



HAL
open science

Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses

Pauline Trapet

► To cite this version:

Pauline Trapet. Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS053 . tel-01418768

HAL Id: tel-01418768

<https://theses.hal.science/tel-01418768>

Submitted on 17 Dec 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.



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



ÉCOLE DOCTORALE
PRES | Bourgogne | Franche-Comté
Environnements - Santé

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS SANTE N°554

UMR 1347 Agroécologie INRA/Université de Bourgogne/AgroSup Dijon
Pôle mécanismes et gestions des interactions plantes-microorganismes – ERL CNRS 6300
Equipe NO et réponses de défense de la plante

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Sciences de la vie

Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses

Par Pauline TRAPET

Le 15 décembre 2015 devant le Jury composé de :

F. BOUTEAU	Maître de conférences, Université Paris 7-Denis Diderot	Rapporteur
E. MEILHOC	Maître de conférences, INSA Toulouse	Rapporteur
F. GAYMARD	Directeur de Recherche, INRA Montpellier	Examineur
D. WIPF	Professeur, Université de Bourgogne	Président du Jury
A. BESSON-BARD	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Co-encadrante
D. WENDEHENNE	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur de thèse



Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du Jury, Mme Meilhoc, Mr Bouteau, Mr Gaymard et Mr Wipf d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à vous d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie également très sincèrement mes encadrants David, Angélique et Laure. David à l'époque de la L3 et en particulier au cours des TP de Biochimie, tu m'as donné l'envie et la possibilité de découvrir le monde de la recherche. Tu m'as accueillie dans ton équipe dès ce moment, qui a été décisif et m'a conforté dans ma volonté de continuer dans la recherche. Par la suite, tu as été un encadrant présent et à l'écoute, travailler avec toi a été très formateur. Un immense merci pour ton investissement dans ce travail et la confiance que tu m'as accordée.

Angélique et Laure, merci beaucoup à vous deux pour votre confiance et votre investissement. Vos conseils, vos coups de main pendant les « coups de bourre » sur les grosses manips et votre présence au jour le jour, pour faire face aux soucis ou aux questions de dernière minute, ont été très utiles et très appréciables. Je vous en remercie infiniment.

Merci également à Philippe et à Sylvie pour votre investissement dans mon travail et vos conseils.

Mr Lamotte !!! Un grand merci à toi aussi, tu m'as encadrée pendant mon Master 2... Quel courage !! Ta bonne humeur, ton humour, tes conneries, et n'oublions pas, tes conseils, me manqueront.

Agnès tu m'as très souvent aidé pour de nombreuses manips (phénotypage, hydroponie...que des trucs trop fun quoi ...) tu mérites donc tous mes remerciements d'un point de vue professionnel mais aussi d'un point de vue personnel. Tu es une personne toujours souriante, disponible et à l'écoute, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés.

Merci également à tous les autres membres de l'équipe NO, qui contribuent à l'ambiance chaleureuse et amicale qui règne dans les labos et qui constitue un réel plus. Merci donc à Sylvain (et ses tours de vélo... On refait les 8 heures ? Mais avec des cales !), Stéphane (pour ton humour et ta charcutaille), Cécile, Hoai Nam et Carine (pour nos petites pauses thé « filles »), Sébastien, Claire et Siham (un merci pour ton aide notamment durant le M2 et pendant les enseignements). Un merci particulier également à Valérie pour tes conseils tant pour les manips de biologie moléculaire que pour l'enseignement et pour ta bonne humeur.

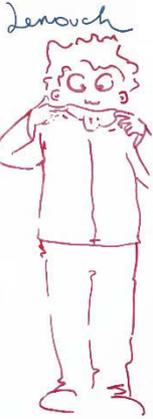
Un grand merci également à tous les collègues des équipes mycorhize/membrane et vigne pour leurs aides, leurs conseils, les prêts de matériels et leur bonne humeur tout simplement. Merci également aux différentes équipes du premier étage.

Remerciements



Je tiens à remercier très chaleureusement Hernan Terenzi et les personnes de son équipe qui m'ont accueillie au Brésil, et m'ont permis de découvrir et de me former sur des nombreuses techniques. Je remercie également le personnel de la Plateforme de Chimie du Végétal de l'INRA de Versailles de m'avoir accueillie et formée au dosage d'hormones.

Un grand, un immense merci à Charline, ma belle-sœur pour ses relectures et les corrections du manuscrit (et aussi un peu ma maman à la fin).



