules WT est corrélée à la durée de prétraitement des cellules au ButNa, l'accumulation étant similaire dans les cellules CL5 et des cellules WT prétraitées pendant 4 h par le ButNa. Ces résultats sont à rapprocher des travaux de Li *et al.* (2004) qui ont montré que le ButNa inhibait l'expression d'une protéine NOS inductible dans des cellules de carcinomes du colon, ce qui s'accompagne d'une diminution de l'accumulation de NO. Gan *et al.* (2005) ont, pour leur part, mis en évidence qu'un prétraitement de cellules animales non endothéliales par le ButNa conduisait à l'expression de la NOS endothéliale.

Pour expliquer cette différence d'accumulation du NO dans les cellules de tabac invalidées pour l'expression de *NtHD2a/b*, nous pouvons nous rapprocher des travaux de Mattagajasingh *et al.* (2007) qui ont révélé le rôle fondamental de SIRT1 (une HDAC de classe II, voir § 2.1.5 de l'Introduction) dans la vasodilatation de l'endothélium chez l'homme par régulation de la production endothéliale de NO. En effet, au niveau des cellules endothéliales aortiques du rat ou de l'endothélium des veines ombilicales humaines, SIRT1 stimulerait l'activité de la NOS endothéliale par déacétylation, induisant une augmentation de la production de NO au niveau de l'endothélium. Au vu de ces données, une explication possible pourrait être liée au fait que les HDAC portent plus une activité générale de lysine déacétylase qu'une activité histone déacétylase *sensus stricto*. Il est donc fort possible que NtHD2a/b soient capables de réguler par déacétylation l'activité de protéines qui ne sont pas des histones et qui seraient impliquées dans l'accumulation du NO.

Un autre mécanisme liant les HDAC au NO a été rapporté par Colussi *et al.* (2008) qui ont montré que la régulation de l'activité de HDAC2 (classe I des HDAC, voir § 2.1.5 de l'Introduction) est NO-dépendante et constituerait une nouvelle approche pharmacologique dans le cadre du traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Cette équipe a démontré

que la forte activité de HDAC2 au sein des cellules musculaires dystrophiées peut être régulée par S-nitrosylation. Sur la base de ces observations, nous pourrions également émettre l'hypothèse que l'accumulation du NO induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac participe à la modulation de l'activité de HDAC telles que NtHD2a/b par le biais de MPT. Toutefois, aucun événement de S-nitrosylation de HDAC chez les plantes n'a été relaté à ce jour. Il est à noter que des travaux relatifs à l'identification de protéines S-nitrosylées par le NO chez le tabac sont actuellement menés au sein du laboratoire, et qu'il est envisageable par exemple soit de tester *in vitro* la possible S-nitrosylation de protéines NtHD2a/b recombinantes, soit d'appliquer la technique de « biotin-switch » sur des extraits de protéines nucléaires pour vérifier si cette S-nitrosylation correspondrait à une réalité physiologique.

Toutefois la diminution de l'accumulation de NO dans les cellules CL5 a été estimée par la fluorescence du DAF, pour lequel de nombreux problèmes de spécificité ont déjà été rapportés (Mur *et al.*, 2011). Pour déterminer si cette diminution avait une réelle signification, un événement NO-dépendant devrait être au moins partiellement inhibé dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT. Parmi ces événements NO-dépendants dans les cellules de tabac figure entre autres la régulation de la PK NtOSAK. Lamotte *et al.* (2006) ont montré la régulation de l'activation d'une PK assimilée à NtOSAK par le NO produit lorsque les suspensions cellulaires de *N. plumbaginifolia* sont soumises à un choc hyperosmotique. De manière intéressante, les différents stress étudiés (salin, hyperosmotique, cadmium) et conduisant à l'activation de NtOSAK ont été caractérisés comme étant tous à l'origine d'une production de NO (Gould *et al.*, 2003 ; Besson-Bard *et al.*, 2008 ; Besson-Bard *et al.*, 2009). Wawer *et al.* (2010) ont récemment mis en évidence que l'activation de NtOSAK dans les suspensions cellulaires de tabac par un stress salin est dépendante, au moins partiellement, du NO en promouvant indirectement la phosphorylation d'au moins un résidu sérine (Ser 158) localisé dans la boucle d'activation de NtOSAK. Dans notre étude, il s'avère qu'un choc hyperosmotique provoqué par l'ajout de 250 mM de sorbitol s'accompagne d'une activation réduite de NtOSAK dans les cellules CL5 par rapport aux cellules WT, allant dans le sens d'une moindre accumulation de NO et la modulation des événements NO-dépendants lors de l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b*.

4.4. NtHD2a/b seraient plus généralement des lysines déacétylases participant à des processus de défense et de développement chez le tabac

Il est unanimement admis que l'acétylation et la déacétylation sont des MPT qui ont pour cibles un grand nombre d'histones impliquées dans la régulation de la structure et la dynamique de la chromatine, concourant ainsi à la régulation de l'expression spécifique d'un certain nombre de gènes. Cependant, les événements d'acétylation / déacétylation ne concernent pas seulement les histones mais peuvent également être impliqués dans la régulation de protéines nucléaires nécessaires à la stabilité des ARNm, la localisation et la dégradation de protéines, ou encore à la régulation des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN (Singh *et al.*, 2010). Au cours de notre étude, nous avons constaté que les profils d'acétylation des protéines nucléaires, extraites de cellules WT traitées par la cryptogéine ou de cellules CL5 non traitées, présentaient des similitudes. En effet, suite au traitement par la cryptogéine de cellules de tabac WT ou suite à l'approche d'interférence à ARN dans les cellules CL5, l'extinction de *NtHD2a/b* conduit à l'accumulation de protéines nucléaires « hyperacétylées ». Toutefois, les masses moléculaires apparentes de ces protéines n'étant *a priori* pas compatibles avec celles des histones de tabac, il est fort probable qu'elles correspondent à des cibles non histones, et donc potentiellement à des protéines de signalisation ou de régulation de l'expression génique. Nous avons alors entrepris une démarche d'identification des protéines nucléaires acétylées qui seraient potentiellement les cibles directes de NtH2a/b.

Pour cela nous avons, à partir de fractions enrichies en protéines nucléaires, purifié les protéines nucléaires acétylées par une étape de chromatographie d'échanges d'anions suivie d'une étape de chromatographie d'affinité à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. Cette démarche a été complétée par le prélèvement de six bandes issues d'un gel monodimensionnel préparatif, contenant potentiellement les protéines « hyperacétylées ». Le séquençage des peptides correspondants par spectrométrie de masse LC MS/MS (OrbiTrap™) a conduit à l'identification de 24 protéines prédites comme étant nucléaires, dont 18 possèdent des motifs conservés d'acétylation au vu d'une analyse *in silico*, et ce avec une forte probabilité. Cependant, les analyses des données de spectrométrie de masse n'ont pas permis

de mettre en évidence de groupements acétyles au niveau des peptides séquencés. Parmi les 18 protéines nucléaires identifiées dans notre approche figure notamment une DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 5. Comme nous l'avons présenté dans le § 3.4.3 du Chapitre Résultats, cette protéine pourrait jouer un rôle important dans la mise en place des réactions de défense (Kant *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008). Toutefois, pour l'heure, l'identification de cette protéine ne repose que sur une seule expérience de purification/séquençage. La réalisation de prochaines approches de purification / séquençage devraient permettre à terme d'identifier avec certitude les protéines nucléaires acétylées qui constitueraient des cibles de NtHD2a/b. Cette étape est indispensable à la compréhension du rôle et du mode d'action de NtHD2a/b dans le processus de mort cellulaire en réponse à la cryptogéine.

Bien qu'aucune cible de NtHD2a/b ne soit pour l'instant clairement identifiée, il semble raisonnable de penser que NtHD2a/b, *via* leur activité de lysine déacétylase, contribuent à la modulation de l'expression d'un certain nombre de gènes dans les cellules de tabac. Des analyses préliminaires d'accumulation de transcrits ont notamment révélé dans les cellules CL5 une accumulation de transcrits codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et des composés volatils. Des analyses transcriptomiques sont actuellement en cours pour identifier les gènes dont l'expression est modulée par la cryptogéine sous le contrôle, direct ou indirect, de NtHD2a/b. Pour cela, des ARN ont été préparés à partir de cellules WT et CL5, traitées ou non par la cryptogéine. Deux points de traitement ont été définis : 30 mn, pour avoir accès aux gènes très précocement régulés, et 4 h pour identifier les gènes plus tardivement régulés. L'hybridation de ces ARN sera réalisée sur des puces Agilent 44 k en collaboration avec la plate-forme de transcriptomique de l'INSA de Toulouse. D'ores et déjà, nous pouvons corréler ces résultats préliminaires à l'accumulation plus importante dans les cellules CL5 de composés phénoliques solubles, par rapport aux cellules de tabac WT. Mais cette accumulation en composés phénoliques solubles semble largement réduite à la fois dans les cellules WT et CL5 lors d'un traitement par la cryptogéine. Ce résultat, bien que préliminaire, est potentiellement intéressant puisqu'un certain nombre de travaux ont déjà rapporté l'implication de composés organiques volatils dans la potentialisation des défenses basée sur la communication entre des plantes voisines (Pare & Tumlinson, 1999 ; Engelberth *et al.*, 2004 ; Ferry *et al.*, 2004). Il est donc possible que NtHD2a/b soient impliquées dans la régulation de l'expression de gènes de défense dont

certains seraient prépondérants dans les mécanismes de défense requérant le métabolisme des phénylpropanoïdes et des composés volatils en réponse à la cryptogéine. Pour répondre à cette interrogation, des études de métabolomique pourraient être envisagées. Toutefois, cette approche a déjà été abordée lors d'un projet ANR obtenu il y a quelques années au laboratoire et il était apparu que le système expérimental à développer était extrêmement lourd pour obtenir un niveau de sensibilité et de reproductibilité suffisant.

Dans notre étude, nous avons également constaté que l'invalidation de *NtHD2a/b* s'accompagnait d'un ralentissement du processus de germination et de la croissance des plants de tabac. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents qui ont rapporté l'implication des HDAC de type 2 dans les processus de développement des ovules et des graines à travers notamment la régulation négative de la transcription de gènes d'ARN ribosomaux (Wu *et al.*, 2000 ; Earley *et al.*, 2006 ; Chen &Tian, 2007). Ceci suggère que NtHD2a/b pourraient, à travers leur activité déacétylase, contribuer également à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans des processus de développement. L'analyse transcriptomique actuellement en cours devrait permettre de préciser cette hypothèse. Une autre approche visant à surexprimer de manière constitutive *NtHD2a* ou *NtHD2b* dans les plants de tabac contribuerait également à vérifier l'implication de NtHD2a/b dans les processus de développement. Bien que plusieurs essais de surexpression de *NtHD2a* sous le contrôle du promoteur 35S aient été réalisés, nous n'avons néanmoins pas pu obtenir pour l'instant de transformants stables surexprimant *NtHD2a* ou *NtHD2b*. Cette observation pourrait conforter l'importance de NtHD2a/b dans les processus de développement chez le tabac.

4.5. Modèle proposé

L'activité histone déacétylase de NtHD2a/b semble constituer un rôle majeur dans les cellules de tabac quant à la répression de l'expression d'un certain nombre de gènes qui, selon nos observations, pourraient être impliqués dans des processus de défense et de développement, se traduisant notamment par la répression du processus de mort cellulaire induit (au moins) par les élicitines dites nécrosantes. La dé-répression du processus de mort cellulaire dans les

cellules de tabac semble impliquer un certain nombre d'acteurs. Sur la base de l'ensemble des résultats et des données bibliographiques présentés, un modèle général accompagné de plusieurs suppositions peut être proposé quant aux modes d'action de NtHD2a/b dans les cellules de tabac concourants à la régulation du processus de mort cellulaire en réponse à la cryptogéine.

Une première étape conduit, par un mécanisme inconnu à ce jour, à une activité nucléaire de SIPK détectable dès les premières minutes de traitement des cellules de tabac par la cryptogéine. Nous ne savons pas actuellement si l'activité nucléaire de SIPK résulte de la phosphorylation de SIPK par une MAPK localisée dans le noyau ou bien de la translocation dans le noyau de SIPK activée dans le cytosol (Dahan *et al.*, 2010). Une fois activée, SIPK pourrait phosphoryler un ou plusieurs facteurs de transcription tel que WRKY1 (Menke *et al.*, 2005) qui contribueraient *in fine* à réguler l'expression d'un premier groupe de gènes impliqués dans l'induction et/ou l'établissement de la mort cellulaire (ce groupe de gènes sera nommé « gènes de mort cellulaire »). Simultanément, NtHD2a/b seraient phosphorylées par une PK, cette réaction se déroulant dans le noyau. Un faisceau d'arguments (phosphorylation *in vitro*, BiFC pour Biomolecular fluorescence complementation) suggère que cette PK n'est pas SIPK mais plutôt une CK2α (sous unité catalytique alpha de caséine kinase de type 2 ; Hammoudi, 2011) dont l'activation dans le noyau en réponse à la cryptogéine a été rapportée par Dahan (2008). Une fois phosphorylées, NtHD2a/b seraient transloquées du noyau au cytosol et dégradées par le protéasome (Dutartre et Bourque, données non publiées). Par conséquent, les protéines nucléaires, précédemment désacétylées par NtHD2a/b avant un traitement par la cryptogéine, s'accumuleraient alors dans le noyau sous leur forme acétylée, leur acétylation étant assurée par une histone acétyltransférase non caractérisée à ce jour. Parmi ces protéines, on peut raisonnablement s'attendre à trouver des facteurs de régulation transcriptionnelle impliqués dans la régulation de l'expression d'un second groupe de gènes qui moduleraient l'intensité du processus de mort cellulaire induit par la cryptogéine. En effet, il a par exemple été démontré chez les mammifères que des HDAC peuvent interagir avec différents régulateurs transcriptionnels tels que NFTA (*nuclear factor of activated T cells*) ou p53 (Chen & Tian, 2007). Cette hypothèse est d'autant plus cohérente que la masse moléculaire des protéines nucléaires hyperacétylées en réponse à la cryptogéine est comprise

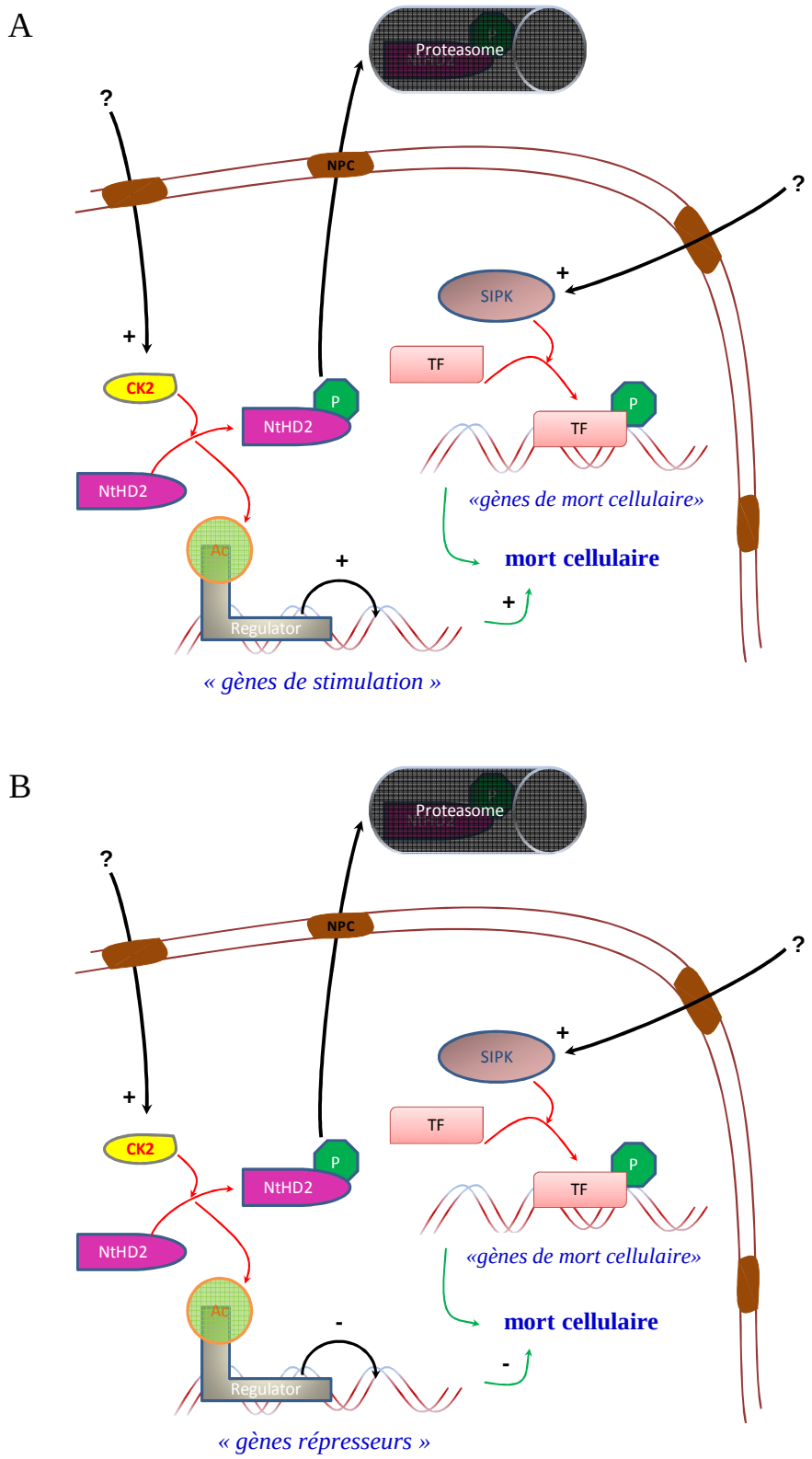


Figure 23 : Deux modèles hypothétiques (A et B) du mode d'action de NtHD2a/b dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les cellules de tabac. La protéine CK2 (caséine kinase de type 2) est annotée en jaune; la protéine kinase SIPK (salicylic acid-induced protein kinase) est surlignée en mauve; les protéines NtHD2 (*Nicotiana tabacum* histone deacetylase de type 2), les facteurs de transcription (TF) et les pores nucléaires (NPC) sont respectivement surlignés en rose, en rouge et en brun.

entre 35 et 60 kDa, et semble donc peu compatible avec la masse moléculaire des histones. Deux variantes du modèle peuvent être envisagées :

1- Le second groupe de gènes (qui modulerait l'intensité de la mort cellulaire) pourrait être surexprimé *via* la voie dépendante de NtHD2 en réponse à la cryptogéine dans le but d'optimiser l'efficacité du rôle tenu par les « gènes de mort cellulaire » : ces gènes sont à ce titre nommés « gènes de stimulation » (Figure 23A).

2- Il peut être également proposé qu'en réponse à la cryptogéine, la voie dépendante de NtHD2 réprimerait l'expression du second groupe de gènes responsable de l'inhibition de l'action des « gènes de mort cellulaire » : ces gènes sont nommés « gènes répresseurs » (Figure 23B).

In fine, l'induction de la mort des cellules de tabac en réponse aux élicitines sécrétées par différentes espèces de *Phytophthora* serait le résultat d'un équilibre entre les activités de l'ensemble des produits codés par ces gènes. Lors de l'invalidation de l'expression de NtHD2a/b par une approche d'interférence à ARN, l'induction de la mort cellulaire par la cryptogéine est promue soit par la surexpression des « gènes de stimulation » soit par la répression des « gènes répresseurs ». La régulation de l'expression des « gènes de stimulation » et des « gènes répresseurs » par NtHD2a/b seules n'est pas suffisante en soi pour promouvoir la mort spontanée des cellules de tabac, puisque l'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* par une approche d'interférence à ARN ne conduit pas à la mort cellulaire spontanée. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les deux voies de signalisation impliquant respectivement SIPK et NtHD2a/b contrôlent le même groupe de gènes, la mort cellulaire étant contrôlée par l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de l'une ou de l'autre.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'est inscrit dans l'étude du rôle de NtHD2a/b dans l'établissement du processus de mort cellulaire des cellules de tabac et de la RH *in planta* en réponse à la cryptogéine. Des approches de pharmacologie ainsi que des approches de surexpression ou d'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* chez le tabac ont contribué d'une part à confirmer l'implication de NtHD2a/b en tant que régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine et d'autre part à appréhender les événements de la cascade de signalisation prépondérants dans l'établissement de cette mort cellulaire. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place de la mort cellulaire apparaissent complexes et semblent notamment impliquer la modulation de l'expression de gènes de défense, la synthèse *de novo* de protéines ainsi que l'activation de MAPK telles que WIPK et SIPK.