Un très grand merci également à tous mes collègues et amis doctorants, post-docs ou stagiaires. Lisou, merci pour tout (les pauses, le sport, les cinés, les restos (on fait nos grosses), les délires, ta bonne humeur... etc). Modinette et Yukoko, merci pour vos jolis dessins et vos imaginations débordantes. Titi (Vinc/Vincent)... quoi t'es toujours là ? Merci pour ton humour et tous les moments passés de la L3 en passant par la Suède jusqu'à la soutenance. Chachou, collègue de conseil de service et « patronne » du journal club, merci pour tout. Merci également à Cannelle, Nassima et Valentina, mes très chères collègues de bureau. Merci à Lénoc pour ses conseils (pro/perso) et sa fameuse soupe (je l'ai pas oublié elle est trop bonne !). Pinpin Damien, merci d'avoir essayé de m'apprendre le rubik's cube, j'y étais presque... mais hélas je crois que j'ai presque tout oublié. Un grand merci pour m'avoir aidée au cours de leur stage, à Hugo (j'attends toujours mes crêpes) et à Killian (ou le petit ou le Kik'... merci pour ton aide cet hiver qui m'a été très utile et aussi pour tous les fous rires). Merci également à Daphnée, Carole, Nora, Alice, Ian, Marine, Emilie, Julie, Chloé, Heber, Léo, Antonin, Samuel, Jérémie pour l'ambiance du labo et les moments passés tous ensemble.

Je remercie également mes amis : Linda & Julie, Maxou & Charlou (le duo de choc), Thomas & Marie (courage pour la thèse à Colmar), Julie, Franck ainsi qu'Adan (mon petit chou) et le futur bébé, Alex, Audrey et Nico (The team), les copains de la fac avec qui j'ai passé de très bons moments, Romain, Thibault, tous les copains de la corpo (& Cie), mon Polo et sa descendance, Julia, Jon, Nono, P'tit Ben, les membres de l'Aquaclub 21 avec qui j'espère pouvoir repartir vite à la découverte du merveilleux monde aquatique, les amis/collègues de Concoeur, tous mes amis Erasmus (& Cie) et mes voisins dijonnais.

Et pour finir un immense merci à toute ma famille, mes parents, mes frères, mes grands-parents, tantes, oncles, cousins, cousines, pièces rapportées et à Henry de m'avoir soutenue et encouragée tout ce temps.



LISTE DES ABREVIATIONS	7
I. INTRODUCTION	10
1. Interactions plantes-microorganismes	10
1.1. Des interactions bénéfiques diverses	10
1.2. Impact bénéfique des microorganismes sur la nutrition	11
1.3. Impact bénéfique des microorganismes sur la défense	11
1.4. La sélection du microbiome par la plante.....	13
2. Le fer	16
2.1. L'assimilation du fer chez les plantes	16
2.1.1. L'assimilation du fer : La stratégie I.....	17
2.1.2. L'assimilation du fer : La stratégie II.....	18
2.2. Le transport du fer <i>in planta</i>	19
2.3. Le fer intracellulaire : utilisation et stockage.....	22
2.4. La régulation de l'homéostasie du fer	25
3. Les sidérophores bactériens	30
3.1. Généralités.....	30
3.2. Les pyoverdines produites par les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	31
3.3. Synthèse des pyoverdines	32
3.4. Les récepteurs et l'assimilation du fer	33
3.5. La régulation	35
4. L'implication du fer et des sidérophores dans les défenses immunitaires	37
4.1. Le concept d'immunité des plantes.....	37
4.1.1. La <i>PAMP triggered immunity</i> (PTI)	38
4.1.2. L' <i>effector triggered immunity</i> (ETI)	39
4.1.3. La résistance systémique acquise.....	40
4.1.4. La résistance systémique induite	43
4.2. L'implication des sidérophores dans l'immunité des plantes.....	45
4.2.1. Les sidérophores, des facteurs de virulence	45
4.2.2 Effets des sidérophores de PGPR sur les défenses de la plante et l'ISR	46
5. La balance croissance-défense	49
5.1. Dialogues moléculaires entre les différentes hormones	50
5.1.1. Les auxines	50
5.1.2. Les brassinostéroïdes (BR).....	51
5.2.3. Les gibbérellines (GA)	53
5.2. Les autres éléments pouvant influencer la balance croissance-défense.....	54
6. Projet de thèse	56
6.1 Contexte général de l'étude	56
6.3. Objectifs de la thèse	57
II. MATERIELS ET METHODES	59
1. Matériels biologiques	59
1.1. Matériel végétal.....	59
1.2. Suspensions cellulaires d' <i>A. thaliana</i>	59