Les travaux relatifs à la mise en évidence de NtHD2a/b comme répresseurs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine constituent la première description de l'implication de HDAC de type 2, spécifiques des plantes, dans l'établissement d'une réponse de défense de type mort cellulaire en réponse à un stress biotique.

Outre la nécessité de confirmer certains des résultats obtenus, ce travail devra être poursuivi par une analyse fonctionnelle de NtHD2a/b dans les réponses de défense induites par la cryptogéine chez le tabac. Deux axes d'étude majeurs peuvent être ainsi proposés.

- **Identification de la ou des protéine(s) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation de NtHD2a/b**

  Dans notre étude, NtHD2a/b constituent deux isoformes redondantes caractérisées comme étant rapidement phosphorylées en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac. L'identification de la ou des PK pouvant être impliquée(s) dans le processus de phosphorylation de NtHD2a/b nécessitera la mise au point de stratégies de purification de protéines, actuellement en cours au laboratoire.

  Par ailleurs, le laboratoire a précédemment mis en évidence l'activation précoce en réponse à la cryptogéine d'un certain nombre de PK nucléaires, dont la sous-unité catalytique α d'une caséine kinase de type 2 (CK2α ; Dahan, 2008). L'analyse *in silico* des séquences de NtHD2a/b révèle que les sites de phosphorylation prédits correspondent tous à des sites spécifiques de CK2α, suggérant que CK2α est la PK candidate de choix responsable de la phosphorylation de NtHD2a/b. Des approches de phosphorylation *in vitro* mais également de BiFC (*biomolecular fluorescent complementation*), pouvant

mettre en évidence une possible interaction entre NtHD2 et CK2, ont récemment été entreprises dans le but de vérifier cette hypothèse.

L'analyse *in silico* des séquences d'acides aminés de NtHD2a/b a également révélé que NtHD2a/b pourraient être les cibles d'autres modifications post-traductionnelles telles que la sumoylation. Sur la base de données bibliographiques rapportant notamment l'activation par sumoylation d'une HDAC, HDA19, chez les mammifères (David *et al.*, 2002), il est envisageable que l'activité de NtHD2a/b puisse être modulée par une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, en fonction du contexte physiologique. Cette hypothèse pourra notamment être vérifiée en collaboration avec l'équipe du Dr. H. Van den Burg (Institut des Sciences de la Vie, Université d'Amsterdam, Pays-Bas) spécialisée dans l'étude des conséquences du processus de sumoylation dans la mise en place des réactions de défense chez *A. thaliana*.

Bien que NtHD2a/b aient été identifiées comme des protéines rapidement phosphorylées en réponse à la cryptogéine dans le noyau des cellules de tabac et qu'elles possèdent un site de localisation nucléaire, l'étude d'une translocation noyau ↔ cytoplasme de NtHD2a/b pourrait contribuer à la régulation de l'activité de NtHD2a/b. Cet aspect nécessitera l'obtention de lignées cellulaires de tabac exprimant de manière stable les protéines de fusion NtHD2a/b-GFP, si possible sous le contrôle de leur promoteur respectif, afin d'éviter les artefacts d'une trop forte surexpression liée au promoteur 35S.

- **Identifier des cibles (protéines et gènes) de NtHD2a/b :**

Comprendre comment NtHD2a/b exercent leur rôle de régulateur négatif de la mort cellulaire induite par les élicitines implique d'identifier les protéines nucléaires, histones ou non, qui présenteraient des profils d'hyperacétylation soit lors de l'invalidation de NtHD2a/b, soit lors d'un traitement prolongé des cellules de tabac WT par la cryptogéine. Cette approche, qui a été initiée lors de ce travail de thèse, doit maintenant être optimisée et reproduite afin d'être certains que la ou les protéine(s) identifiée(s) sont réellement des cibles de NtHD2a/b. Une démarche de génétique fonctionnelle devra alors être entreprise pour chacune des protéines retenues afin de préciser leur rôle dans la mise en place des réactions de défense.

De même, pour comprendre comment ces HDAC contrôlent le développement de la mort cellulaire, il est indispensable d'identifier les gènes dont l'expression sera, plus ou moins

directement, régulée en réponse à la cryptogéine sous le contrôle de NtHD2a/b. Pour cela l'approche de microarray détaillée dans ce manuscrit doit permettre de déterminer rapidement les gènes candidats. Les modifications d'expression de chacun de ces gènes devront d'abord être confirmées lors de cinétiques plus précises par des approches de RT-PCR quantitatives, avant d'entreprendre la caractérisation fonctionnelle des protéines codées par ces gènes.

ANNEXES

Commentary

Danger at your door: pathogen signals and programmed cell death in plants

The sacrifice of one for the good of the many is a noble attribute in people (as well as, perhaps, altruistic ground squirrels who vocalize warning alarms at the site of a predator shortly before joining the raptor for lunch!). Perhaps, a corollary in plants is the programmed cell death (PCD) that, as an important component of the immune response to pathogens, increases organism fitness. Elucidation of some key molecular steps underlying this notion of individual (cell) sacrifice for the good of the 'whole' is the focus of the exciting work of Stéphane Bourque *et al.* (pp. 127–139) in this issue of *New Phytologist*.

'Herein lies the roots of a rather adventuresome fishing expedition undertaken by Stéphane Bourque and colleagues that has landed us a very big fish indeed.'

Plant responses to pathogens include an 'innate' or basal immune response that occurs upon recognition of evolutionarily-conserved essential components of pathogens; pathogen (or microbe) associated molecular patterns (PAMPs or MAMPs). PAMP-triggered immunity (PTI) involves defence gene expression and generation of antimicrobial molecules. Some pathogens have (i.e. race-specific or strain-specific) effector proteins that act to impair molecular components of the plant innate immune response, leading to effector triggered susceptibility (ETS). Recognition (either directly or indirectly) of pathogen effector proteins (or the disruptions they have on basal immune system components) by plant cells evokes another layer of immune responses (effector triggered immunity (ETI)) which can include a hypersensitive response (HR) to ETS (Jones & Dangl, 2006; Thomma *et al.*, 2011). This component of a plant's repertoire of pathogen defence programmes involves PCD at the site of an infection. Cells neighbouring one under assault sense the presence of danger in the form of a pathogenic microbe. The danger alarm occurs through the perception of molecules associated with: the invading non-self pathogen; breakdown products derived from plant cells harmed by pathogens; and even specific signalling molecules endogenous to the plant that provide a warning alarm to reprogramme cell metabolism leading to defence responses. HR is a particularly powerful defence response because the regulated PCD occurring at a site where host cells are under assault limits proliferation of the pathogen within the plant and thereby prevents spread of an infection. The Greek philosopher Plato no doubt was considering humanity when he commented that, '*No one knows whether death, which people fear to be the greatest evil, may not be the greatest good*' but this perspective might apply to the PCD that provides protection to the plant against proliferation of pathogens.

The delineation of specific molecular events and identification of specific proteins involved in plant immunity, that is, characterizing the signal transduction pathway that leads to PTI and ETI, is a remarkably active and vibrant area of current plant biology research (e.g. Coll *et al.*, 2011). It is clear that a critical and early signal occurring upon pathogen perception is an elevation in cytosolic calcium ions (Ca^{2+}), which leads to generation of the antimicrobial and signalling molecules nitric oxide and various reactive oxygen species (ROS) intermediates such as hydrogen peroxide (H_2O_2) (Ma *et al.*, 2009; Krol *et al.*, 2010; Mazars *et al.*, 2010). This Ca^{2+} signal is also necessary for transcriptional reprogramming and increased expression of pathogen defence genes (Aslam *et al.*, 2008). Further, phosphorylation events in the cytosol are also required for the pathogen defence signalling pathway leading to altered gene expression. It is likely that Ca^{2+}-dependent kinases (CPKs) and mitogen activated kinase (MAPK) signalling networks acting downstream from CPKs, as well as independently, act to phosphorylate transcription factor proteins (WRKYs) that act as master regulators to facilitate reprogramming in the nucleus (Boudsocq *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2011). However, one point of incertitude in these newly-developed insights about specific steps in the immune signalling pathway is the question of which of these signalling events are specific to ETI. In fact, many of the intermediate events and proteins involved in these steps of signal transduction are required for both (PTI and ETI) components of plant immune response programmes.

© 2011 The Authors
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

The aforementioned notion of a multilayered plant immune response, involving PTI, ETS, and ETI which leads to HR, was conceptualized by Jones & Dangl (2006), and posits that HR occurs under specific conditions of plant–pathogen interactions. However, it is becoming increasingly clear that pathogen defence programmes leading to HR may occur under a broader range of conditions than originally conceptualized by Jones & Dangl (2006). Thus, some currently view the distinction between PTI and ETI as 'blurred' (Thomma *et al.*, 2011). Examples of why the dichotomy between PTI and ETI is under re-evaluation are as follows. PAMP molecules (such as the bacterial motility organ protein, flagellin) have been found to induce HR in the absence of pathogens (Naito *et al.*, 2008). Cryptogein is another pathogen-associated protein that can also cause HR when applied to plants in the absence of a pathogen. Cryptogein is a 10-kDa protein secreted by the plant pathogen *Phytophthora cryptogea*. Rather than acting to disarm components of PTI and induce ETS, cryptogein is a general plant cell toxin. But, it can clearly induce the specific Ca^{2+}- and ROS-dependent apoptotic PCD that is a hallmark of plant cell HR to pathogens (Zhu *et al.*, 2010). And, in this specific capacity, it is an especially powerful probe, or 'fishing hook' to use in order to go searching, or fishing so to speak, for specific steps in the signal transduction pathway that leads to HR. Herein lies the roots of a rather adventuresome fishing expedition undertaken by Stéphane Bourque and colleagues that has landed us a very big fish indeed. Their work provides new insights into mechanisms that lead to transcriptional reprogramming necessary for PCD occurring during HR.

As noted, previous work has already linked the early immune signals such as Ca^{2+} elevation to signalling cascades (e.g. involving CPKs and MAPKs) that alter gene expression associated with pathogen defence programmes. However, linking the early Ca^{2+} signal to events in the nucleus that alter gene expression specifically associated with HR is limited. That is the focus of the studies by Bourque *et al.*, and so their work breaks new ground in this active area of plant biology research. Bourque, along with colleagues David Wendehenne and Alain Pugin and coworkers have been using cryptogein as a probe of signalling in plant cells responding to pathogen perception for quite some time (e.g. Lecourieux *et al.*, 2005; Garcia-Brügger *et al.*, 2006; Dahan *et al.*, 2009). These prior studies led to the identification of nucleus-localized Ca^{2+} elevation and protein phosphorylation as key events downstream from cryptogein perception by plant cells. In the current work, they undertook a biochemical approach to develop new insights into immune signalling leading to HR. They used two-dimensional protein electrophoresis combined with $H_3{}^{32}PO_4$ radiolabelling to identify peptide fragments of nuclear-localized proteins phosphorylated (within minutes) specifically in response to cryptogein. Overcoming a number of technical challenges in their attempt to 'fish' for low abundance, nuclear-localized proteins phosphorylated in response to their cryptogein 'hook', they successfully identified two histone deacetylases (HDACs) as involved in this signalling pathway. They provide convincing evidence that these HDACs act as negative regulators of cryptogein-induced HR.

Bourque *et al.* further showed that cryptogein treatments, in addition to causing rapid HDAC phosphorylation, also repressed expression of the *HDAC* genes, and reduced HDAC protein levels. Using a number of complementary approaches, they linked the effects of cryptogein on HDAC phosphorylation and expression with HR. HDACs are key enzymes regulating gene expression by removing acetyl groups from the core histones. HDAC deacetylates histones, causing tighter coiling of DNA around the histone and a closed chromatin structure. The closed chromatin state makes the DNA inaccessible to transcriptional machinery, leading to repression of gene expression. Besides the role in chromatin remodelling, HDACs also interact with other non-histone proteins in the nucleus (Yu *et al.*, 2011). The role HDACs play in the nucleus, then, is consistent with their identification by Bourque *et al.* as negative regulators of PCD; the insights developed in this work should lead to further characterization of PCD associated with pathogen defence through the examination of targets of HDAC deacetylase activity.

Their work also provides us with an excellent comparison between PAMP signalling that leads to basal defence programmes, and the substantially overlapping signalling cascade that, under certain conditions, can also lead to HR. That point provides the field with some new and important insights. Oligogalacturonides (OGs) are plant cell wall fragments generated during pathogen infections. OGs are examples of plant-derived breakdown products that, as already mentioned, act as danger alarm signals in a fashion similar to PAMPs and evoke PTI defence signalling cascades. These OG danger alarms evoke many of the same signalling steps as cryptogein (cytosolic Ca^{2+} elevation, ROS generation, MAPK cascades) except they do not lead to nuclear-localized Ca^{2+} elevation, which occurs in response to cryptogein. Bourque *et al.* show that OG application to plants does not repress HDAC expression. Thus, their work allows us to sort out the key signalling steps that lead to the aforementioned 'noble sacrifice', the programmed cell death/hypersensitive response that limits pathogen infection in plants.

Yi Ma and Gerald A. Berkowitz*

Department of Plant Science and Landscape Architecture, Agricultural Biotechnology Laboratory, University of Connecticut, Storrs, CT 06269-4163, USA
(*Author for correspondence: tel +1 860 486 1945; email gerald.berkowitz@uconn.edu)

© 2011 The Authors
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

References

Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, de Castro C, Ierano T, Molinaro A *et al.* 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current Biology* **18**: 1078–1083.

Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J. 2010. Differential innate immune signalling via $Ca^{(2+)}$ sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–422.

Bourque S, Dutartre A, Hammoudi V, Blanc S, Dahan J, Jeandroz S, Pichereaux C, Rossignol M, Wendehenne D. 2011. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytologist* **192**: 127–139.

Coll NS, Epple P, Dangl JL. 2011. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* **18**: 1247–1256.

Dahan J, Pichereaux C, Rossignol M, Blanc S, Wendehenne D, Pugin A, Bourque S. 2009. Activation of a nuclear localized-SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemical Journal* **418**: 191–200.

Garcia-Brügger 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.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KA *et al.* 2010. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor *At*PEPR1 and its close homologue *At*PEPR2. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13471–13479.

Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A. 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**: 527–538.

Ma W, Qi Z, Smigel A, Walker RK, Verma R, Berkowitz GA. 2009. Ca^{2+}, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**: 20995–21000.

Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S. 2011. Phosphorylation of a WRKY ranscription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1639–1653.

Mazars C, Thuleau P, Lamotte O, Bourque S. 2010. Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant* **3**: 706–718.

Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. 2008. Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **21**: 1165–1174.

Thomma BP, Nurnberger T, Joosten MH. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4–15.

Yu CW, Liu X, Luo M, Chen C, Lin X, Tian G, Lu Q, Cui Y, Wu K. 2011. HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**: 173–184.

Zhu X, Caplan J, Mamillapalli P, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP. 2010. Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. *EMBO Journal* **29**: 1007–1018.

Key words: Ca signalling, cryptogein, histone deacetylase, hypersensitive response (HR), plant immune signalling, programmed cell death (PCD).

Timescales and timetrees

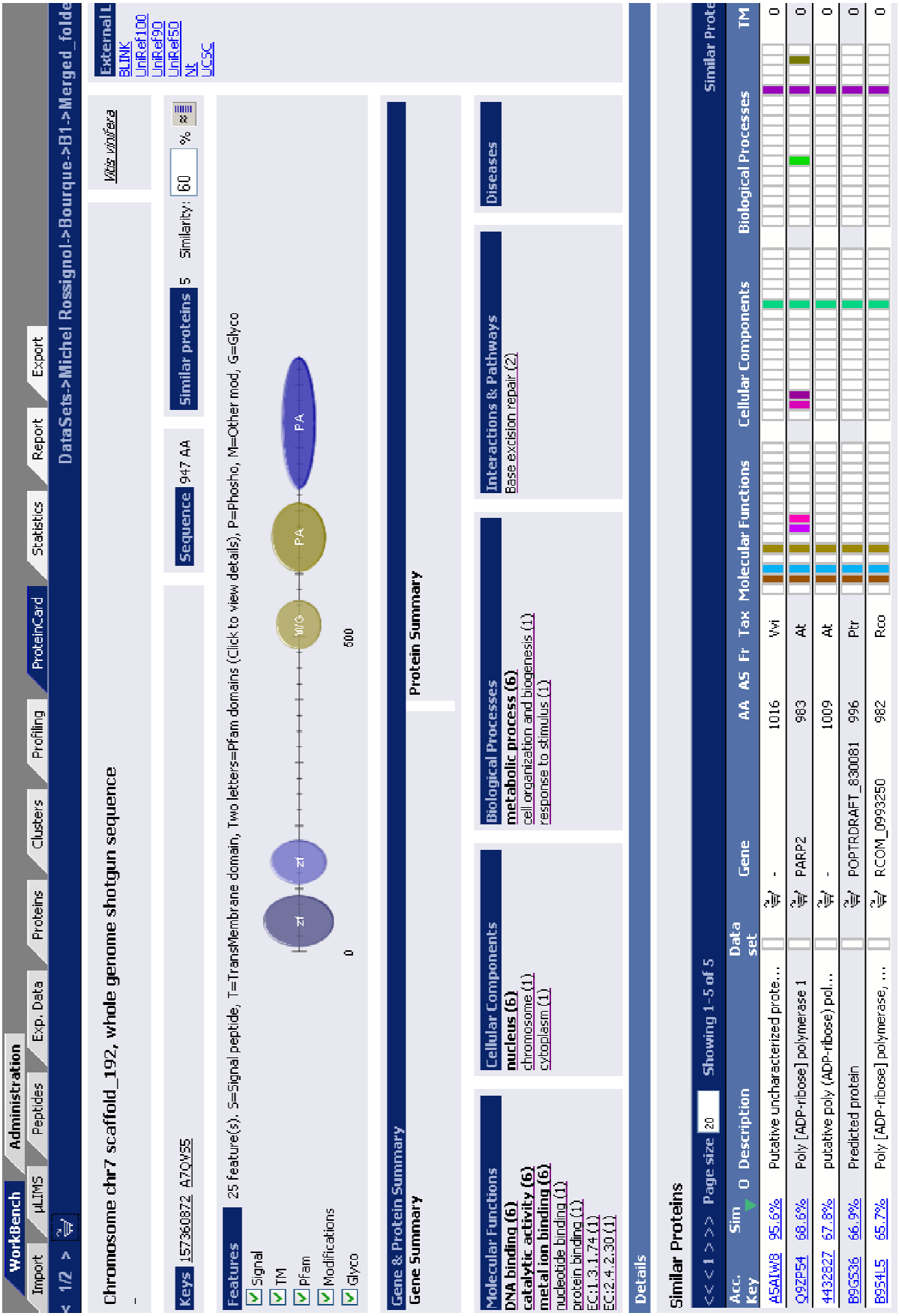
Establishing a timescale for plant evolution is a prime goal of palaeontology, but ever since the advent of gene sequencing the prospect of molecular clocks has provided an enticing alternative. Now clocks are increasingly taking the place of rocks. Advances in technology mean that vast amounts of DNA sequence can be obtained rapidly and cheaply from large numbers of living species, informing both our understanding of the pattern of branching of the tree of life (phylogeny) and, when calibrated, the timing of those branching events (timetree). As the nature of molecular data becomes better understood, methods have developed to address recognized weaknesses, modelling the reality of molecular evolution more accurately (Hedges & Kumar, 2009). Fossils still play a crucial role, forming the link between molecules and an actual chronology. At least one fossil calibration point is needed to set the basic rate at which the clock ticks, and increasingly more are deployed to act as constraints on rate changes across different limbs of the tree (Benton *et al.*, 2009). Getting the fossil calibrations right is critical, because they greatly influence outcomes, but this apparently simple step is not nearly as straightforward as it may seem. In this issue of *New Phytologist*, Clarke *et al.* (pp. 266–301) take a novel approach to setting and handling fossil calibrations for the plant tree of life, and one that is likely to be widely adopted and developed. Results are controversial, indicating substantially earlier origins of land plants and flowering plants than is supported by direct fossil evidence.

'Results are controversial, indicating substantially earlier origins of land plants and flowering plants than is supported by direct fossil evidence.'

One of the key issues that Clarke *et al.* confront cuts to the heart of the calibration problem. To generate an accurate global calibration for the whole tree, one needs to estimate the actual point in time that at least one group originated (calibration point), and preferably this should be done for more than one group to allow for the multiple constraints commonly now used with 'relaxed clock' methods (Benton *et al.*, 2009). However, the first appearance of a group in the fossil record almost always post-dates its actual point of origin by some unknown amount. Thus, fossils provide only minimum age estimates. Moreover, the degree to which fossils underestimate lineage origin varies

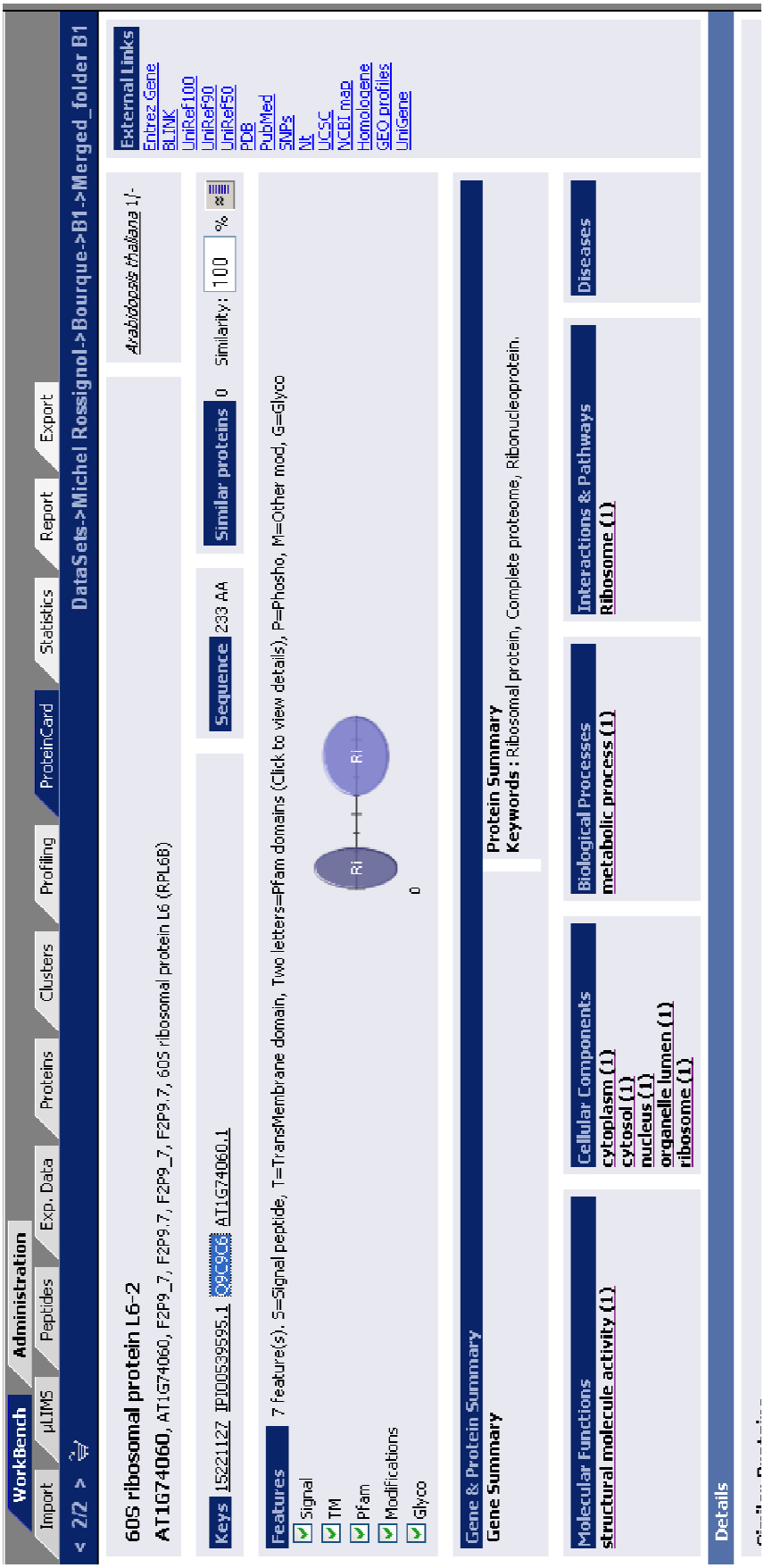
© 2011 The Natural History Museum
New Phytologist © 2011 New Phytologist Trust

Bande B1 protéine nucléaire A7QVS5

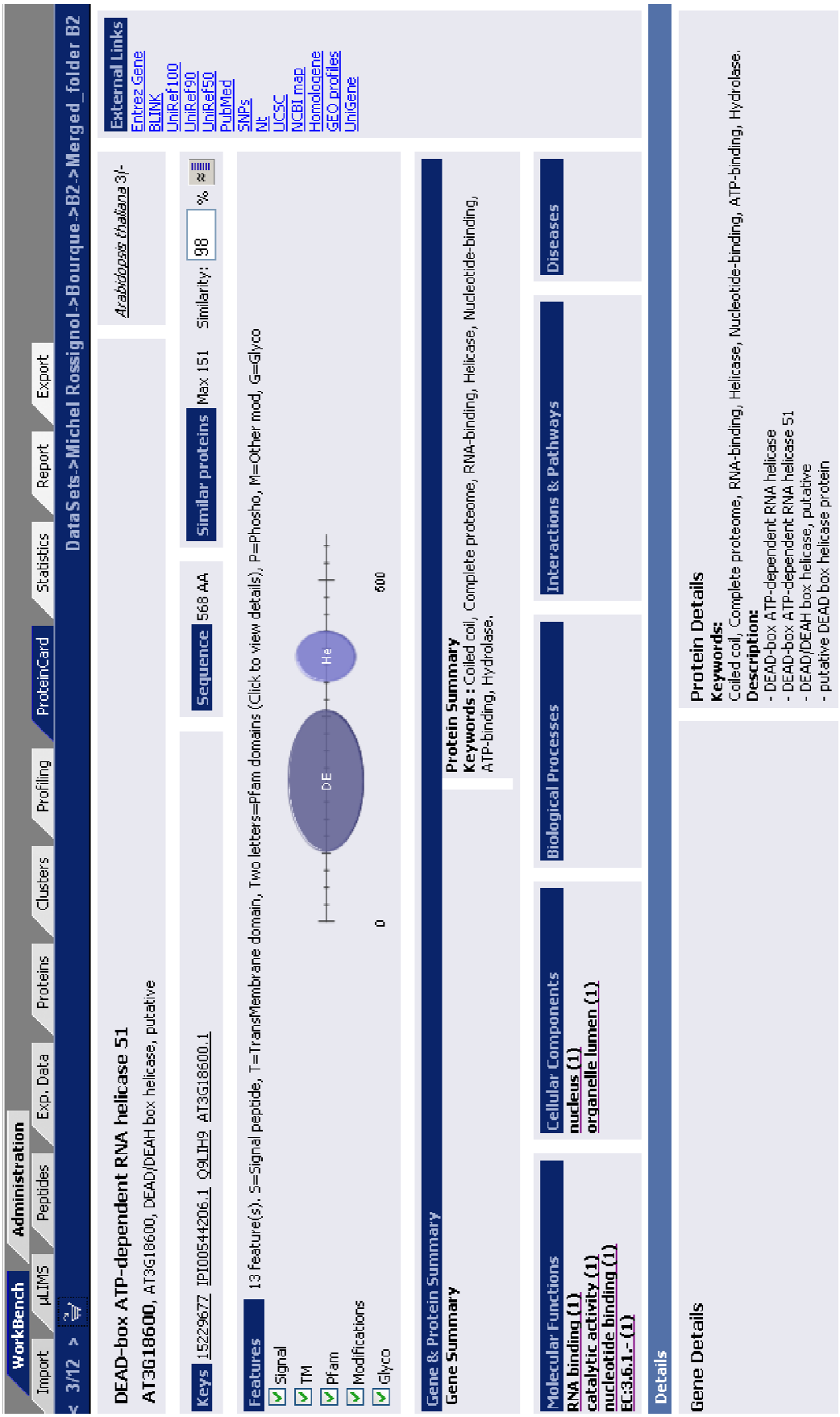


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B1 protéine nucléaire Q9C9C6

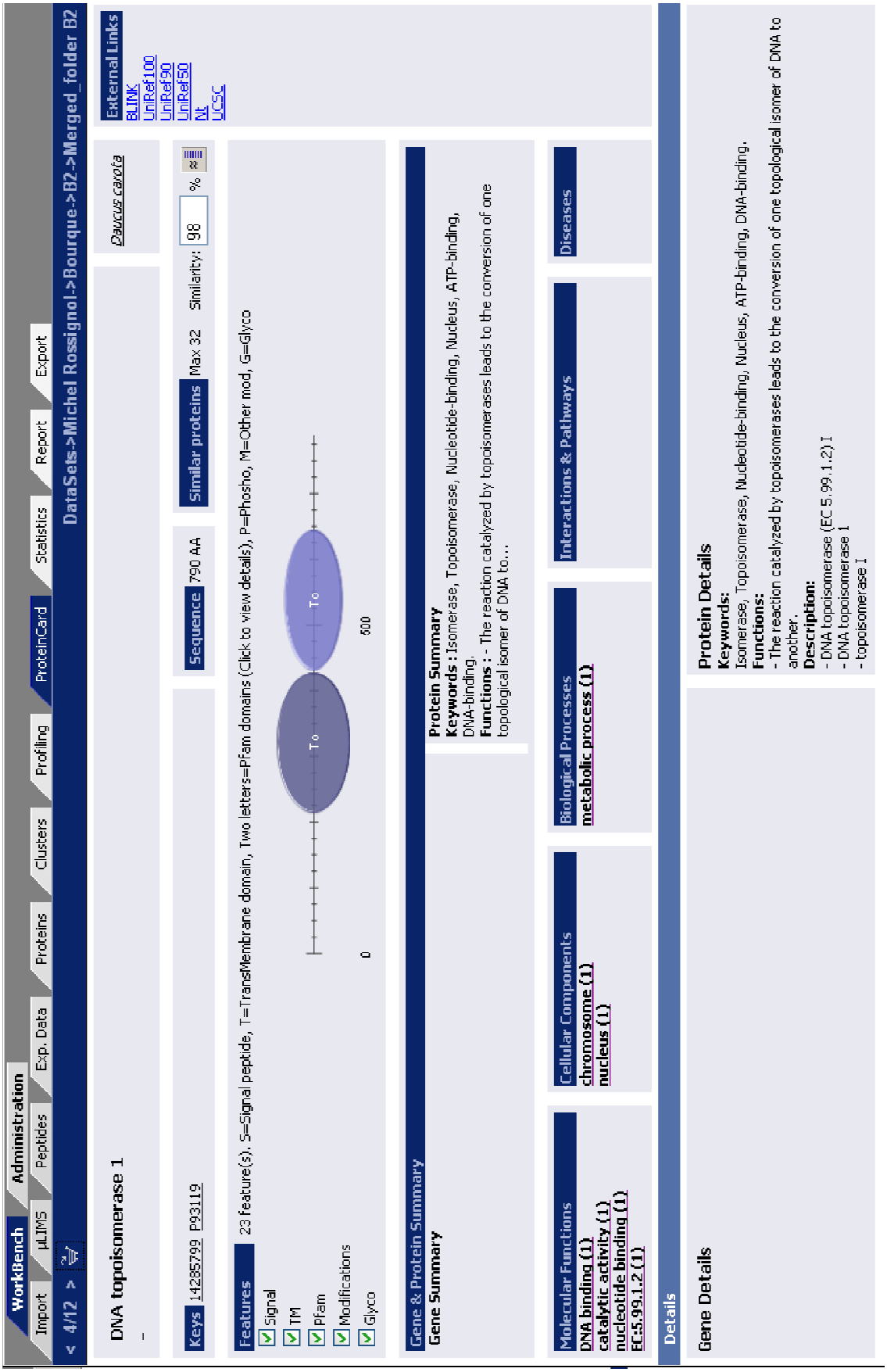


Bande B2 protéine nucléaire Q9LIH9

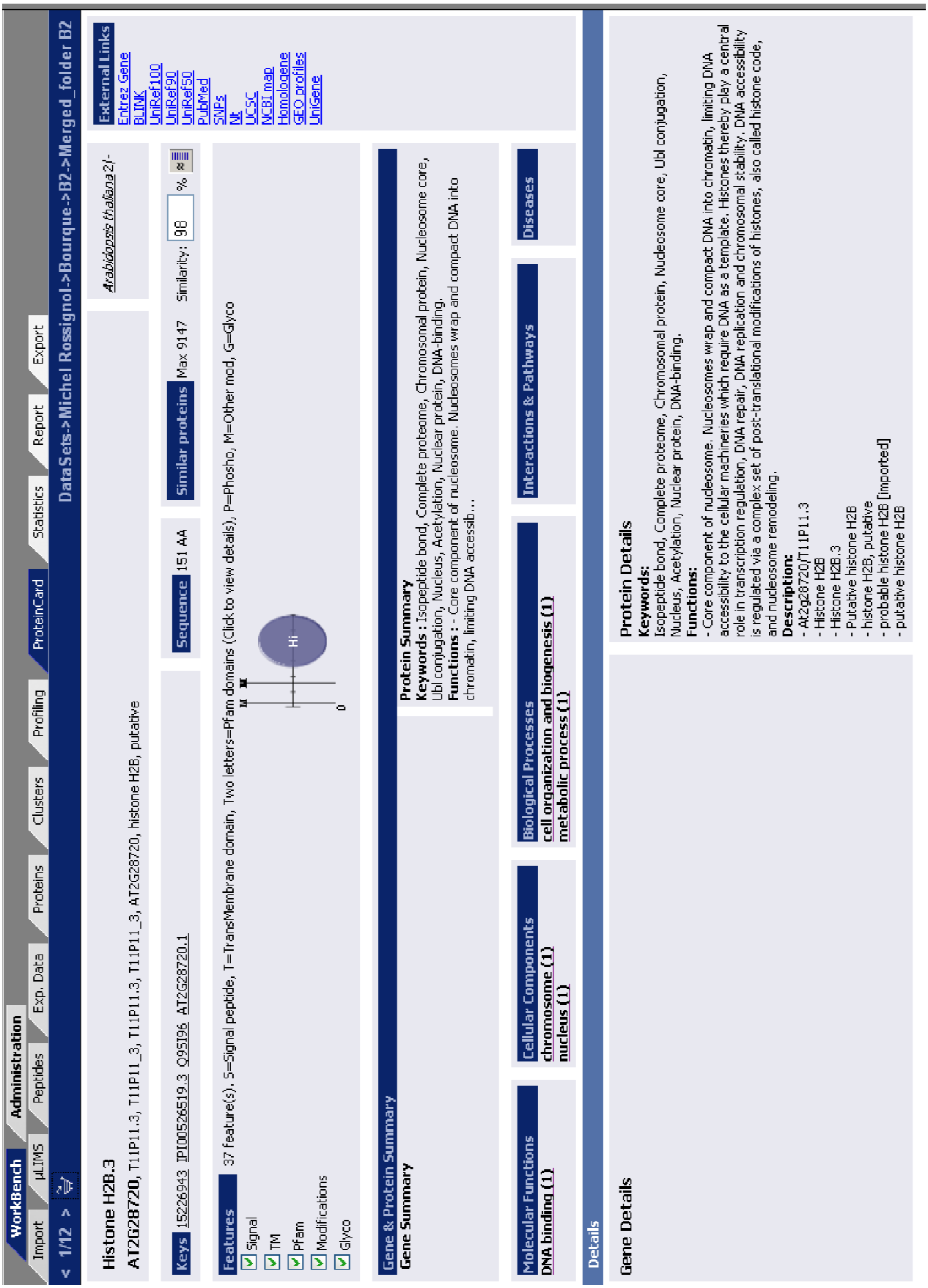


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B2 protéine nucléaire P93119