Sommaire

1.3. Matériel bactérien	59
1.4. Matériel fongique	60
2. Conditions de culture des plantes	60
2.1. Préparation des graines	60
2.2. Culture en terre	60
2.3. Culture hydroponique.....	61
3. Protocole expérimental	62
4. Méthodes	63
4.1. Purification de l'apo-pyoverdine	63
4.2. Analyse phénotypique des effets de la pyoverdine.....	64
4.2.1. Mesure de la croissance et analyse macroscopique	64
4.2.2. Dosage des chlorophylles et des anthocyanes.....	64
4.3. Détermination de la concentration en métaux par ICP-AES (<i>inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy</i>)	65
4.3.1. Prélèvements et préparation des échantillons	65
4.3.2. Minéralisation des échantillons	66
4.3.3. Dosage par ICP-AES	66
4.4. Détermination de la teneur en hormones par UPLC/MS-MS	67
4.4.1. Prélèvements et préparation des échantillons	67
4.4.2. Extraction des hormones.....	67
4.4.3. Analyse des échantillons par UPLC/MS-MS.....	68
4.5. Détection de l'assimilation de la pyoverdine par la plante	68
4.5.1. Immunodétection de la pyoverdine par dot-Blot.....	68
4.5.2. Immuno-détection de la pyoverdine dans les tissus par test ELISA	69
4.5.3. Détection de la pyoverdine dans les tissus par analyse de l'abondance en azote 15 (¹⁵ N)	70
4.6. Analyse de la résistance des plantes traitées par la pyoverdine aux microorganismes pathogènes	71
4.6.1. Infection par <i>B. cinerea</i>	71
4.6.2. Infection par <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC 3000	72
4.7. Etude de la production de NO et de ROS en réponse à la pyoverdine	72
4.7.1. Mesure de la production de NO	72
4.7.2. Mesure de la production de ROS.....	73
4.8. Analyse de l'expression des gènes en réponse à la pyoverdine	74
4.8.1. Extraction des ARN	74
4.8.2. Préparation des ARN pour l'analyse transcriptomique	74
4.8.3. Réalisation et analyse des données de l'étude transcriptomique	74
4.8.4. Synthèse d'ADNc	76
4.8.5. Réaction de PCR en temps réel et quantification relative pour la validation de l'analyse transcriptomique.....	76
4.9. Analyse des mutants.....	77
4.9.1. Extraction rapide d'ADN génomique.....	77
4.9.2. Criblage des mutants par PCR	77
4.9.3. Phénotypage des mutants.....	78
4.10. Analyse statistique des données	78
III. ANALYSE DE L'INCIDENCE DE L'APO-PYOVERDINE DE <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> C7R12 SUR LE STATUT EN FER, L'IMMUNITÉ ET LA CROISSANCE DE PLANTES D'<i>A. THALIANA</i>	80
1. Contexte et principaux résultats	80
1.1. Contexte et objectifs de l'étude	80

Sommaire

1.2. Résultats principaux.....	81
2. Article scientifique n°1 : The <i>Pseudomonas fluorescens</i> siderophore pyoverdine weakens <i>Arabidopsis thaliana</i> defense in favour of growth in iron deficient conditions	83
3. Résultats complémentaires	84
3.1. Analyse phénotypique complémentaire.....	84
3.2. Analyse de la production de ROS et de NO en réponse à la pyoverdine.....	85
3.3. Test de sensibilité à la bactérie pathogène <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000.....	86
4. Discussion	88
4.1. La pyoverdine est internalisée par les racines d' <i>A. thaliana</i>	88
4.2. La pyoverdine améliore la croissance de la plante.....	89
4.3. La pyoverdine modifie l'homéostasie du fer de la plante.....	90
4.4. La pyoverdine diminue le taux d'ABA des plantes cultivées dans un milieu carencé en fer.....	93
4.5. La pyoverdine affecte négativement les réponses de défense de la plante en condition de carence en fer.....	94
4.6. La pyoverdine agit sur la balance croissance-défense.....	95
4.7. Conclusions et perspectives.....	96
IV. ETUDE DU MODE D'ACTION DU BABA ET LIENS AVEC L'HOMÉOSTASIE DU FER CHEZ <i>A. THALIANA</i>	99
1. Contexte de l'article et principaux résultats	99
1.1. Présentation de l'acide β -aminobutyrique.....	99
1.2. Contexte et objectifs de l'étude.....	99
1.3. Résultats principaux.....	100
1.4. Ma contribution.....	100
2. Article scientifique n°2 : Beta-Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in <i>Arabidopsis thaliana</i>: Link with Iron Homeostasis	102
3. Résultats complémentaires	103
3.1. Test de la sensibilité à <i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000.....	103
V. AUTRES CONTRIBUTIONS.....	106
1. Introduction	106
2. Ma contribution	108
3. Article scientifique n°3 : NO signaling in plant immunity: A tale of messengers	110
4. Article scientifique n°4 : There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca^{2+} Signaling	111
VI. CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES.....	113
ANNEXES.....	118
1. Milieux de culture	118