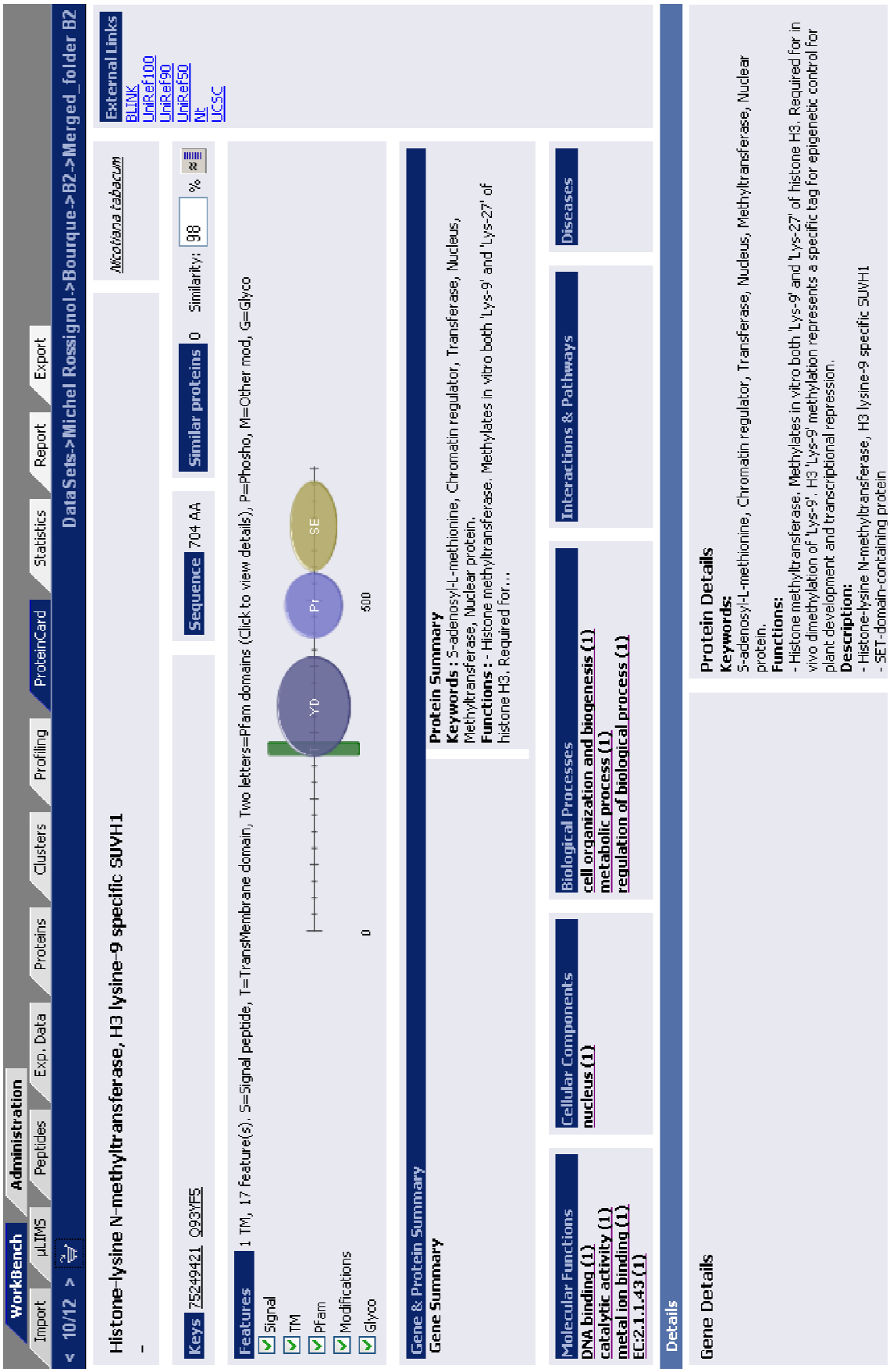


Bande B2 protéine nucléaire Q9SI96



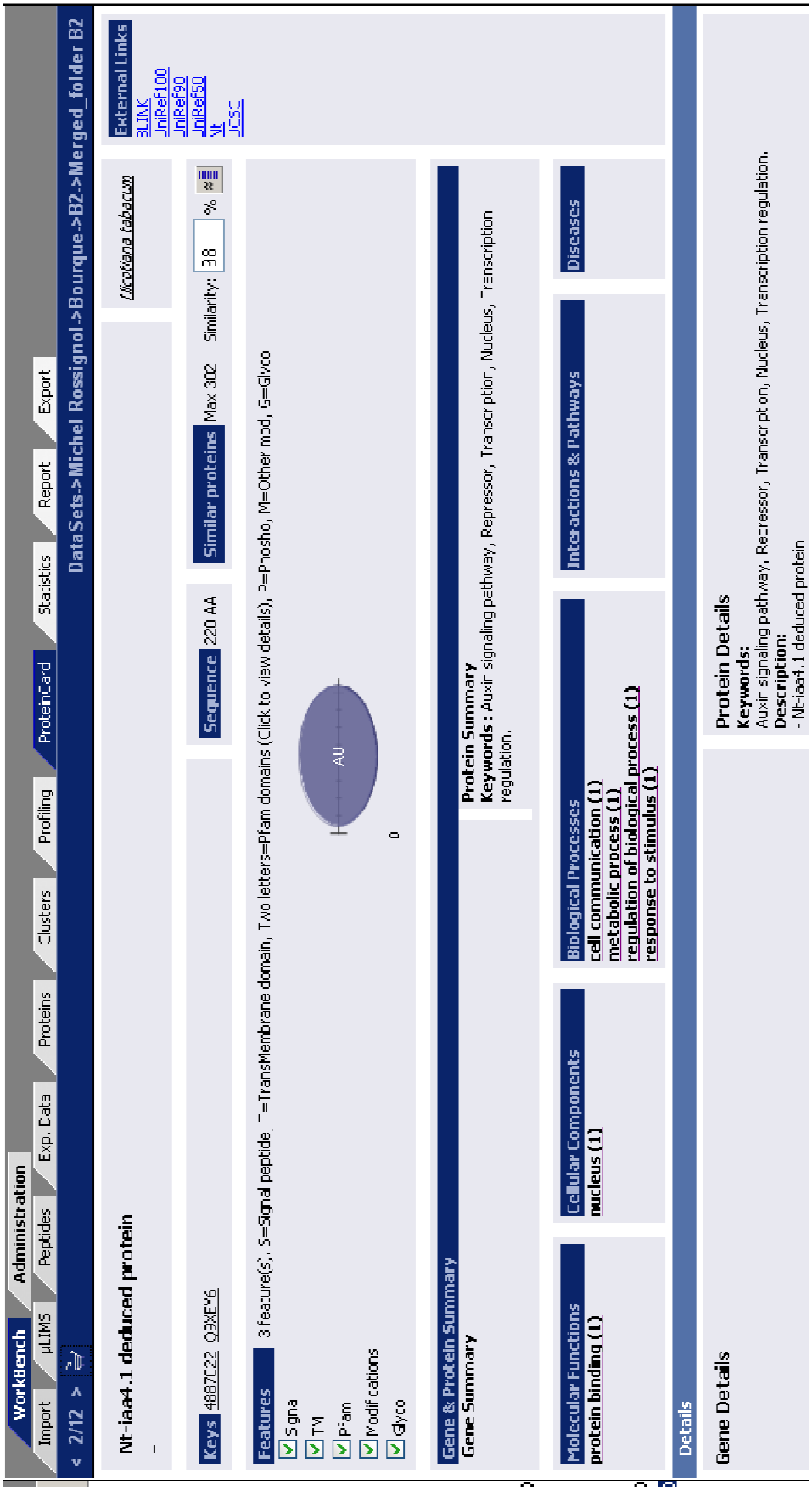
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B2 protéine nucléaire Q93YF5



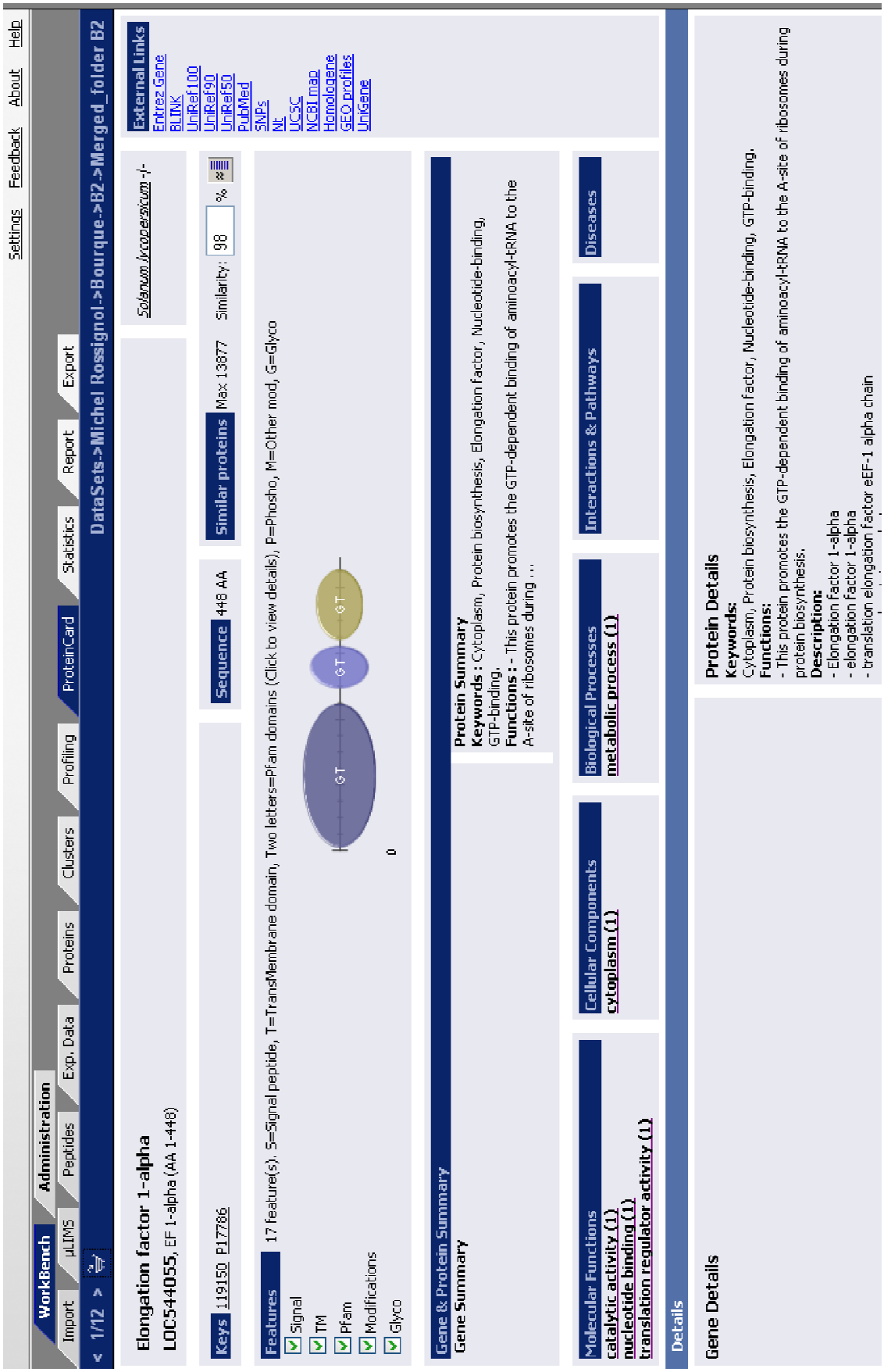
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B2 protéine nucléaire Q9XEY6



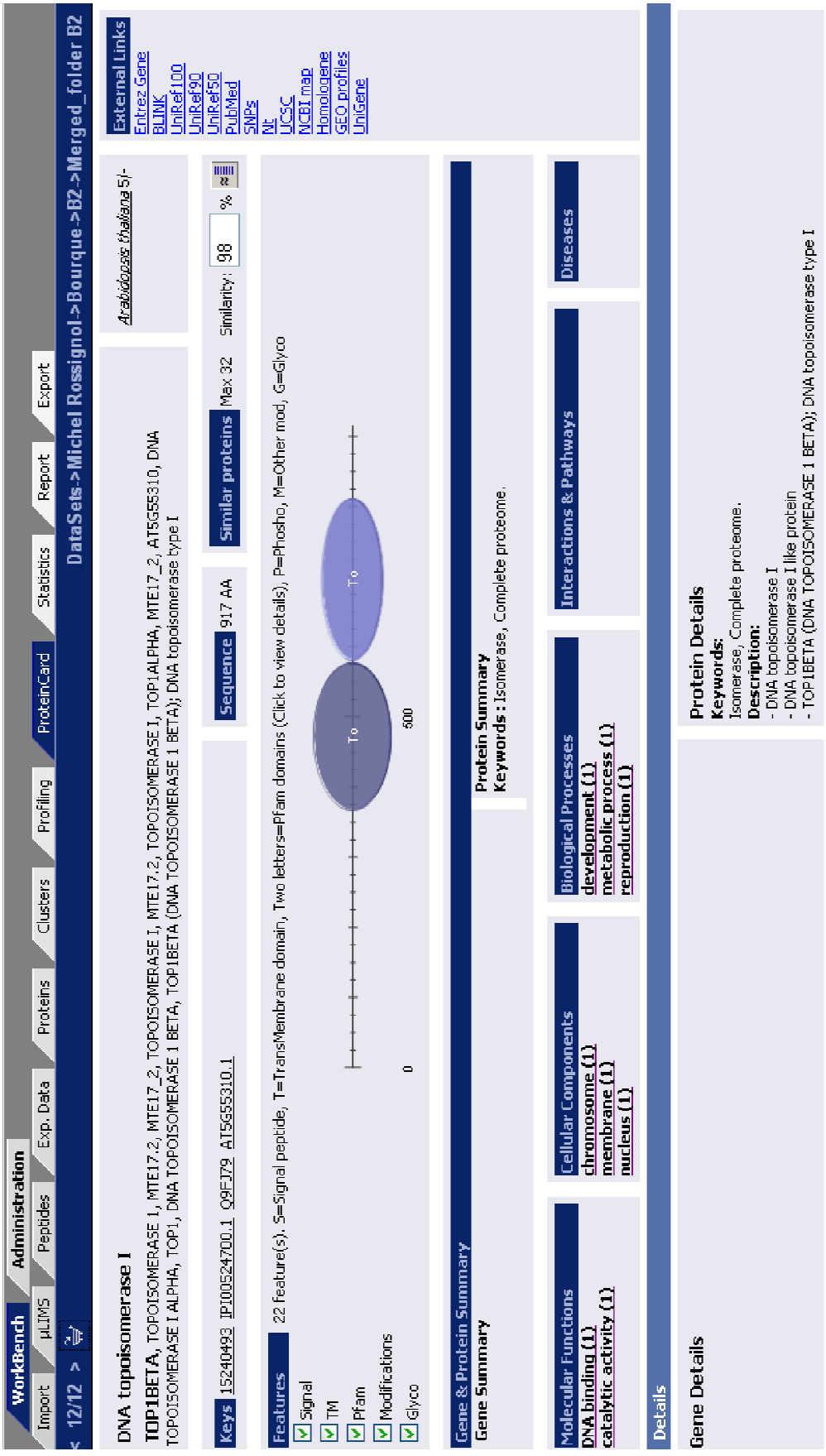
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B2 protéine nucléaire P17786



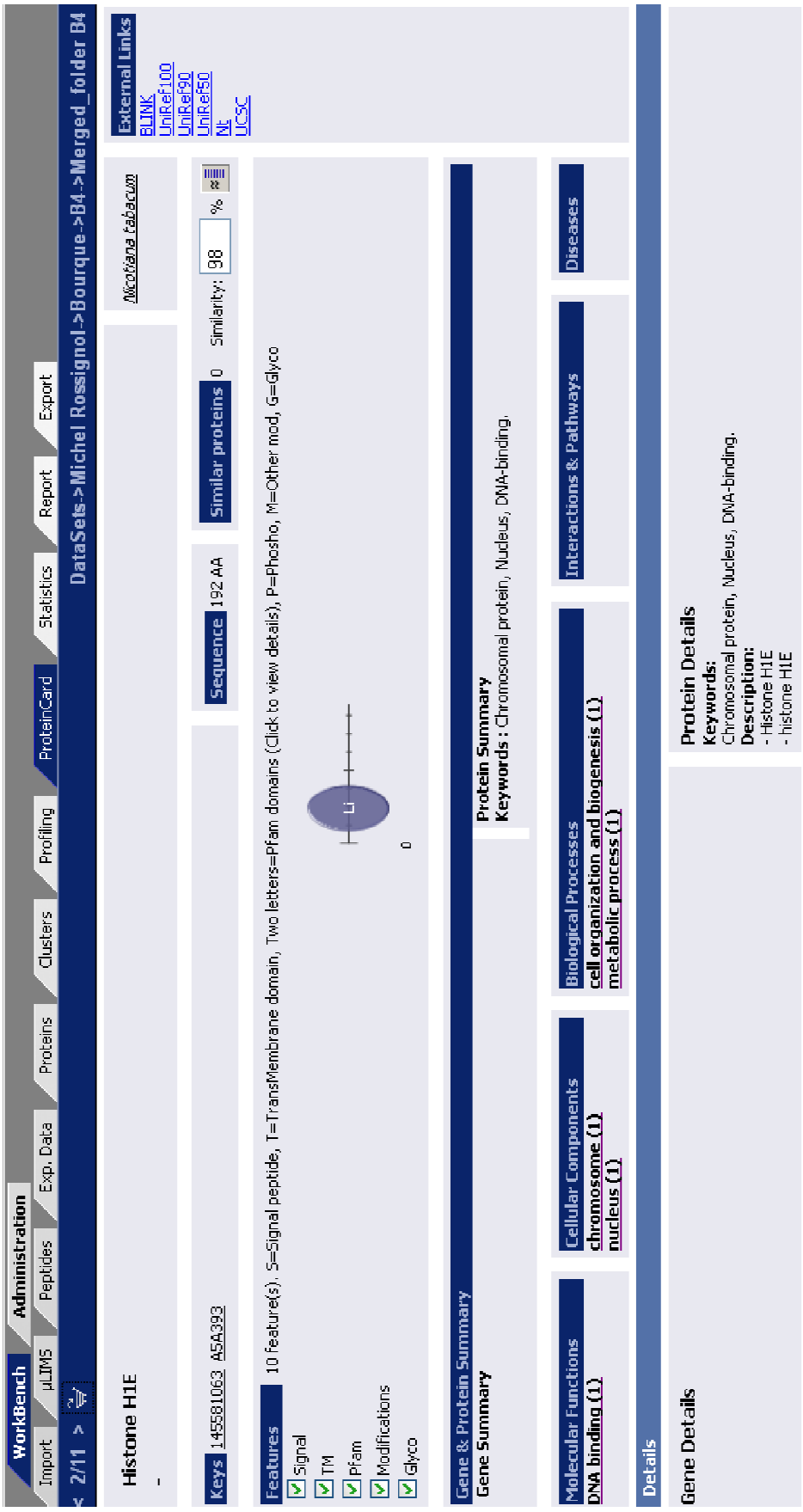
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B2 protéine nucléaire Q9FJ79

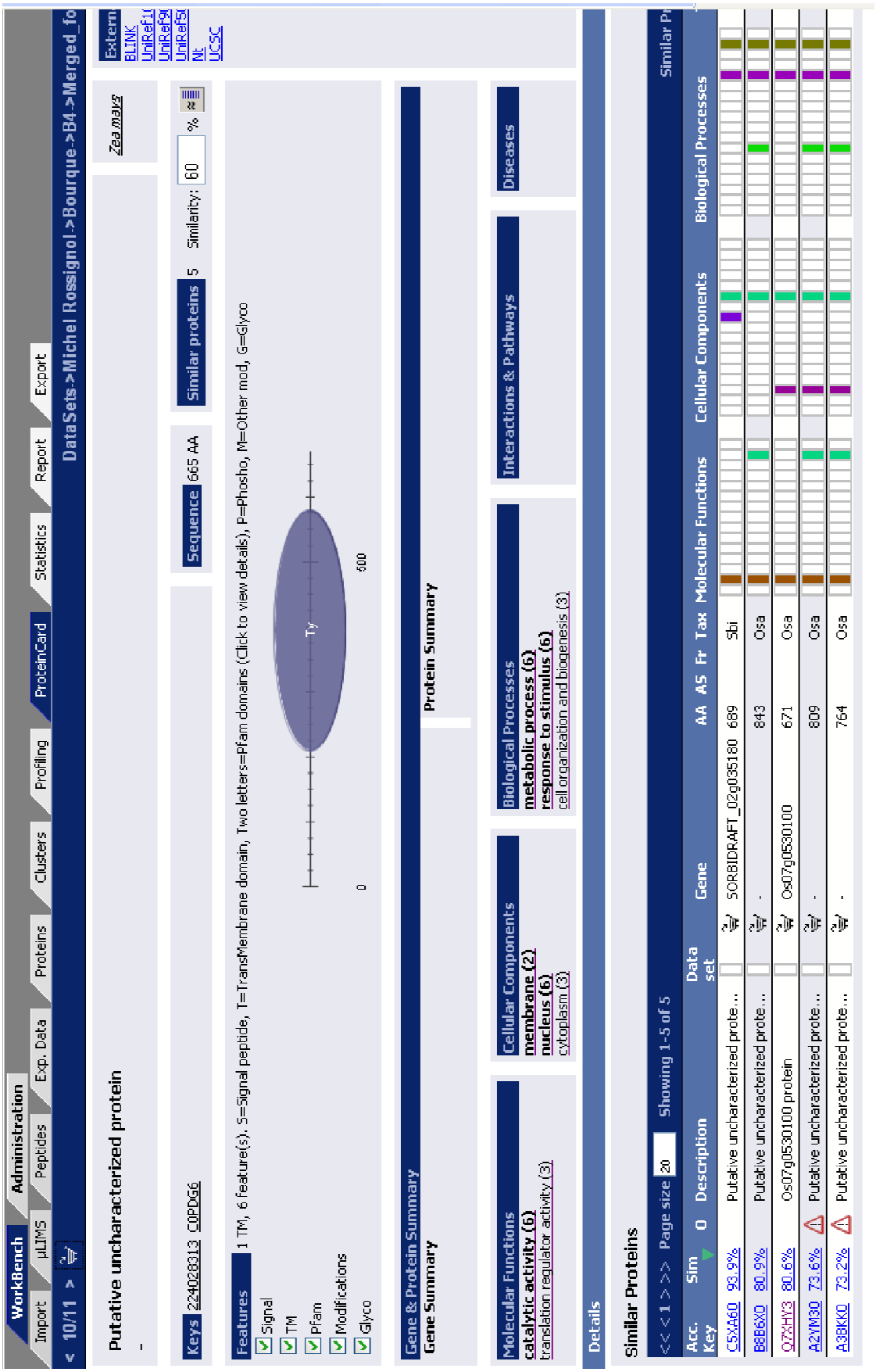


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B4 protéine nucléaire A5A393

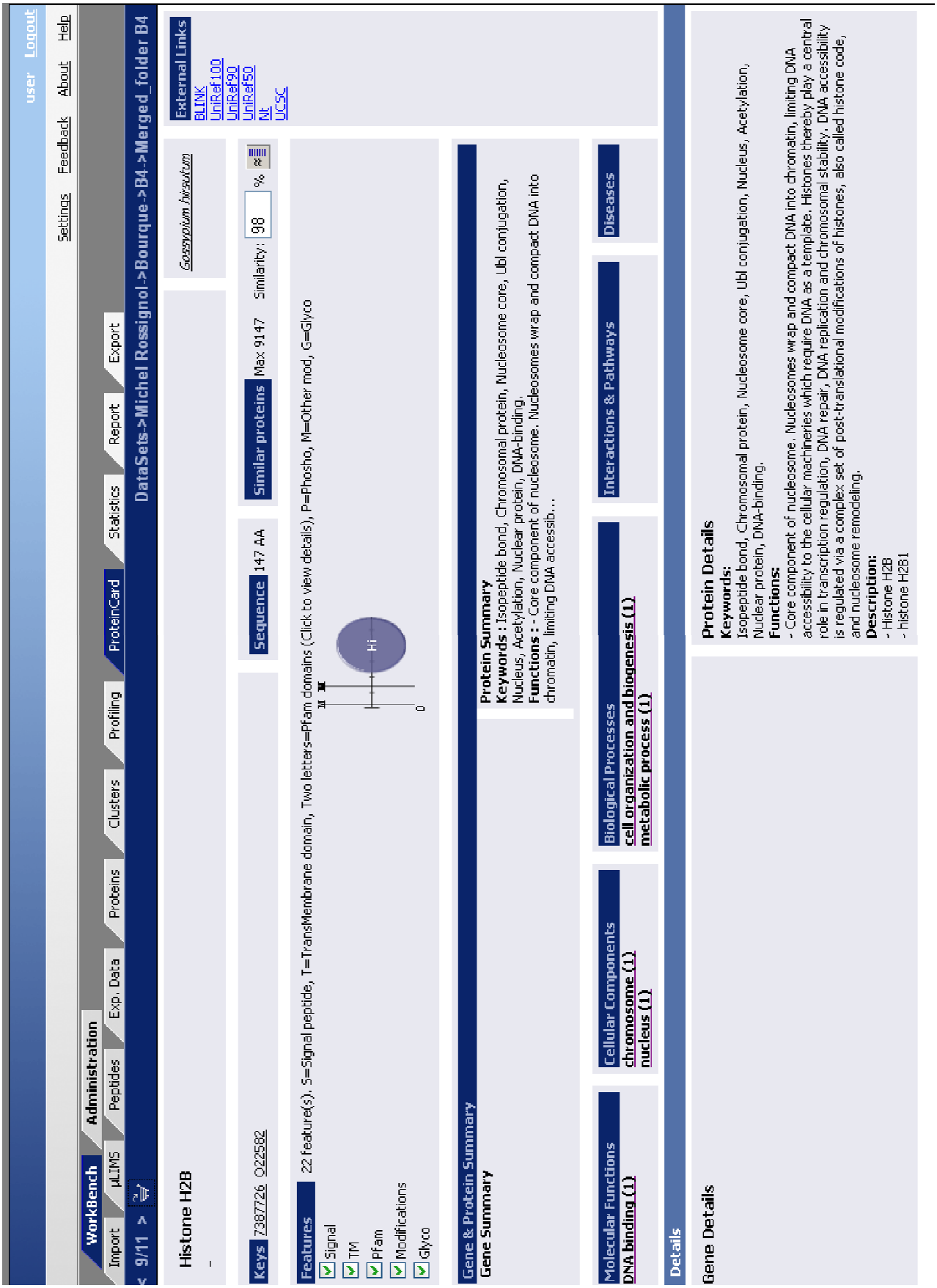


Bande B4 protéine nucléaire C0PDG6

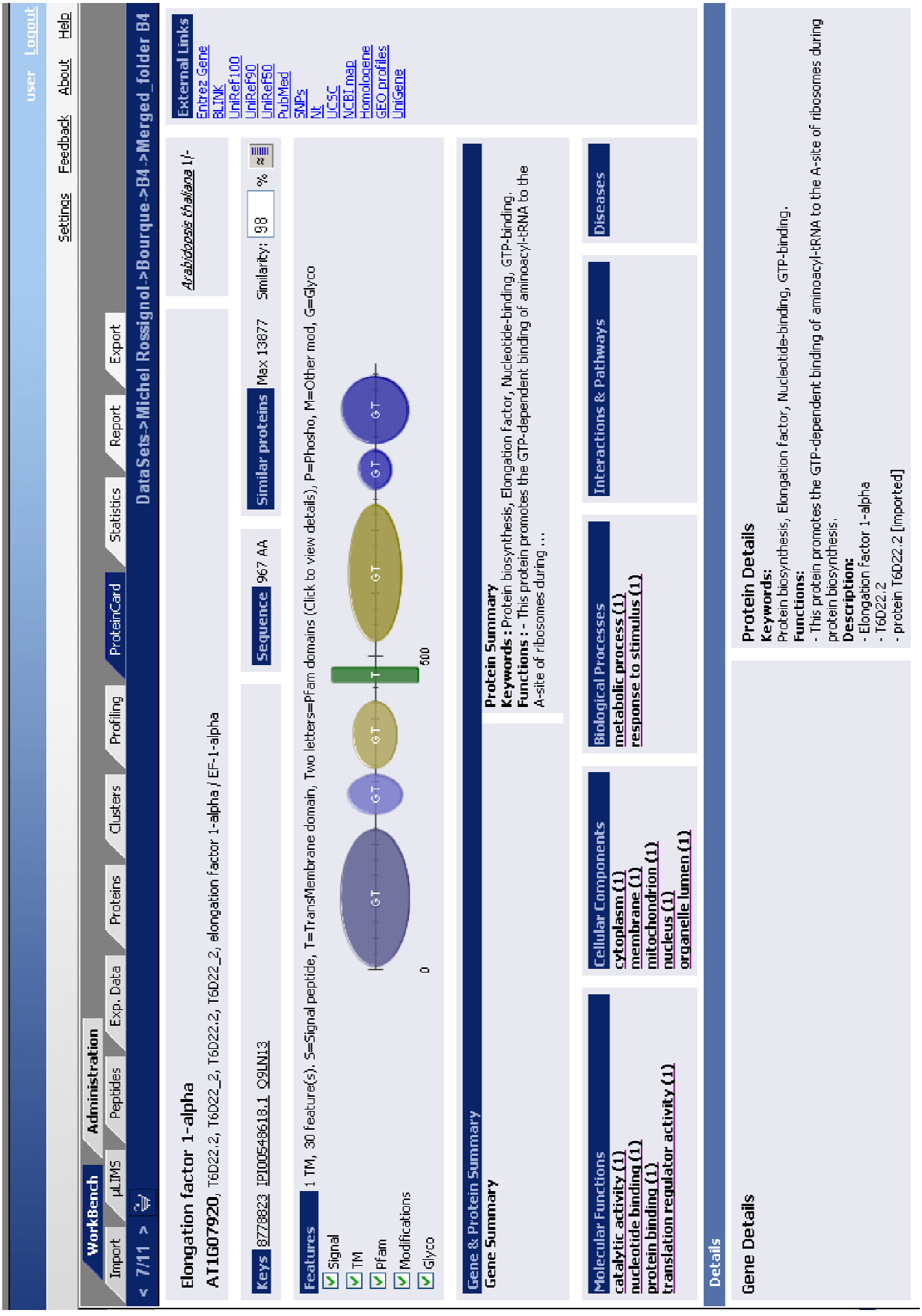


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B4 protéine nucléaire O22582

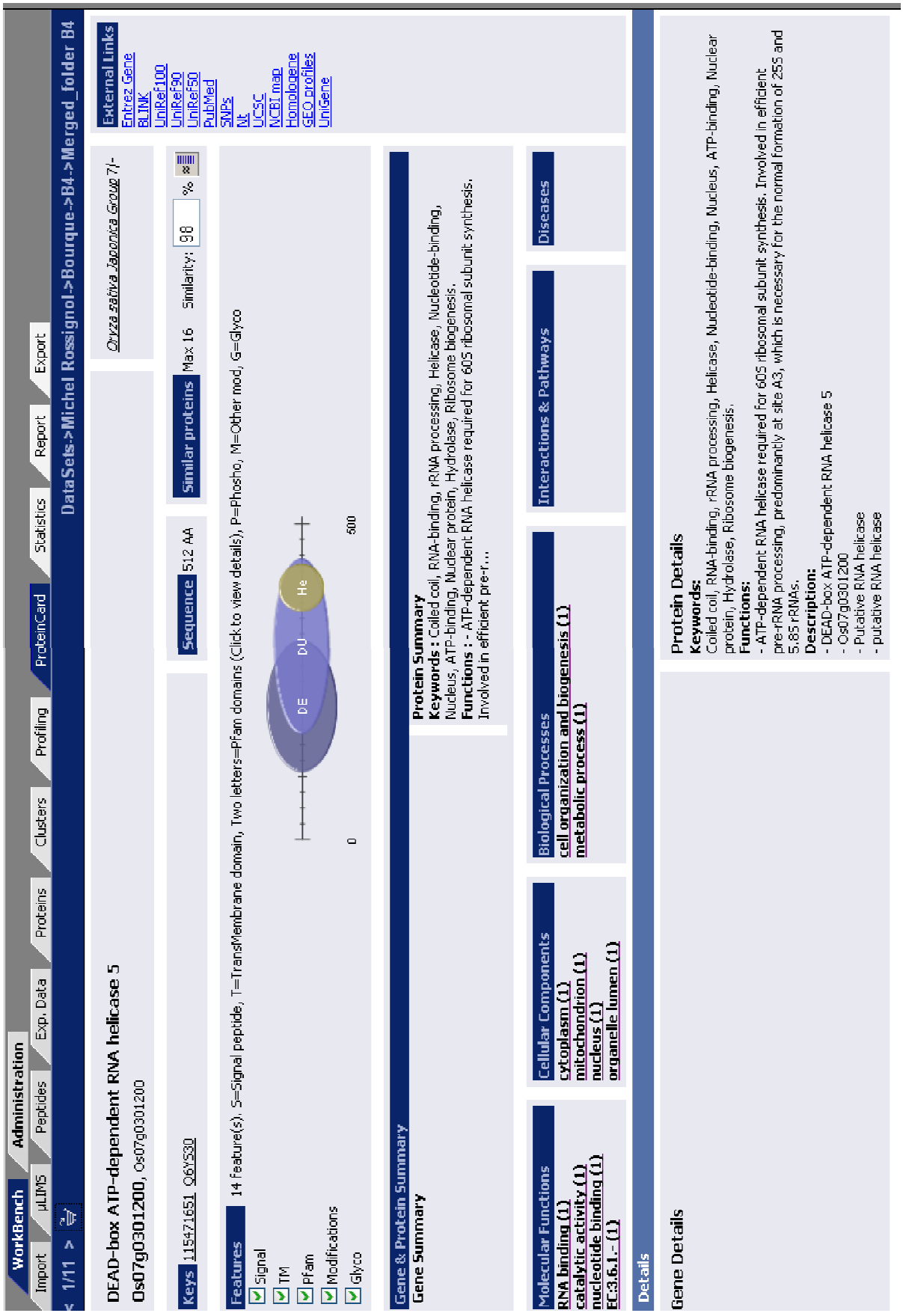


Bande B4 protéine nucléaire Q9LN13



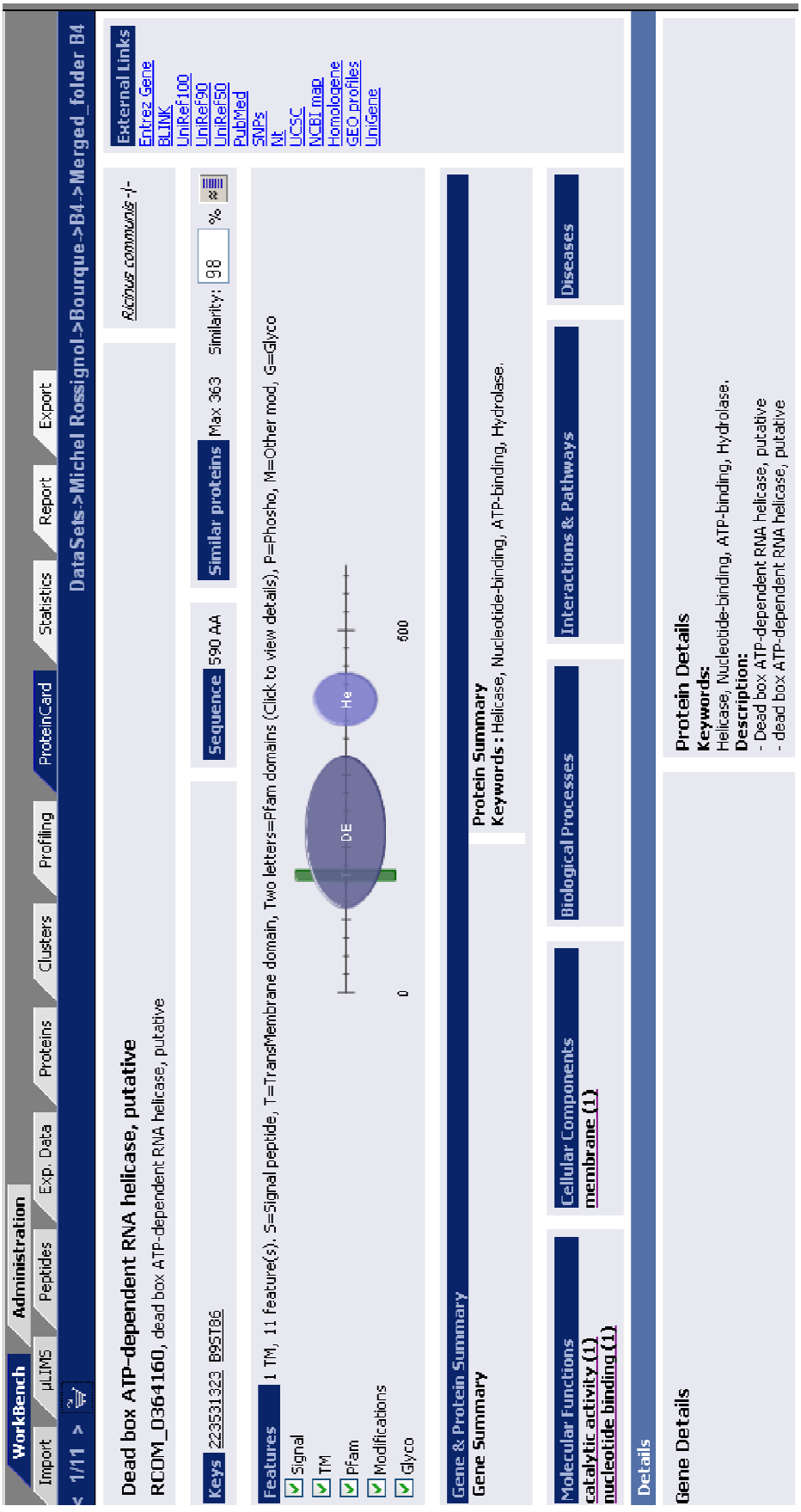
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B4 protéine nucléaire Q6YS30



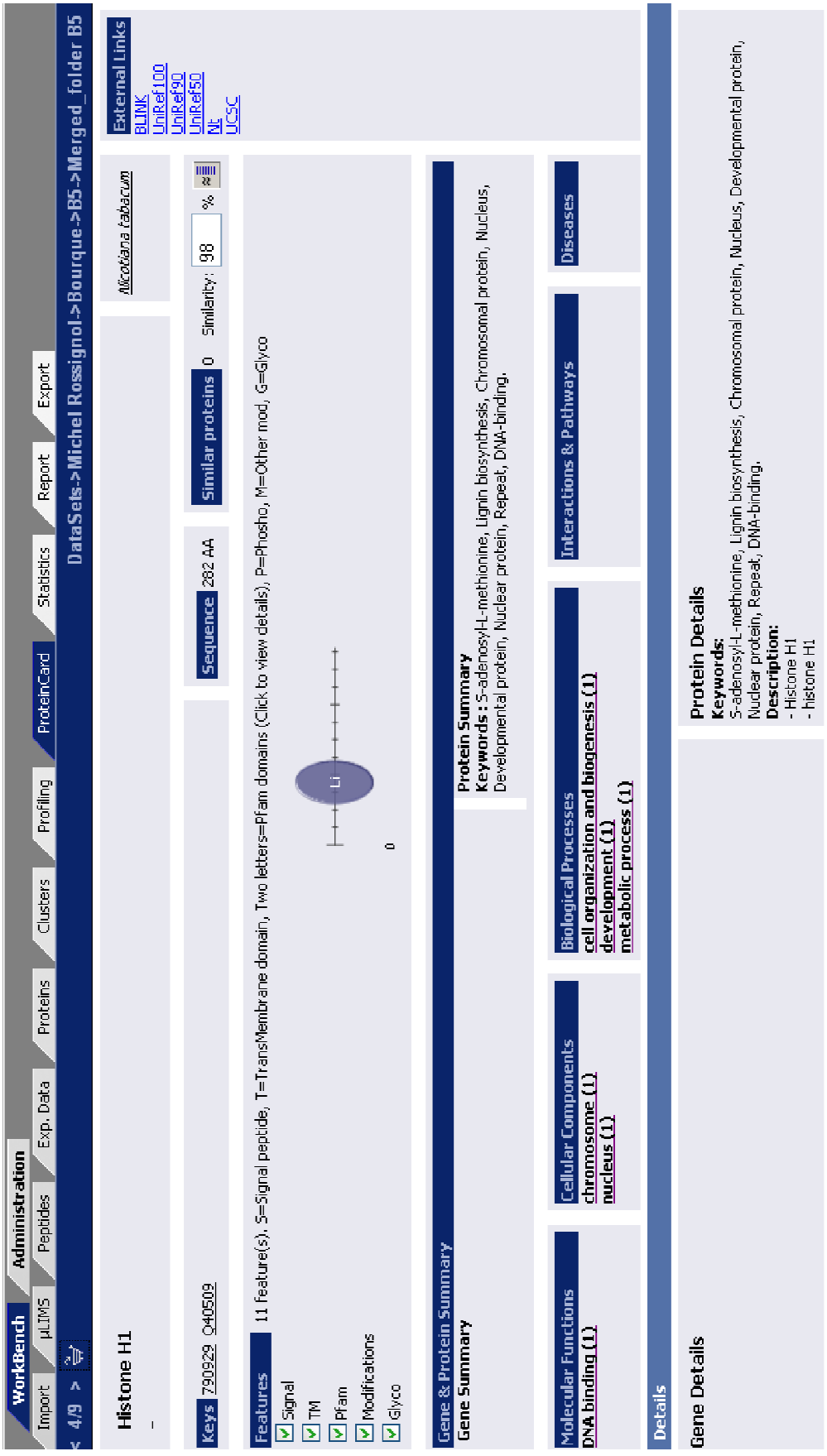
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B4 protéine nucléaire B9ST86



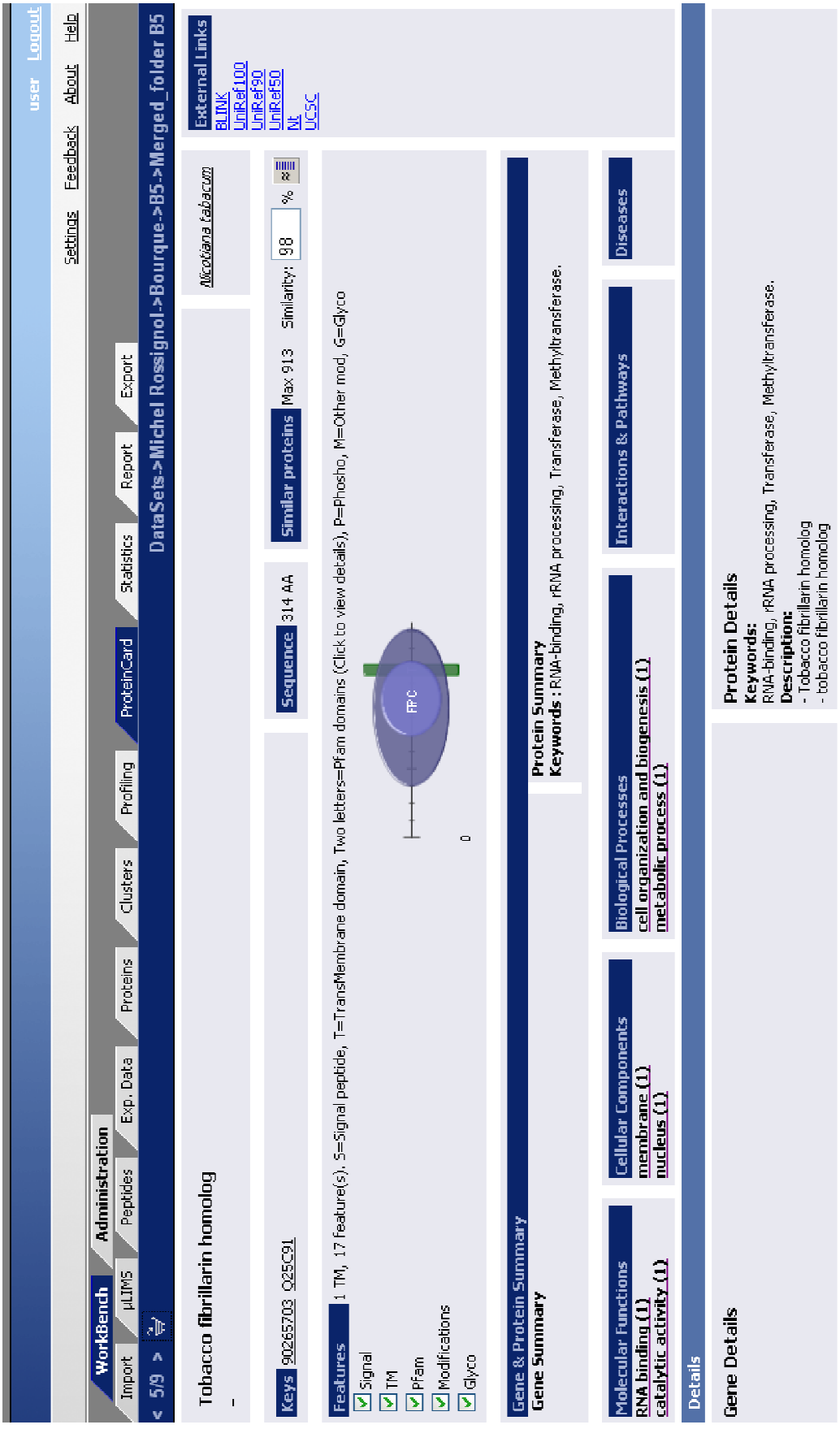
ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