Sommaire

1.1. Linsmaier & Skoog	118
1.2. King B	118
1.3. SM succinate medium.....	118
1.4. Potato Dextrose Agar.....	119
1.5. Solution nutritive	119
1.6. Potato Dextrose Broth	119
RÉFÉRENCES	121

Liste des abréviations

ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>	EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ABA	acide abscissique	EGTA	acide éthylène glycol tétra-acétique
AFB	<i>auxin signaling F-box</i>	EIL1	<i>ethylene insensitive3-like1</i>
AHA	H ⁺ -ATPase	EIN3	<i>ethylene insensitive3</i>
ARF	<i>auxin response factor</i>	ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ATM	ABC transporteur mitochondrial	epi-HMA	acide 3-épihydroxymuginéique
ATP	adénosine triphosphate	Et	éthylène
AUX/IAA	<i>auxin-inducible/indole-3-acetic acid inducible</i>	ETI	<i>effector triggered immunity</i>
AzA	acide azélaïque	FH	frataxines
BABA	acide β-aminobutyrique	FIT	<i>FER like iron deficiency induced transcription factor</i>
BAK1	<i>BRI1-associated receptor kinase 1</i>	FLS2	<i>flagellin sensing 2</i>
BES1	<i>BRI1-EMS-suppressor 1</i>	FNP	<i>ferroportin</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	FRD	<i>ferric reductase defective</i>
BIN2	<i>brassinosteroid insensitive 2</i>	FRO	<i>ferric-chelate reductase oxidase</i>
BKI1	<i>BRI1 kinase inhibitor 1</i>	G3P	glycérol-3-phosphate
BR	brassinostéroïdes	GA	gibbérelline, <i>gibberellic acid</i>
BRI1	<i>brassinosteroid insensitive 1</i>	GID1	<i>GA insensitive dwarf 1</i>
BSU1	<i>BRI1 suppressor 1</i>	GSNO	S-nitrosoglutathion
BTS	<i>ubiquitine-ligase E3 BRUTUS</i>	HBI1	<i>homolog of Bee2 interacting with IBH1</i>
BZR1	<i>brassinazole-resistant 1</i>	HHE	hémérythrine
COI1	<i>coronatine insensitive 1</i>	IAA	acide indole 3-acétique
Col-0	Columbia-0	IBH1	<i>IL11 binding bhlh protein 1</i>
cPTIO	2-(4-carboxyphényl)-4,4,5,5-tetraméthylimidazoline-1-oxyl-3-oxyde	ICP-AES	spectrométrie d'émission atomique par plasma à
DA	abiétane diterpénoïde <i>dehydroabietinal</i>	IDED	<i>iron deficiency-induced ethylene-dependent</i>
DAB	Acide α-γ-di-amino-butyrique	IRT	<i>iron regulated transporter</i>
DAF	4,5-diaminofluorescéine	ISR	<i>induced systemic resistance</i>
DAPG	2,4-diacétylphloroglucinol	ITP	<i>iron transport protein</i>
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one	JA	acide jasmonique
DMA	acide 2'-désoxymuginéique	JAZ	<i>jasmonate zim domain</i>
DTT	dithiothréitol	KB	King's B
ECF-σ	<i>extra-cytoplasmic sigma factor</i>	LIP	<i>labile iron pool</i>
		LPS	lipopolysaccharides