B5 protéine nucléaire Q40509

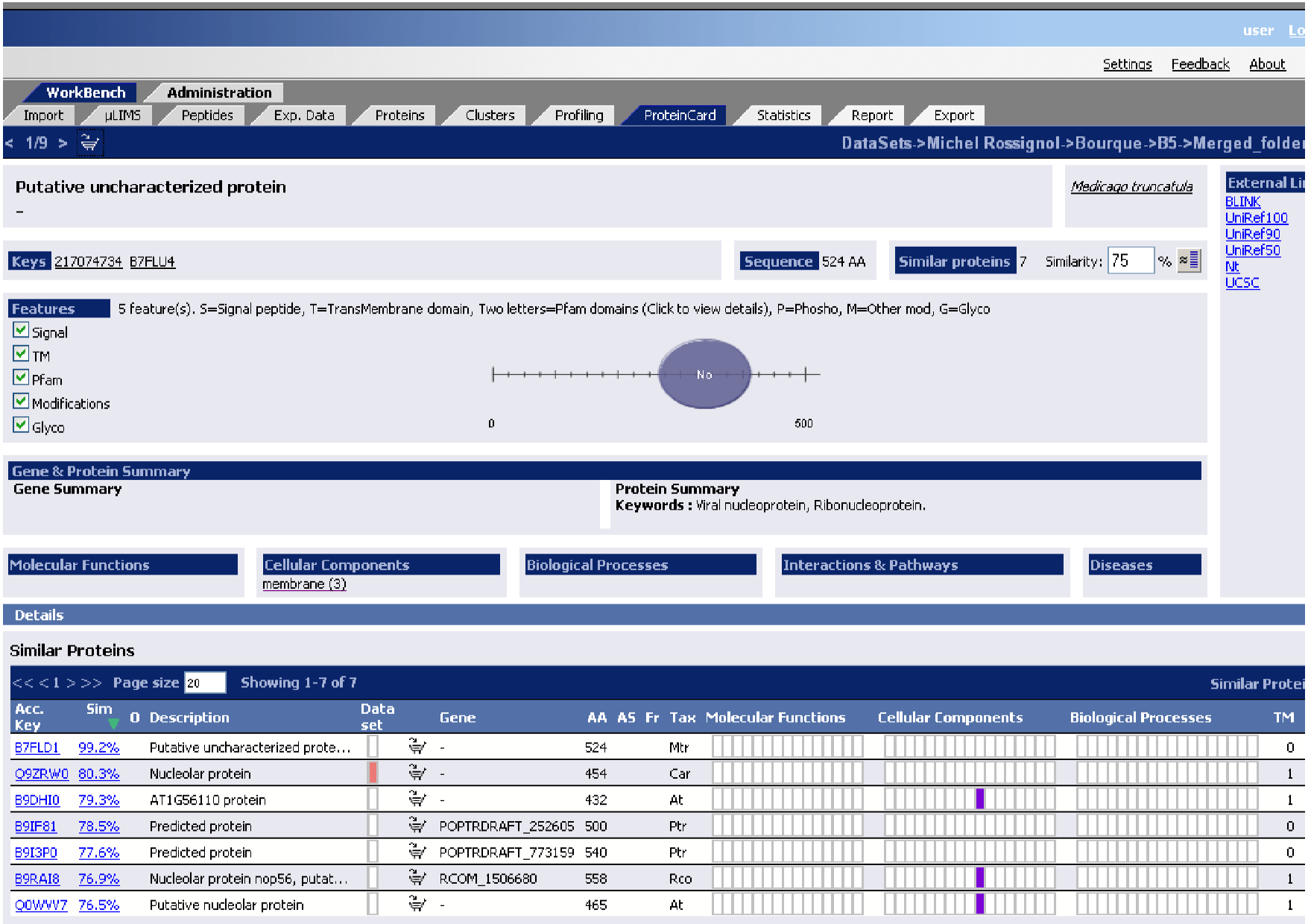


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B5 protéine nucléaire Q25C91

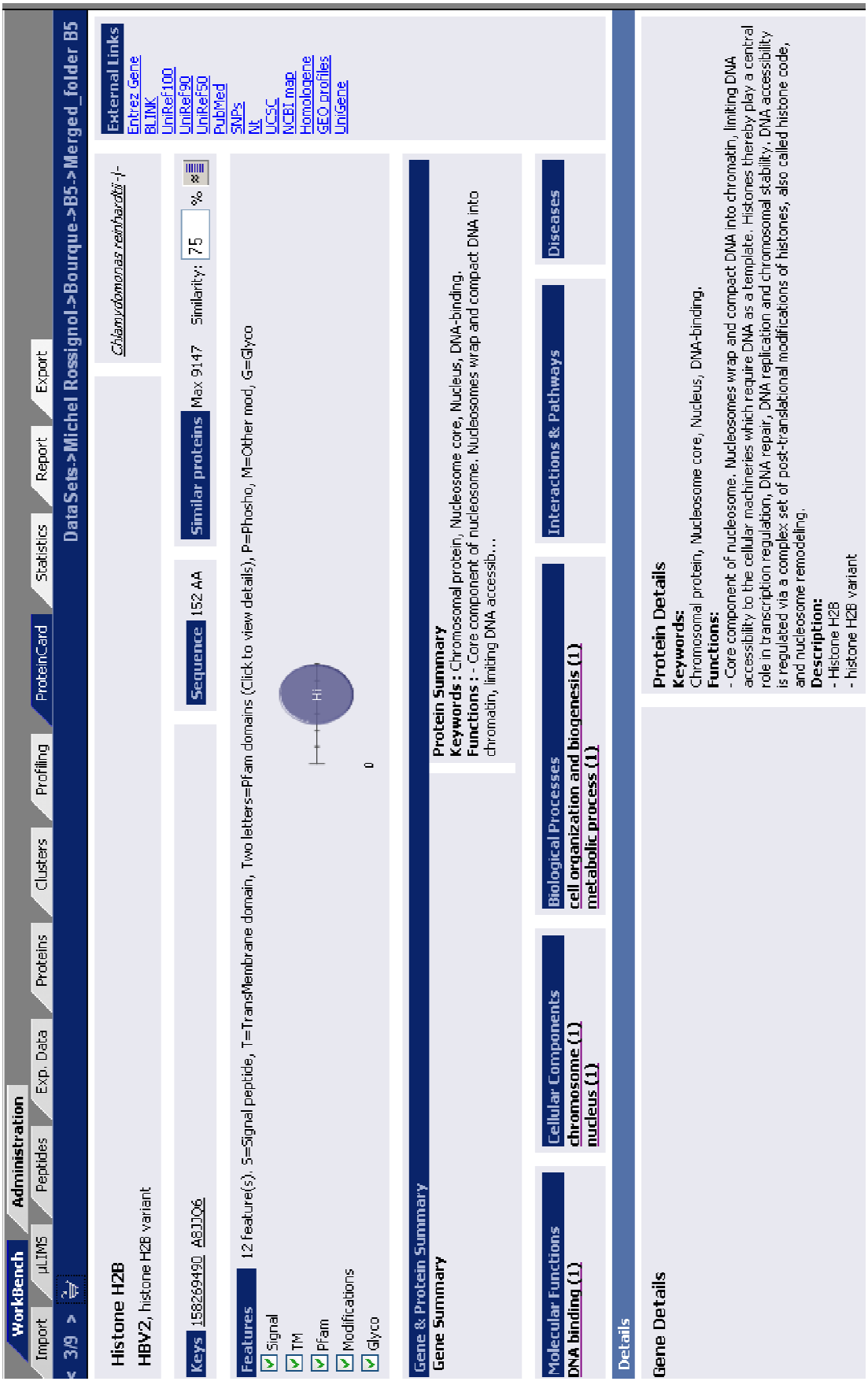


Bande B5 protéine nucléaire B7FLU4



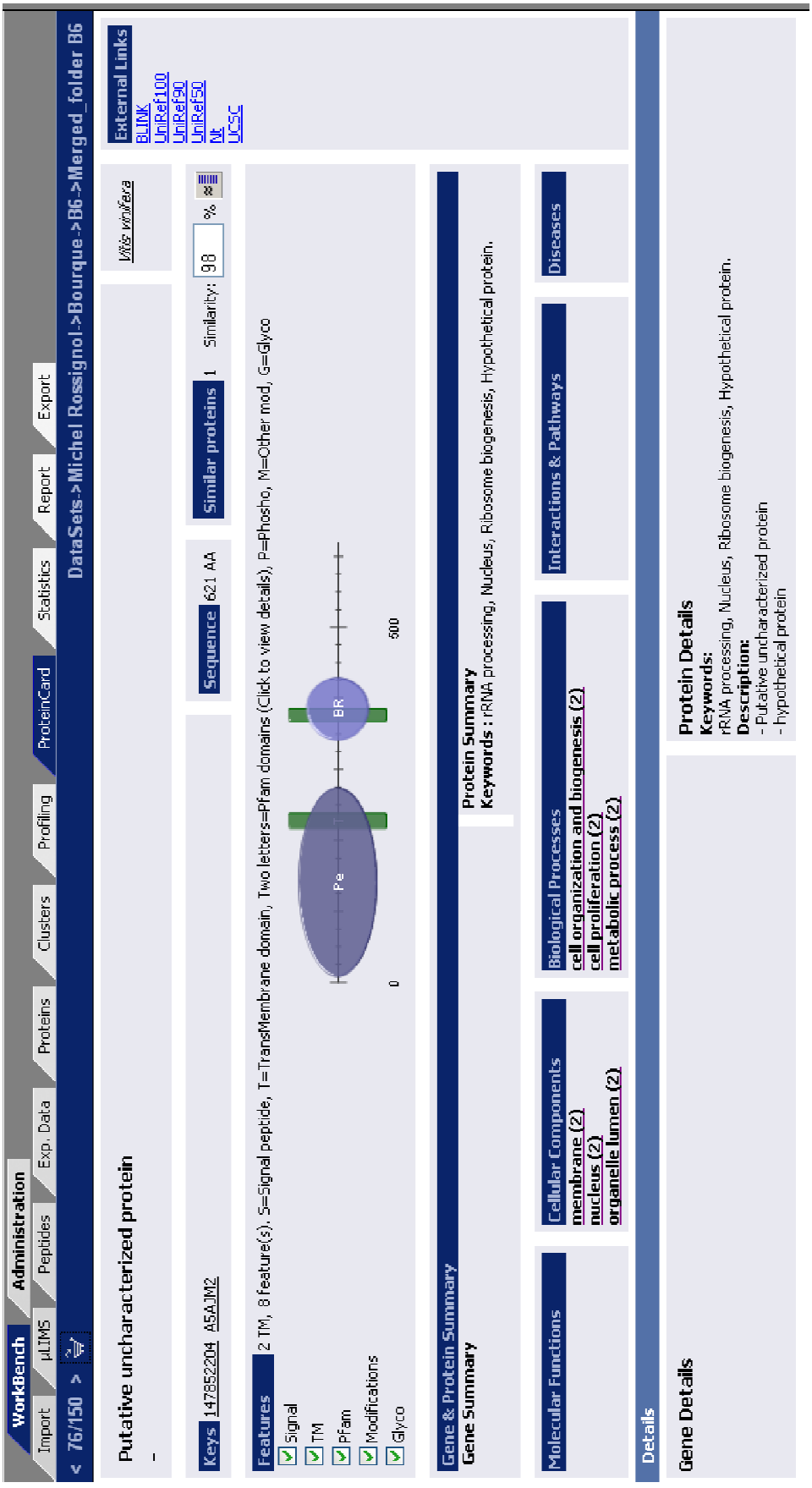
Acc. Key	Sim	O	Description	Data set		Gene	AA	AS	Fr	Tax	Molecular Functions	Cellular Components	Biological Processes	TM
B7FLD1	99.2%		Putative uncharacterized prote...			-	524			Mtr				0
Q9ZRW0	80.3%		Nucleolar protein			-	454			Car				1
B9DHI0	79.3%		AT1G56110 protein			-	432			At				1
B9IF81	78.5%		Predicted protein			POPTRDRAFT_252605	500			Ptr				0
B9I3P0	77.6%		Predicted protein			POPTRDRAFT_773159	540			Ptr				0
B9RAI8	76.9%		Nucleolar protein nop56, putat...			RCOM_1506680	558			Rco				1
Q0WWV7	76.5%		Putative nucleolar protein			-	465			At				1

Bande B5 protéine nucléaire A8JJQ6

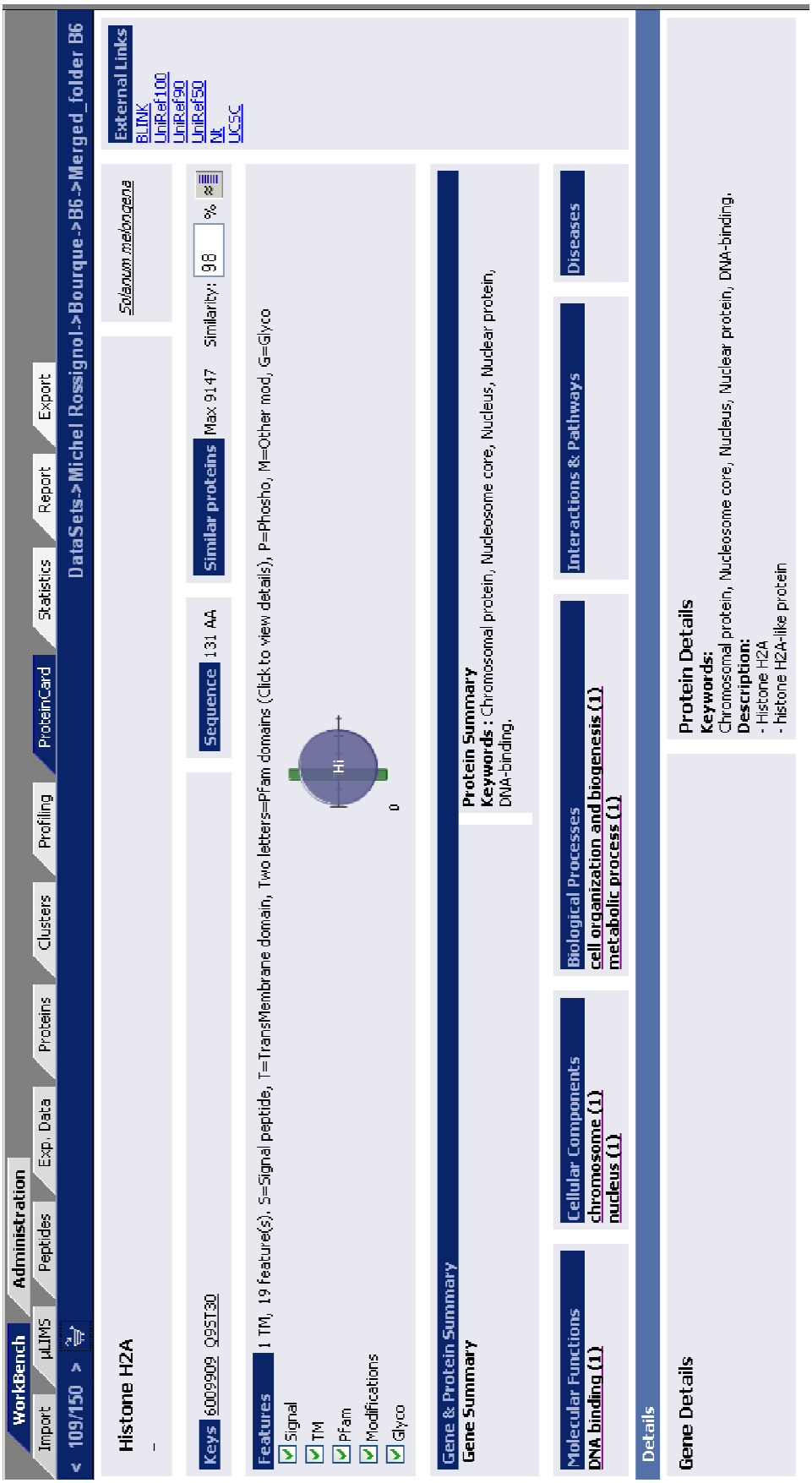


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B6 protéine nucléaire A5AJM2