Liste des abréviations

LRP	<i>receptor-like protein</i>	PRE1	<i>paclobutrazol-resistant 1</i>
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>	PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
MA	<i>acide muginéique</i>	PS	<i>phytosidérophores</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>	PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	PYE	<i>POPEYE</i>
MATE	<i>multidrug and toxin efflux</i>	PYEL	<i>PYE Like</i>
MeSA	<i>salicylate de méthyle</i>	QS	<i>quorum sensing</i>
miR393	<i>microRNA 393</i>	RIN	<i>RNA integrity number</i>
MIT	<i>mitochondrial Fe transporter</i>	RLK	<i>receptor-like kinase</i>
MNIC ou DNIC	<i>mono ou di-nitrosyl iron complexes</i>	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
NA	<i>nicotianamine</i>	SA	<i>acide salicylique</i>
NAA	<i>naphthalene acetic acid</i>	SAM	<i>S-adénosylméthionine</i>
NAAT	<i>nicotianamine aminotransférase</i>	SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
NAS	<i>nicotianamine synthase</i>	SDN	<i>stimulateurs des défenses naturelles des plantes</i>
NO	<i>monoxyde d'azote</i>	SDS	
NPR1	<i>nonexpressor of PR gene 1</i>	SGI	<i>seedling growth inhibition</i>
NRAMP	<i>natural resistance associated macrophage protein</i>	SLY	<i>sleepy</i>
NRPS	<i>non-ribosomal peptide synthases</i>	SM	<i>milieu succinate</i>
OPT	<i>oligopeptide transporter</i>	SNAP	<i>S-nitroso-N-acétylpénicillamine</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>	SNP	<i>sodium nitroprusside</i>
PDA	<i>potato dextrose agar</i>	T3SS	<i>système de sécrétion de type 3 /type 3 secretion system</i>
PDB	<i>potato dextrose broth</i>	TBS	<i>tris-buffered saline</i>
PDR	<i>pleiotropic drug resistance</i>	TGA	<i>TGACG sequence-specific binding protein</i>
PGPR	<i>plant growth promoting rhizobacteria</i>	TIR1	<i>transport inhibitor response 1</i>
PIC	<i>permease in chloroplast</i>	TOM	<i>transporter of mugineic acid family phytosiderophores</i>
PIF	<i>phytochrome interacting factor</i>	VIT	<i>vacuolar iron transporter</i>
PMSF	<i>fluorure de phénylméthylsulfonyle</i>	WRKY	<i>WRKY DNA-binding protein</i>
pNPP	<i>para-nitrophénylphosphate</i>	YSL	<i>yellow-stripe-like</i>
PPA2	<i>phosphatase 2</i>	ZIP	<i>zinc-regulated transporters (ZRT), irt-like proteins</i>
PR	<i>pathogenesis-related</i>		

INTRODUCTION

I. Introduction

1. Interactions plantes-microorganismes

Dans leur environnement, les plantes vivent en interaction avec d'autres organismes dont la diversité peut être importante. Il en résulte une grande variabilité d'interactions directes ou indirectes. Les conséquences de ces interactions sont variables, allant des bénéfices mutuels, en passant par la neutralité, jusqu'à l'interaction délétère, comme par exemple le développement d'infections ou de maladies. La finesse et la complexité de ces interactions se sont forgées au cours du temps et résultent d'une évolution constante durant laquelle chaque partenaire a tenté de s'adapter au mieux afin d'optimiser son développement et sa reproduction.

1.1. Des interactions bénéfiques diverses

La rhizosphère, région environnant les racines des plantes, est influencée à la fois par les racines, le sol et les microorganismes. C'est une zone d'interaction majeure entre plantes et microorganismes. Des sécrétions racinaires de différentes natures vont fortement modifier la composition et les propriétés physico-chimiques du sol pour en faire une zone propice au développement des microorganismes (Somers *et al*, 2004 ; Badri *et al*, 2009 ; Vacheron *et al*, 2013). En effet, les nutriments libérés par la racine sous formes d'exsudats ou de rhizo-dépôts, attirent fortement les microorganismes et, en conséquence, favorisent leurs activités et accroissent leur nombre. On parle de « *rhizosphere effect* » (Bais *et al*, 2006). Les exsudats racinaires peuvent être de différentes natures. Parmi les molécules de faible masse moléculaire, on retrouve des acides aminés, des sucres, des composés phénoliques ou acides, ainsi que différents métabolites secondaires. Parmi les molécules de masse moléculaire élevée, on retrouve surtout des polysaccharides (mucilage/glucides) et des protéines (Bais *et al*, 2006). La rhizosphère héberge ainsi une très grande quantité de microorganismes, pouvant aller jusqu'à 10¹¹ bactéries par gramme de racines (Egamberdieva *et al*, 2008 ; Berendsen *et al*, 2012). Parmi ces bactéries celles ayant un effet bénéfique sur la croissance et la santé des plantes sont qualifiées de PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*) (Kloepper & Schroth, 1978).