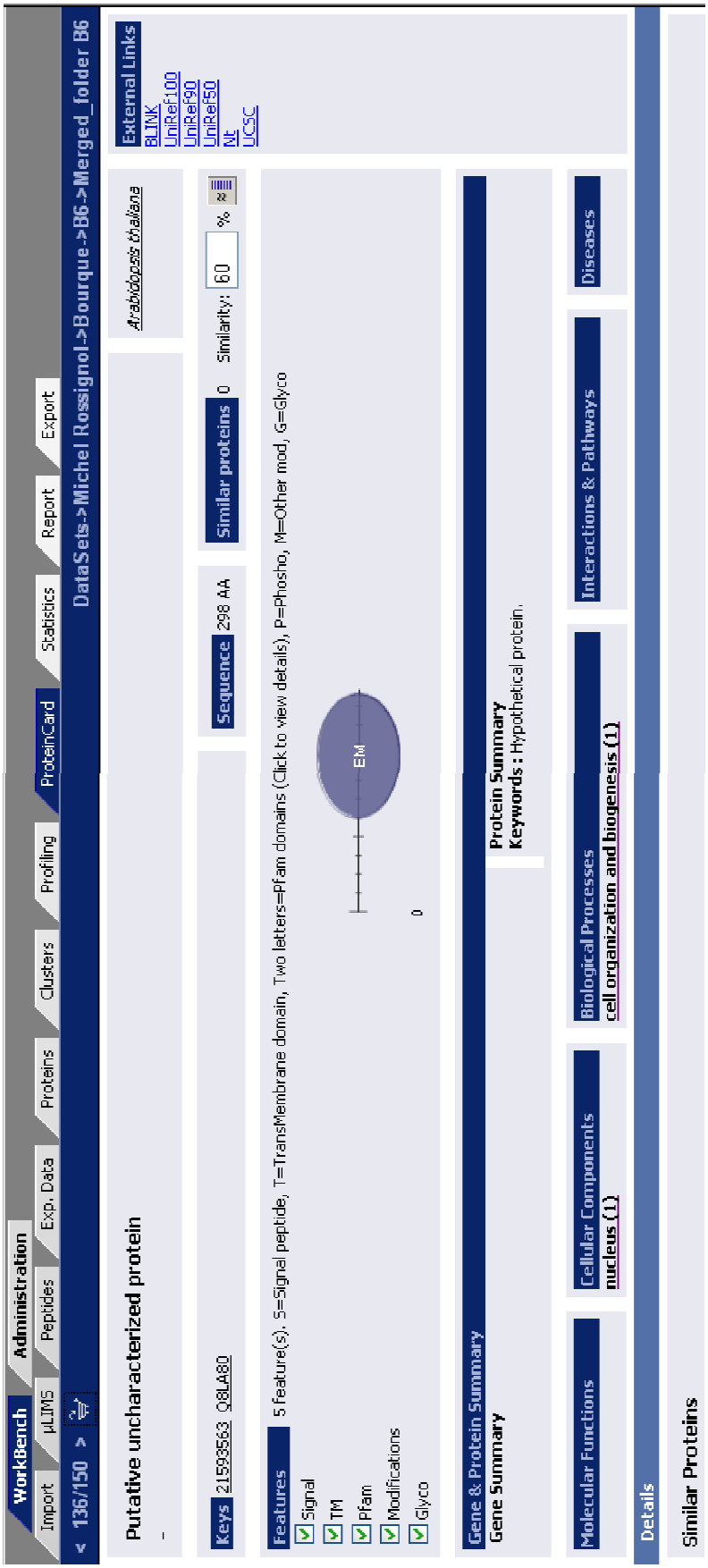


Bande B6 protéine nucléaire Q9ST30

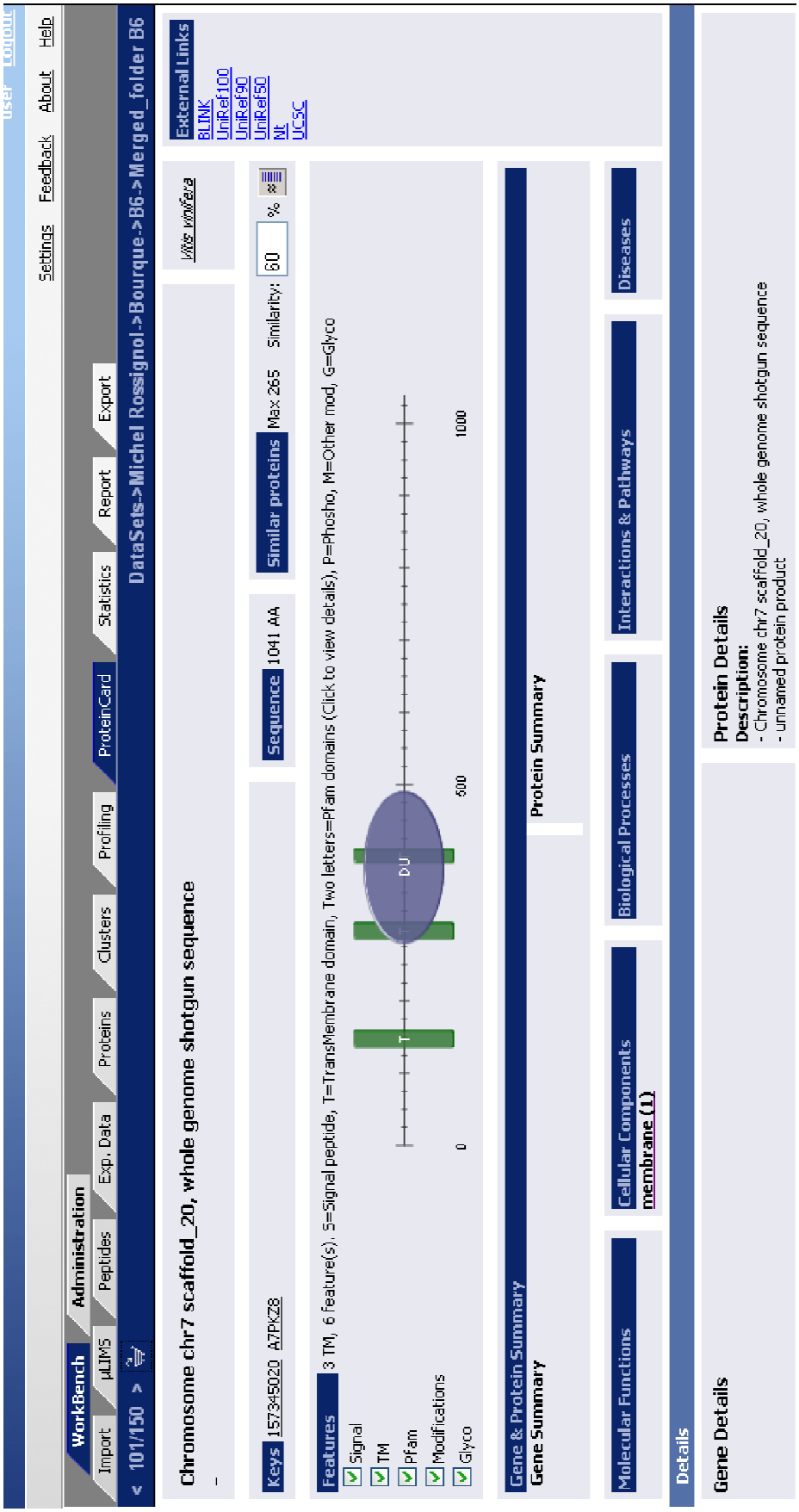


ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B6 protéine nucléaire Q8LA80

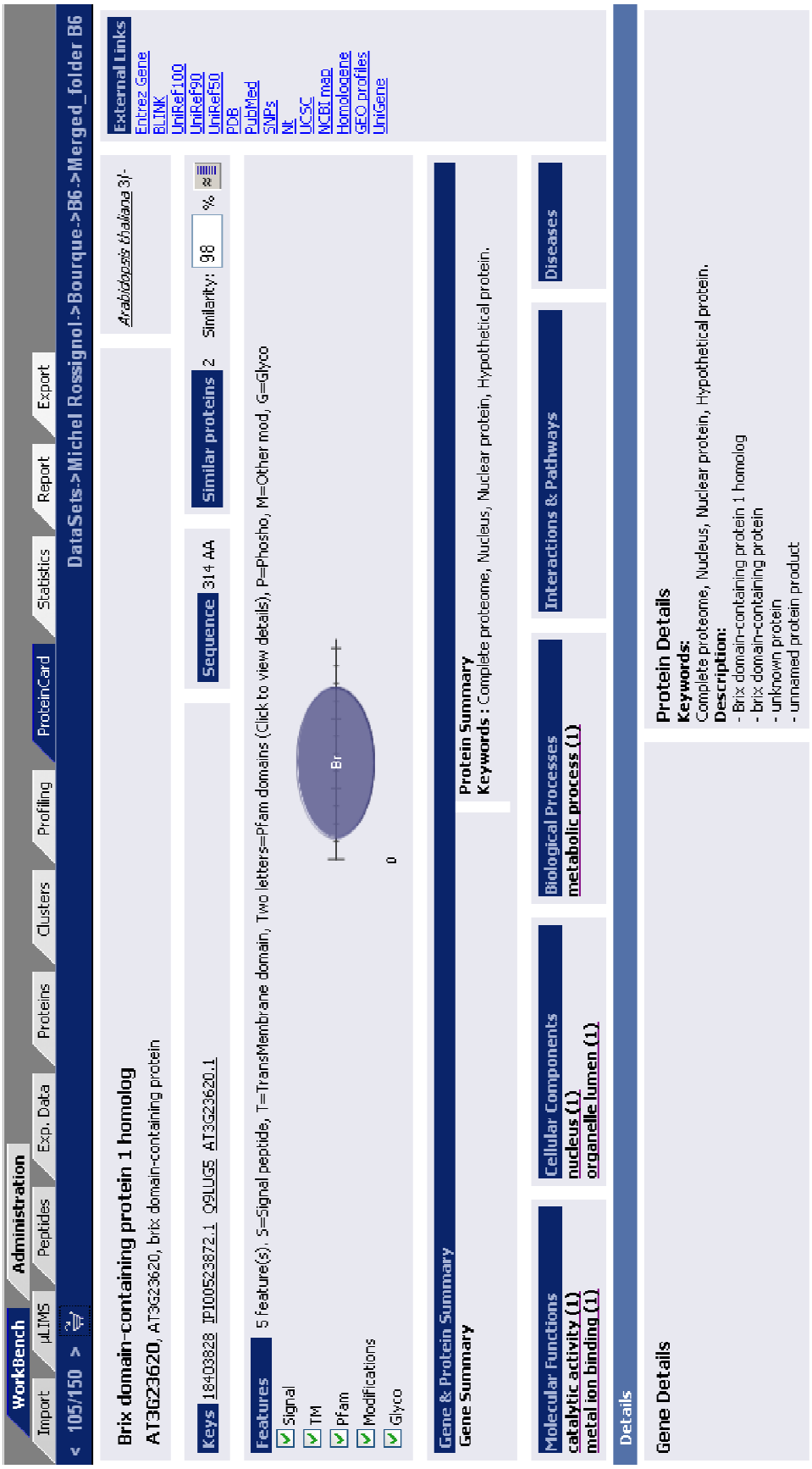


B6 protéine nucléaire A7PKZ8



ANNEXE 2. Résultats des analyses de spectrométrie de masse MS/MS

Bande B6 protéine nucléaire Q9LUG5



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amelot, N., Carrouche, A., Danoun, S., Bourque, S., Haiech, J., Pugin, A., Ranjeva, R., Grima-Pettenati, J., Mazars, C., and Briere, C. (2011). Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. Plant, Cell & Environment **34,** 149-161.

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

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.

Baillieul, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S. (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. The Plant Journal **8,** 551-560.

Balbi, V., and Devoto, A. (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. New Phytologist **177,** 301-318.

Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C., and Moore, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. The Plant Cell **12,** 2201-2218.

Bechinger, C., Giebel, K., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H., and Bastmeyer, M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. Science **285,** 1896-1899.

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., and Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiology and Biochemistry **46,** 493-499.

Benhamou, N., Belanger, R., Rey, P., and Tirilly, Y. (2001). Oligandrin, the elicitin-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants. Plant Physiology and Biochemistry **39,** 681-696.

Besson-Bard, A.l., Griveau, S., Bedioui, F., and Wendehenne, D. (2008). Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. Journal of Experimental Botany **59,** 3407-3414.

Besson-Bard, A.l., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C.l., Gaymard, F.d.r., Taconnat, L., Renou, J.-P., Pugin, A., and 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.

Binet, M.-N., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M., and Pugin, A. (2001). Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein. Plant Physiology **125,** 564-572.

Blanc, S. (2008). Phosphorylation de protéines nucléaires en réponse à l'éliciteur cryptogéine chez le tabac : implication des histones déacétylases de type 2 dans les réactions de défense (Université de Bourgogne), pp. 141.

Blancard, D., Coubard, C., Bonnet, P., Lenoir, M., and Ricci, P. (1998). Mise en évidence d'une protection non spécifique induite par la cryptogéine sur la tige et les feuilles de tabac vis-à-vis de cinq champignons phytopathogènes. Annales du Tabac **30,** 11-20.

Boissy, G., de La Fortelle, E., Kahn, R., Huet, J.-C., Bricogne, G., Pernollet, J.-C., and Brunie, S. (1996). Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. Structure **4,** 1429-1439.

Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology **46,** 189-214.

Boller, T. (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. Current Opinion in Cell Biology **17,** 116-122.

Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual Review in Plant Biology **60,** 379-406.

Bonnet, P., Poupet, A., Abad, P., Venard, P., and Cardin, L. (1986). Induction de nécroses foliaires, de protéines et de résistance dans les interactions tabac-*Phytophthora*. Agronomie **6,** 829-837.

Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P., and Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitins in tobacco and other plants. European Journal of Plant Pathology **102,** 181-192.

Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M.-N., Ricci, P., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitins in tobacco cells. Plant Physiology **118,** 1317-1326.

Bourque, S., Binet, M.-N., Ponchet, M., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (1999). Characterization of the Cryptogein Binding Sites on Plant Plasma Membranes. Journal of Biological Chemistry **274,** 34699-34705.

Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S., and Pugin, A. (2002). The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. Plant Physiology **130,** 2177-2187.

Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Wendehenne, D. (2011). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. New Phytologist **192,** 127-139.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72,** 248-254.

Broekaert, W.F., Terras, F., Cammue, B., and Osborn, R. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiology **108,** 1353-1358.

Broekaert, W.F., Delaure, S., De Bolle, M.F.C., and Cammue, B. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. Annual Review in Phytopathology **44,** 393-416.

Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nurnberger, T. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from Phytophthora transglutaminases. EMBO Journal **21,** 6681-6688.

Chandler, M.T., Marsac, N.T.d., and Kouchkovsky, Y.D. (1972). Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. Canadian Journal of Botany **50,** 2265-2270.

Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M., and Dangl, J.L. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102,** 2549-2554.

Chassot, C., and Métraux, J.-P. (2005). The cuticle as source of signals for plant defense. Plant Biosystems **139,** 28-31.

Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H.-j., Métraux, J.-P., and Lamotte, O. (2008). Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against Botrytis infection. The Plant Journal **55,** 555-567.

Chen, Z.J., and Tian, L. (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1769,** 295-307.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell **124,** 803-814.

Chua, Y.L., Watson, L.A., and Gray, J.C. (2003). The transcriptional enhancer of the pea plastocyanin gene associates with the nuclear matrix and regulates gene expression through histone acetylation. The Plant Cell **15,** 1468-1479.

Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., Ragone, G., Pescatori, M., Zaccagnini, G., Antonini, A., Minetti, G., Martelli, F., Piaggio, G., Gallinari, P., Steinkuhler, C., Clementi, E., Dell'Aversana, C., Altucci, L., Mai, A., Capogrossi, M.C., Puri, P.L., and Gaetano, C. (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105,** 19183-19187.

Conrath, U., Pieterse, C., and Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science **7,** 210-216.

Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., and Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions **19,** 1062-1071.

Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. Trends in Plant Science **16,** 524-531.

Cordier, C., Pozo, M., Barea, J., 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. Molecular Plant Microbe Interactions **11,** 1017-1028.

Dahan, J. (2008). Caractérisation de protéines kinases nucléaires activées dans des cellules de tabac en réponse à la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense (Université de Bourgogne), pp. 162.

Dahan, J., Wawer, I., Besson-Bard, A.l., Astier, J., Gauthier, A., Bourque, S., Lamotte, O., Jeandroz, S., Dobrowolska, G., and Wendehenne, D. (2009). Nitric oxide signaling in tobacco cells elicited by cryptogein : interplays with calcium and protein kinases. In Antoun H, Avis T, Brisson L, Prévost D, Trepanier M (eds). Biology of Plant-Microbe Interactions **7,** 1-7.

Dahan, J., Wendehenne, D., Ranjeva, R., Pugin, A., and Bourque, S. (2010). Nuclear protein kinases: still enigmatic components in plant cell signalling. New Phytologist **185,** 355-368.

Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature **411,** 826-833.

David, G., Neptune, M.A., and DePinho, R.A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. Journal of Biological Chemistry **277,** 23658-23663.

De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. Current Opinion in Plant Biology **5,** 295-299.

De Lorenzo, G., Brutus, A., Savatin, D.V., Sicilia, F., and Cervone, F. (2011). Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). FEBS Letters **585,** 1521-1528.

De Pinto, M., 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 Physiology **130,** 698-708.

Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C.J. (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.

Dixon, R. (2001). Natural products and plant disease resistance. Nature **411,** 843-847.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., and Ellis, J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103,** 8888-8893.

Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nature Review Genetics **11,** 539-548.

Dodds, P.N. (2010). Plant science. Genome evolution in plant pathogens. Science **330,** 1486-1487.

Durner, J.R., Wendehenne, D., and Klessig, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95,** 10328-10333.

Durrant, W., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Annual Review in Phytopathology **42,** 185-209.

Dutartre, L. (2008). Les histones déacétylases de type 2 dans les mécanismes de défense des plantes : caractérisations fonctionnelle et moléculaire (Université Bourgogne), pp. 25.

Earley, K., Lawrence, R.J., Pontes, O., Reuther, R., Enciso, A.J., Silva, M., Neves, N., Gross, M., Viegas, W., and Pikaard, C.S. (2006). Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. Genes & Development **20,** 1283-1293.

Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E.A., and Tumlinson, J.H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101,** 1781-1785.

English, J.J., Davenport, G.F., Elmayan, T., Vaucheret, H., and Baulcombe, D.C. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. The Plant Journal **12,** 597-603.

Eppel, P., Apel, K., and Bohlmann, H. (1997). ESTs reveal a multigene family for plant defensins in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters **400,** 168-172.

Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.-A., and Cooper, R.M. (2008). Peptidoglycan and muropeptides from pathogens Agrobacterium and Xanthomonas elicit plant innate immunity: structure and activity. Chemistry & biology **15,** 438-448.

Fefeu, S., Bouaziz, S., Huet, J.-C., Pernollet, J.-C., and Guittet, E. (1997). Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. Protein Science **6,** 2279-2284.

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. The Plant Journal **18,** 265-276.

Felix, G., and Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. Journal of Biological Chemistry **278,** 6201-6208.

Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F.M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. The Plant Journal **35,** 193-205.

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 Physiology **144,** 367-379.

Ferry, N., Edwards, M.G., Gatehouse, J.A., and Gatehouse, A.M.R. (2004). Plant insect interactions: molecular approaches to insect resistance. Current Opinion in Biotechnology **15,** 155-161.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review in Phytopathology **9,** 275-296.

Fukaki, H., Taniguchi, N., and Tasaka, M. (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. The Plant Journal **48,** 380-389.

Gan, Y., Shen, Y.H., Wang, J., Wang, X., Utama, B., Wang, J., and Wang, X.L. (2005). Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase. Journal of Biological Chemistry **280,** 16467-16475.

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. Molecular Plant-Microbe Interactions **19,** 711-724.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. Trends in Microbiology **3,** 72-74.

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 alicitor-triggered cell death. Plant Signaling & Behavior **2,** 86-95.

Gijzen, M., and Nurnberger, T. (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. Phytochemistry **67,** 1800-1807.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review in Phytopathology **43,** 205-227.

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

Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? Plant, Cell & Environment **26,** 1851-1862.

Govrin, E., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology **10,** 751-757.

Granado, J., Felix, G., and Boller, T. (1995). Perception of fungal sterols in plants (subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells). Plant Physiology **107,** 485-490.

Grayer, R., and Kokubun, T. (2000). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higer plants. Phytochemistry **56,** 253-263.

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

Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S., and Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. Journal of Experimental Botany **57,** 507-516.

Gupta, K., Fernie, A.R., Kaiser, W., and Van Dongen, J. (2010). On the origins of nitric oxide. Trends Plant Science **16**, 160-168.

Hahn, M., Darvill, A., and Albersheim, P. (1981). Host-Pathogen interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiology **68,** 1161-1169.

Halkier, B., and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual Review in Plant Biology **57,** 303-333.

Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years? Annual Review in Phytopathology **37,** 285-306.

Hammoudi, V. (2011). Les histones déacétylases de type 2 chez le tabac : des régulateurs de la mort cellulaire par un éliciteur des réactions de défense phosphorylés par la caséine kinase de type 2 (Université Bourgogne), pp. 20.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature **410,** 1099-1103.

Hendrix, J., and Guttman, S. (1970). Sterol or calcium requirement by *Phytophthora parasitica* var. nicotianae for growth on nitrate nitrogen. Mycologia **62,** 195-198.

Higaki, T., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Kadota, Y., Hasezawa, S., Sano, T., and Kuchitsu, K. (2007). Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. Plant Cell & Physiology **48,** 1414-1425.

Hoyos, M.E., and Zhang, S. (2000). Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. Plant Physiology **122,** 1355-1364.

Huckelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annual Review in Phytopathology **45,** 101-127.

Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103,** 10098-10103.

Iriti, M., and Faoro, F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and animals. Mycopathologia **164,** 57-64.

Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and $O_2^{\cdot-}$ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94,** 4800-4805.

Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Metraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2001). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in plants. European Journal of Plant Pathology **107,** 29-37.

Jensen, O. (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. Current Opinion in Chemical Biology **8,** 33-41.

Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO Journal **19,** 4004-4014.

Johnson, C.A., Padget, K., Austin, C.A., and Turner, B.M. (2001). Deacetylase activity associates with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. Journal of Biological Chemistry **276,** 4539-4542.

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

Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1989). A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Analytical Biochemistry **183,** 139-143.

Kamoun, S., Young, M., Glascock, C., and Tyler, B. (1993). Extracellular protein elicitors from Phytophthora: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions **6,** 15-25.

Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R., and Barak, S. (2007). STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. Plant Physiology **145,** 814-830.