1.2. Impact bénéfique des microorganismes sur la nutrition

Chez les animaux et l'homme en particulier, l'impact bénéfique des microorganismes sur la santé est bien établi (Bron *et al*, 2012). De façon intéressante, les microorganismes résidant dans le système digestif humain et ceux de la rhizosphère présentent des fonctions très similaires (analogies récemment synthétisées par Berendsen *et al* (2012)). En particulier, les bactéries vivant dans l'intestin humain jouent un rôle clé dans l'assimilation des nutriments. En effet, le microbiome intestinal, de par la dégradation des produits alimentaires et la production de vitamines essentielles, améliore la nutrition de son hôte (Derrien *et al*, 2010). En retour, les sécrétions de mucines de l'hôte apportent aux bactéries le carbone nécessaire à leur développement (Fagundes *et al*, 2012). Un phénomène parallèle est observé au niveau des racines des plantes. En effet, les microorganismes bénéfiques, bactéries ou champignons, participent à l'amélioration de la croissance de la plante en fournissant à cette dernière des nutriments souvent peu bio-disponibles dans le sol (Van Der Heijden *et al*, 2008). Les rhizobactéries vont par exemple améliorer grandement la nutrition azotée de la plante *via* la formation de nodules ; les champignons mycorhizogènes quant à eux peuvent favoriser la nutrition en fer, en zinc, en cuivre, en phosphore et en azote de la plante (Bais *et al*, 2006 ; Van Der Heijden *et al*, 2008). En échange, la plante apporte du carbone issu de son activité photosynthétique sous forme d'exsudats (Van Der Heijden *et al*, 2008 ; Berendsen *et al*, 2012). Dans le cas de la symbiose mycorhizienne, la plante apporte du carbone au champignon sous forme de glucides (Bais *et al*, 2006).

1.3. Impact bénéfique des microorganismes sur la défense

Les bactéries peuvent également avoir des effets sur la défense et la protection de l'hôte contre les pathogènes. Que ce soit chez les plantes ou dans notre système digestif, la présence de microorganismes est détectée par les cellules de l'hôte, ce qui devrait conduire à la mise en place de réactions de défense. Or, les bactéries bénéfiques contournent ou s'adaptent aux défenses par des processus restant peu connus à ce jour. Les bactéries pathogènes et bénéfiques des plantes disposent des mêmes déterminants moléculaires reconnus par les cellules des racines mais aussi d'effecteurs similaires permettant de bloquer la mise en place des réactions de défense (Zamioudis & Pieterse, 2012). Chez les animaux, différents mécanismes permettent d'éviter une trop forte activation des défenses : la présence de mucus comme barrière physique ou encore la

I. Introduction

désensibilisation des cellules épithéliales aux LPS (lipopolysaccharides) en sont deux exemples (Chinen & Rudensky, 2012). De manière générale, les systèmes mis en place par les plantes et les animaux pour distinguer un microorganisme bénéfique d'un microorganisme pathogène restent en grande partie à déterminer.

Dans l'intestin, la présence des bactéries bénéfiques empêche le développement et la colonisation par des pathogènes. Cette protection est induite par plusieurs mécanismes dont la compétition pour les nutriments, la production d'inhibiteurs ou de molécules antimicrobiennes (Fagundes *et al*, 2012). De manière similaire, les bactéries de la rhizosphère limitent la croissance des pathogènes. En effet, la rhizosphère peut être considérée comme "un champ de bataille" où seuls les microorganismes les plus compétitifs et les mieux adaptés pourront survivre. Différents mécanismes permettant à la fois la persistance de certains microorganismes dits de biocontrôle et la réduction des pathogènes du sol ont été décrits (Raaijmakers *et al*, 2008). On parle de la capacité d'un sol à supprimer ou à diminuer le développement d'une maladie chez la plante (*disease suppressive soil*). Plus précisément, plusieurs types d'interactions sont impliqués dans ce mécanisme comme l'existence d'une compétition entre microorganismes, que ce soit pour un positionnement à proximité ou au contact de la racine ou pour l'accès aux nutriments qu'elle libère (Raaijmakers *et al*, 2008). Une colonisation efficace de la racine ainsi qu'une densité suffisante de la population microbienne d'intérêt sont nécessaires à la mise en place d'une protection efficace (Raaijmakers *et al*, 1995). En effet, pour certaines bactéries de biocontrôle, le signal induit par le *quorum sensing* (QS, atteinte d'une certaine densité par la population bactérienne) est nécessaire à la production de molécules antimicrobiennes permettant ainsi la réduction des microorganismes pathogènes (Pierson & Pierson, 2007). La compétition pour les micronutriments du sol, et tout particulièrement le fer, constitue également un mécanisme important de l'effet de biocontrôle. En effet, la production par les bactéries bénéfiques du sol de sidérophores, des molécules chélatrices de fer, semble être une autre des stratégies utilisées pour limiter le développement des pathogènes, tout particulièrement quand le fer est faiblement bio-disponible (Lemanceau *et al*, 1993, 2009). Les sidérophores des bactéries bénéfiques sont caractérisés par une affinité pour le fer supérieure à celle des sidérophores des autres microorganismes du sol. Les microorganismes bénéfiques du sol peuvent également affaiblir les potentiels pathogènes *via* la production de métabolites secondaires antimicrobiens, on parle aussi d'antibiose. Les *Pseudomonas*, notamment,