Katz, V., Thulke, O., and Conrath, U. (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. Plant Physiology **117,** 1333-1339.

Kauss, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R., and Conrath, U. (1992). Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. The Plant Journal **2,** 655-660.

Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P., and Ricci, P. (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitin-induced systemic acquired resistance in tobacco. Plant Physiology **110,** 365-376.

Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in arabidopsis. Cell **121,** 749-759.

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 otato NADPH oxidase. The Plant Cell **19,** 1065-1080.

Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M., and Ogasawara, N. (1998). Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. Journal of Biological Chemistry **273,** 31985-31991.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004). The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. The Plant Cell **16,** 3496-3507.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227,** 680-685.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology. **48,** 251-275.

Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nature Review Immunology **4,** 181-189.

Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J.r., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. Plant Physiology **135,** 516-529.

Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., and 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.

Laquitaine, L., Gomès, E., François, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S., and Coutos-Thévenot, 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. Molecular Plant-Microbe Interactions **19,** 1103-1112.

Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. The Plant Journal **15,** 773-781.

Lebrun-Garcia, A., Chiltz, A., Gout, E., Bligny, R., and Pugin, A. (2002). Questioning the role of salicylic acid and cytosolic acidification in mitogen-activated protein kinase activation induced by cryptogein in tobacco cells. Planta **214,** 792-797.

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

Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. Cell Calcium **38,** 527-538.

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

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. Molecular Plant-Microbe Interactions **13,** 821-829.

Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.L., Boudon-Padieu, E., Nicole, M., and Blein, J.P. (2003). Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. Phytopathology **93,** 1308-1319.

Lherminier, J., Elmayan, T., fromentin, J., Elaraqui, 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. Molecular Plant-Microbe Interactions **22,** 868-881.

Li, F., Luo, H., Ding, Y., and Li, X. (2004). Influence of sodium butyrate on growth of HT-29 colon carcinoma cells and expression of inducible nitric oxide synthase. Chinese Journal of Cancer **23,** 416-420.

Li, D., Liu, H., Zhang, H., Wang, X., and Song, F. (2008). OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. Journal of Experimental Botany **59,** 2133-2146.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods **25,** 402-408.

Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence: the players and protagonists. Current Opinion in Plant Biology **10,** 466-472.

Lochman, J., and Mikes, V. (2006). Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. Plant Molecular Biology **62,** 43-51.

Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. Current Opinion in Plant Biology **8,** 532-540.

Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M., and Billiar, T. (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. Immunological Reviews **220,** 60-81.

Martin-Hernandez, A.M., Dufresne, M., Hugouvieux, V., Melton, R., and Osbourn, A. (2000). Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. Molecular Plant-Microbe Interactions **13,** 1301-1311.

Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M., Oneill, M., Albersheim, P., and Darvill, A. (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. The Plant Journal **1,** 333-343.

Mattagajasingh, I., Kim, C.-S., Naqvi, A., Yamamori, T., Hoffman, T.A., Jung, S.-B., DeRicco, J., Kasuno, K., and Irani, K. (2007). SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104,** 14855-14860.

Menke, F.L.H., Kang, H.-G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D., and Klessig, D.F. (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions **18,** 1027-1034.

Mikolajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszynska, G., Klessig, D.F., and Dobrowolska, G. (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid–induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. The Plant Cell **12,** 165-178.

Milat, M.L., Ricci, P., Bonnet, P., and Blein, J.P. (1990). Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Phytochemistry **30,** 2171-2173.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104,** 19613-19618.

Monteiro, J., and Cano, M. (2011). SIRT1 deacetylase activity and the maintenance of protein homeostasis in response to stress: an overview. Protein and Peptide Letters **18,** 167-173.

Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rustérucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F., and Triantaphylidès, C. (2005). Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiology **138,** 1516-1526.

Mooney, S.M., Goel, A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L., and Janknecht, R. (2010). Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. Journal of Biological Chemistry **285,** 30443-30452.

Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., and Klessig, D.F. (2010). NO synthesis and signaling in plants: where do we stand? Physiological Plantarum **138,** 372-383.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? Journal of Experimental Botany **59,** 501-520.

Mur, L.A.J., Mandon, J., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., and Prats, E. (2011). Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary. Plant Science **181,** 509-519.

Naton, B., Hahlbrock, K., and Schmelzer, E. (1996). Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. Plant Physiology **112,** 433-444.

Newmann, M., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M., and Dow, J. (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. Plant Journal **29,** 487-495.

Nicholson, R., and Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review in Phytopathology **30,** 369-389.

Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. Cell **78,** 449-460.

Nürnberger, T., and Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Current Opinion in Plant Biology **5,** 318-324.

Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunological Reviews **198,** 249-266.

Osman, H., Vauthrin, S.b., Mikes, V., Milat, M.-L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J.-P. (2001). Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. Molecular Biology of the Cell **12,** 2825-2834.

Palma, K., Thorgrimsen, S., Malinovsky, F.G., Fiil, B.K., Nielsen, H.B.r., Brodersen, P., Hofius, D., Petersen, M., and Mundy, J. (2010). Autoimmunity in Arabidopsis *acd11* is mediated by epigenetic regulation of an immune receptor. PLOS Pathogen **6,** 1-12.

Panabieres, F., Ponchet, M., Allasia, V., Cardin, L., and Ricci, P. (1997). Characterization of border species among Pythiaceae: several Pythium isolates produce elicitins, typical proteins from Phytophthora species. Mycological Research **101,** 1459-1468.

Pare, P.W., and Tumlinson, J.H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiology **121,** 325-332.

Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science **318,** 113-116.

Peck, S. (2006). Phosphoproteomics in Arabidopsis: moving from empirical to predictive science. Journal of Experimental Botany **57,** 1523-1527.

Peixoto, P., and Lansiaux, A. (2006). Histone deacetylases inhibitors: from TSA to SAHA. Bulletin of Cancer **93,** 27-36.

Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. The Plant Cell **10,** 2103-2113.

Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.P., Rey, P., Tirilly, Y., and Benhamou, N. (2000). Oligandrin: a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. Plant Physiology **124,** 379-395.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J., and Van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. The Plant Cell **8,** 1225-1237.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P., and Van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. The Plant Cell **10,** 1571-1580.

Pieterse, C.M.J., and Van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends in Plant Science **4,** 52-58.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology **5,** 308-316.

Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. Current Opinion in Plant Biology **12,** 421-426.

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. Molecular Plant-Microbe Interactions **16,** 553-564.

Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.L., Mikes, V., Montillet, J.-L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y., and Blein, J.P. (1999). Are elicitins cryptograms in plant-oomycete communications? Cell Mol Life Science **56,** 1020-1047.

Postel, S., and Kemmerling, B. (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. Seminars in Cell and Developmental Biology **20,** 1025-1031.

Pozo, M., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J., and Azcon-Aguilar, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to Phytophthora infection in tomato plants. Journal of Experimental Botany **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. The Plant Cell **9,** 2077-2091.

Ren, D., Yang, K.-Y., Li, G.-J., Liu, Y., and Zhang, S. (2006). Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. Plant Physiology **141,** 1482-1493.

Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, 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. European Journal of Biochemistry **183,** 555-563.

Ricci, P., Panabieres, F., Bonnet, P., Maia, N., Ponchet, M., Devergne, J., Marais, A., Cardin, L., Milat, M.L., and Blein, J.P. (1993). Proteinaceous elicitors of plant defense responses. In: Fritig B, Legrand M. Kluwer Academic Publishers**,** 121-135.

Ron, M., and Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. The Plant Cell **16,** 1604-1615.

Rusterucci, C., Stallaert, V., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J.P. (1996). Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitins in Nicotiana. Plant Physiology **111,** 885-891.

Sagi, M., and Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. Plant Physiology **141,** 336-340.

Schilmiller, A., and Howe, G. (2005). Systemic signaling in the wound response. Current Opinion in Plant Biology **8,** 369-377.

Schornack, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M.E., Bos, J., Haas, B.J., Zody, M.C., Nusbaum, C., Win, J.O.E., Thines, M., and Kamoun, S. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. Molecular Plant Pathology **10,** 795-803.

Segré, C., and Chiocca, S. (2011). Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. Journal of Biomedicine and Biotechnology **2011,** 1-15.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiology and Biochemistry **46,** 941-950.

Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. Current Opinion in Plant Biology **12,** 459-464.

Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W. (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. Science **301,** 1230-1233.

Shapiro, A., and Zhang, C. (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in Arabidopsis. Plant Physiology **127,** 1089-1101.

Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.-P. (2002). The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. The Plant Journal **31,** 137-147.

Singh, B.N., Zhang, G., Hwa, Y.L., Li, J., Dowdy, S.C., and Jiang, S.-W. (2010). Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. Expert Review of Anticancer Therapy **10,** 935-954.

Soliday, C., Flurkey, W., Okita, T., and Kolattukudy, P. (1984). Cloning and structure determination of complementary DNA for cutinase: an enzyme involved in fungal penetration for plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81,** 3939-3943.

Stergiopoulos, I., and de Wit, P. (2009). Fungal effector proteins. Annual Review in Phytopathology **47,** 233-263.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J.-P. (1997). Systemic acquired resistance. Annual Review in Phytopathology **35,** 235-270.

Stuehr, D., Santolini, J., Wang, Z., Wei, C., and Abak, S. (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. Journal of Biological Chemistry **279,** 36167-36170.

Stünkel, W., Peh, B.K., Tan, Y.C., Nayagam, V.M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Ni, B., Entzeroth, M., and Wood, J. (2007). Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. Biotechnology Journal **2,** 1360-1368.

Suty, L., Blein, J.P., Ricci, P., and Pugin, A. (1995). Early changes in gene expression in tobacco cells elicited with cryptogein. Molecular Plant-Microbe Interactions **8,** 644-651.

Takahashi, Y., Nasir, K.H.B., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2007). A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. The Plant Journal **49,** 1030-1040.

Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.-M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions **19,** 1159-1166.

Tanguy, J., and Martin, C. (1972). Phenolic compounds and hypersensitive reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. Phytochemistry **11,** 19-28.

Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P., and Pugin, A. (1995). Involvement of free calcium in action of cryptogein a proteinaceous elicitor of HR in tobacco cells. Plant Physiology **109,** 1025-1031.

Terce-Laforgue, T., Huet, J.-C., and Pernollet, J.-C. (1992). Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. Plant Physiology **98,** 936-941.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America **95,** 15107-15111.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K., and Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiology **121,** 1093-1101.

Thulke, O., and Conrath, U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. The Plant Journal **14,** 35-42.

Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A.R., Hanson, A.D., and Klee, H.J. (2006). Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103,** 8287-8292.

Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C.M., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2001). The Arabidopsis ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. Plant Physiology **125,** 652-661.

Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B., and Turlings, T. (2007). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. The Plant Journal **49,** 16-26.

Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K., and Jones, J.D.G. (1998). Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). The Plant Journal **14,** 365-370.

Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99,** 517-522.

Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Current Opinion in Plant Biology **8,** 397-403.

Truman, W., Bennett, M., Turnbull, C., and Grant, M. (2010). Arabidopsis auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. Plant Physiology **152,** 1562-1573.

Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., and Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean β-glucan-elicitor-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94,** 1029-1034.

van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends in Biochemical Sciences **23,** 454-456.

Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry **70,** 1581-1588.

Van Etten, H., Mansfield, J., Bailey, J., and Farmer, E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". The Plant Cell **6,** 1191-1192.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review in Phytopathology **36,** 453-483.

Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review in Phytopathology **44,** 135-162.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Van Der Heijdt, W., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions **21,** 1609-1621.

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. Molecular Plant-Microbe Interactions **19,** 429-440.

Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Maume, B., Osman, H., and Blein, J.P. (1999). Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. Biochimica et Biophysica Acta **1419,** 335-342.

Verhagen, B., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. Molecular Plant-Microbe Interactions **17,** 895-908.

Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J. (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. The Plant Cell **6,** 959-965.

Vlot, A.C., Klessig, D.F., and Park, S.W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). Current Opinion in Plant Biology **11,** 436-442.

Vorwerk, S., Somerville, S., and Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends in Plant Science **9,** 203-209.

Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M.B., Huber, S.C., and Clouse, S.D. (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. Developmental cell **15,** 220-235.

Wawer, I., Bucholc, M., Astier, J., Anielska-Mazur, A., Dahan, J., Kulik, A., Wyslouch-Cieszynska, A., Zareba Koziol, 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. Biochemical Journal **429,** 73-83.

Wendehenne, D., Binet, M.-N., Blein, J.P., Ricci, P., and Pugin, A. (1995). Evidence for specific, high affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. FEBS Letters **374,** 203-207.

Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H.l.n., and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. The Plant Cell **14,** 1937-1951.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. The Plant Journal **27,** 581-590.

Wilson, C., Anglmayer, R., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. (1995). Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli*, and characterization of multiple mitogen-activated-protein kinases from tobacco. European Journal of Biochemistry **233,** 249-257.

Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochemical Journal **322,** 681-692.

Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D., and Miki, B. (2000). Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **22,** 19-27.

Yamaguchi, Y., Pearce, G., and Ryan, C.A. (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103,** 10104-10109.

Yang, K.-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. Proceeding of National Academy of Science of the United States of America **98,** 741-746.

Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G., and Doke, N. (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H_2O_2 Accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. The Plant Cell **15,** 706-718.

Yu, L. (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92,** 4088-4094.

Zhang, S., and Klessig, D.F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95,** 7225-7230.

Zhang, S., Liu, Y., and Klessig, D.F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitins. The Plant Journal **23,** 339-347.

Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science **6,** 520-527.

Zhang, S., and Liu, Y. (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. The Plant Cell **13,** 1877-1889.

Zhao, J., Davis, L., and Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances **23,** 283-333.

Zheng, B., Han, M., Shu, Y.N., Li, Y.J., Miao, S.B., Zhang, X.H., Shi, H.J., Zhang, T., and Wen, J.K. (2011). HDAC2 phosphorylation-dependent Klf5 deacetylation and RAR alpha acetylation induced by RAR agonist switch the transcription regulatory programs of p21 in VSMCs. Cell Research **21,** 1487-1508.

Zhou, Q., Agoston, A.T., Atadja, P., Nelson, W.G., and Davidson, N.E. (2008). Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. Molecular Cancer Research **6,** 873-883.

Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America **97,** 12920-12925.

Zimmermann, S., Frachisse, J.M., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., and Guern, J. (1998). Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. Plant Physiology **36,** 665-674.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. Cell **125,** 749-760.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current Opinion in Immunology **20,** 10-16.

Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. Current Opinion in Plant Biology **12,** 414-420.

Liste des publications

Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M. and Wendehenne, D. (2011). Histone deacetylases of type 2 as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. New Phytologist **192,** 127-139.

Dahan, J., Koen, E., Dutartre, A., Lamotte, O. and Bourque, S. (2011). Post-translational modifications of nuclear proteins in the response of plant cells to abiotic stresses. In Tech **2**, 77-112.

Bourque, S., Dutartre, A., Simon-Plas, F. and Wendehenne, D. Functional relations between nitric oxide, hydrogen peroxide and histone deacetylases of type 2 during the cryptogein-induced cell death in tobacco. En preparation.

Liste des communications

Communications écrites

Dutartre A., Klinguer A., Wendehenne D. and Bourque S. **(2011)**: « Histones deacetylases of type 2 as new regulators of cryptogein-induced cell death in tobacco», *International Symposium « Communication in plants and their responses to the environment »*, 19-22 Mai, Halle (Saale, Allemagne).

Dutartre A., Klinguer A., Wendehenne D. et Bourque S. **(2011)**: « Les histones déacétylases de type 2 : de nouveaux régulateurs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac », *XVIIème Forum des Jeunes Chercheurs*, 16-17 Juin, Dijon (France).

Dutartre A., Wendehenne D., Pugin A. et Bourque S. **(2009)**: « Les histones déacétylases de type 2 : de nouveaux répresseurs de la mort cellulaire chez les plantes », *XVème Forum des Jeunes Chercheurs*, 25-26 Juin, Dijon (France).

Communications orales

Dutartre A., Wendehenne D. et Bourque S. **(2010)**: « Les histones déacétylases de type 2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac », *XVIème Forum des Jeunes Chercheurs*, 07-08 Juin, Besançon (France).

Dutartre A., Wendehenne D. et Bourque S. **(2010)**: « Les histones déacétylases de type 2 dans le contrôle de la mort cellulaire induite par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac », *2ème Colloque Microbe et Environnement SPE, 02-04 Juin*, Sophia-Antipolis (France).

Abstract

Cryptogein, which is secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, is a proteinaceous elicitor of plant defense reactions that activates a set of signaling events leading to the hypersensitive response and to systemic acquired resistance. Although the early cytosolic signaling events induced by cryptogein are well described, the only nuclear events characterized to date are the variations in free calcium concentrations and defense-related gene expression. The characterization of the activation of cytosolic protein kinases, including WIPK and SIPK, by phosphorylation in response to cryptogein highlights the key-role played by posttranslational modifications in cryptogein-induced signaling events in tobacco cells. In this context, purification/sequencing approaches revealed that two redundant isoforms of type-2 nuclear histone deacetylases, NtHD2a and NtHD2b, were rapidly phosphorylated in cryptogein-treated tobacco cells.

This thesis work is part of a comprehensive study of the role of NtHD2a/b in the establishment of the cell death process in tobacco cells and of the hypersensitive response *in planta*, in response to cryptogein. By using a pharmacological approach and overexpression and RNA interference-based approaches, we confirmed the involvement of NtHD2a/b as negative regulators of elicitin-induced cell death and we achieved a better understanding of cell death signaling events. The molecular events that underly the cell death process appear particularly complex and seem to involve the modulation of defense-related gene expression, *de novo* protein synthesis and protein kinase activation such as WIPK and SIPK.

The study of (de)/acetylation events in tobacco cells treated by cryptogein and invalidated in *NtHD2a/b* expression suggests a role for posttranslational modifications in cryptogein-induced cell death.

Keywords : *Nicotiana tabacum*, cryptogein, hypersensitive response, cell death, histone deacetylases, cell signaling, posttranslational modifications.

Résumé

La cryptogéine, sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, est un éliciteur protéique des réactions de défense qui active chez le tabac un ensemble d'événements de signalisation conduisant à la mise en place d'une mort cellulaire de type réponse hypersensible et d'une résistance systémique acquise. La caractérisation de la modulation de l'activité de kinases cytosoliques, dont SIPK et WIPK, par des événements de phosphorylation en réponse à la cryptogéine, traduit la place majeure que tiennent les modifications post-traductionnelles dans la cascade de signalisation induite dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine. Il s'avère que la signalisation cellulaire induite par la cryptogéine, et impliquant ces protéines kinases, converge entre autre vers le noyau à travers la modulation de l'activité d'éléments nucléaires par phosphorylation. Dans ce contexte, d'importants travaux de purification/séquencage, visant à identifier les protéines nucléaires cibles de ces activités kinases, ont permis d'identifier deux isoformes redondantes d'histones désacétylases de type 2 nommés NtHD2a et NtHD2b qui sont rapidement phosphorylées en réponse à la cryptogéine dans les cellules de tabac.

Ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude du rôle de NtHD2a/b dans l'établissement du processus de mort cellulaire des cellules de tabac et de la RH *in planta* en réponse à la cryptogéine. Par des approches de pharmacologie ainsi que des approches de surexpression ou d'invalidation de l'expression de *NtHD2a/b* chez le tabac, nous avons d'une part confirmé l'implication de NtHD2a/b en tant que régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine ou d'autres élicitines, et d'autre part mieux appréhendé les événements de la cascade de signalisation prépondérants dans l'établissement de cette mort cellulaire. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mise en place de la mort cellulaire apparaissent complexes et semblent notamment impliquer la modulation de l'expression de gènes de défense, la synthèse *de novo* de protéines ainsi que l'activation de protéines kinases, dont notamment WIPK et SIPK.

Des travaux relatifs à l'étude des événements de (dé)/acétylation dans les cellules de tabac traitées par la cryptogéine et invalidées dans l'expression de *NtHD2a/b* suggèrent le concours de modifications post-traductionnelles de protéines nucléaires telles que l'acétylation dans la mise en place de la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez le tabac.

Mots Clés : *Nicotiana tabacum*, cryptogéine, réponse hypersensible, mort cellulaire, histones déacétylases, signalisation cellulaire, modifications post-traductionnelles.