I. Introduction

sont connus pour produire certaines molécules antimicrobiennes telles que le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, la pyolutéorine, la phénazine et des lipopeptides cycliques (Weller, 2007 ; Mazurier *et al*, 2009). Ces molécules peuvent endommager différentes fonctions cellulaires comme le transport d'électrons ou encore l'intégrité des membranes. De plus, des enzymes de lyse, principalement des protéases, mais aussi des glucanases, des chitinases et des cellulases peuvent être produites à l'encontre de microorganismes pathogènes (Adesina *et al*, 2007). Enfin, les bactéries bénéfiques peuvent affecter directement les pathogènes de la plante *via* la production et la sécrétion de molécules effectrices. Le système de sécrétion de type III (T3SS) des bactéries semble être impliqué dans ce processus. En effet, il est induit en présence de pathogènes et son inactivation par mutation conduit à une diminution de l'efficacité de biocontrôle de la bactérie (Rezzonico *et al*, 2005 ; Raaijmakers *et al*, 2008). Enfin, certaines bactéries du sol ont également la capacité de placer la plante dans un état de « veille défensive », mécanisme appelé ISR (*induced systemic resistance*) qui permet à la plante de réagir plus vite et plus fortement dans le cas d'une attaque par un microorganisme pathogène (§ 4.1.4 de l'introduction)(Van der Ent *et al*, 2009).

La souche modèle étudiée durant ma thèse est *Pseudomonas fluorescens* C7R12. Cette souche a été isolée à partir d'un sol limitant le développement de la fusariose, une maladie cryptogamique causée par des champignons du genre *Fusarium*. *P. fluorescens* C7R12 dispose d'un système de sécrétion de type III, produit des molécules antimicrobiennes ainsi que des sidérophores dont la pyoverdine est le majoritaire. La pyoverdine dispose d'une très forte affinité pour le fer, avec une constante d'association (K_a) de 10^{32} (Meyer & Abdallah, 1978 ; Lemanceau *et al*, 1988 ; Eparvier *et al*, 1991 ; Mazurier *et al*, 2004). Les caractéristiques et propriétés des sidérophores et des pyoverdines sont décrites plus précisément § 3 de l'introduction.

1.4. La sélection du microbiome par la plante

Les microorganismes du sol pouvant affecter la physiologie de la plante (nutrition, défense), on comprend aisément l'intérêt de cette dernière à sélectionner spécifiquement certaines espèces ou certains genres de microorganismes dans sa rhizosphère. Comme mentionné précédemment, la présence des racines et l'excrétion de carbone sous différentes formes font de la rhizosphère une zone de forte densité microbienne (Bais *et al*, 2006). Toutefois, et de manière surprenante, la diversité microbienne de la

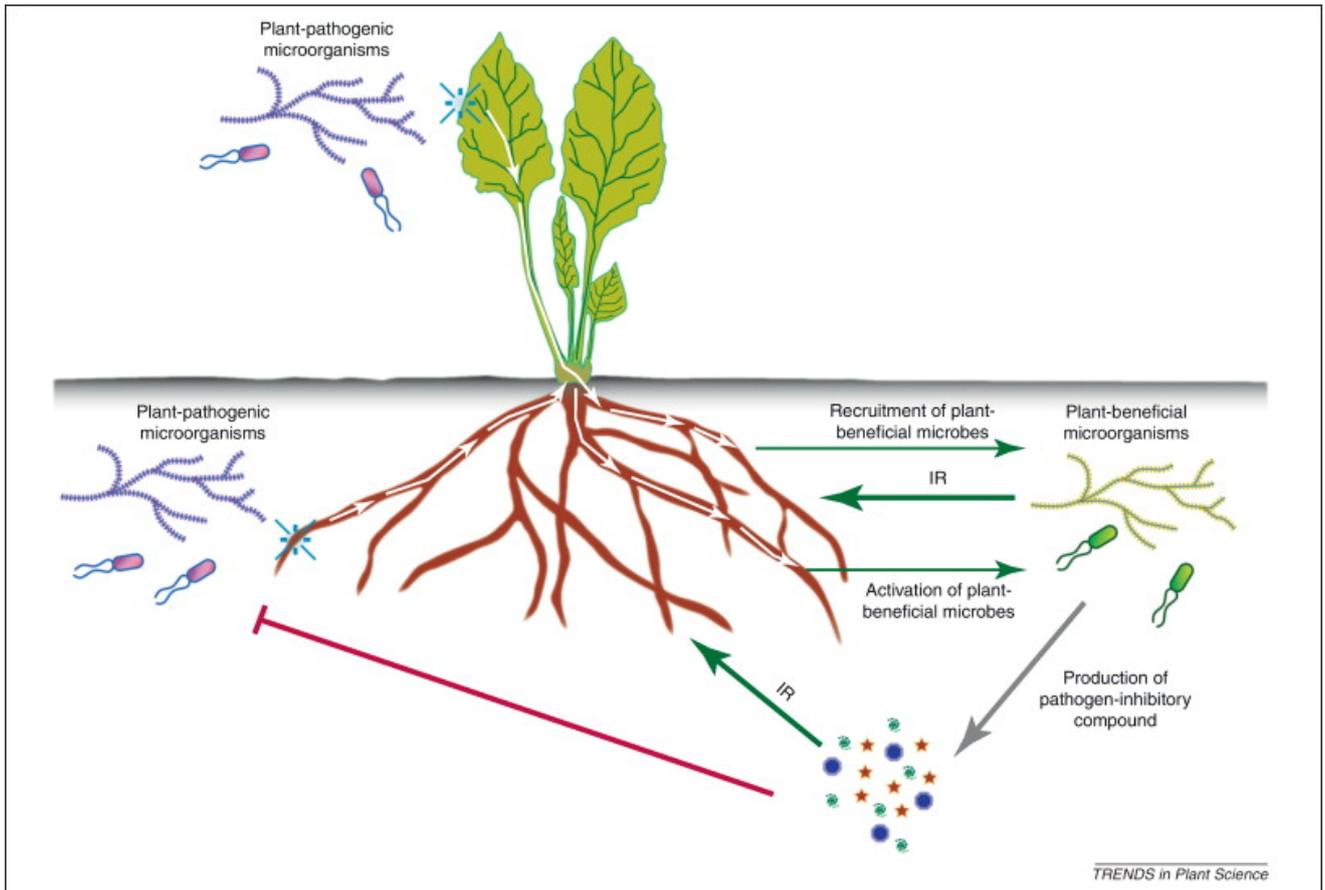


Figure I.1 : Recrutement de microorganismes bénéfiques par la plante (d'après Berendsen *et al*, 2012)

Suite à une attaque par un pathogène racinaire ou aérien, la plante induit l'excrétion de composés ayant un effet stimulateur sur le développement de microorganismes. Des microorganismes, incluant des bénéfiques, vont se développer et améliorer les défenses de la plante *via* l'activation de l'ISR (*induced systemic resistance*) et/ou *via* la production de molécules inhibant la croissance des pathogènes.

I. Introduction

rhizosphère est inférieure à celle disponible dans le sol qui n'est pas sous l'influence de la racine, dit sol nu (Costa *et al*, 2006) révélant ainsi la capacité des plantes à sélectionner des microorganismes spécifiques. La sélection des microorganismes est multifactorielle, l'espèce végétale, son génotype et le type de sol étant des paramètres à considérer. En effet, le type de sol, sa composition et ses caractéristiques vont aboutir à la présence d'une communauté spécifique de microorganismes parmi lesquels les plantes favorisent les plus bénéfiques à leur développement (Berg & Smalla, 2009). Ainsi, différentes plantes cultivées dans un même sol pourront développer des microbiomes de compositions différentes, ces différences pouvant être attribuées aux exsudats racinaires et aux taux de développement racinaire (Garbeva *et al*, 2008). En revanche, d'après Miethling *et al* (2000), une même plante cultivée dans des sols différents parviendra à créer des microbiomes de composition relativement similaire. Ainsi, cette étude souligne l'importance de la plante sur la sélection de son microbiome. Enfin, chez *Arabidopsis thaliana*, il a également été montré que différents génotypes peuvent conduire à l'établissement de communautés microbiennes différentes (Micallef *et al*, 2009). En particulier, cette étude démontre que malgré la proximité génétique, les exsudats racinaires des génotypes testés peuvent être divers. Ainsi, la quantité et la composition des exsudats produits seraient fortement corrélées à la sélection de la communauté microbienne. On peut citer comme exemple la sécrétion par les racines des céréales de l'hydroxamate 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) qui, une fois sécrétée dans le sol, se dégrade et conduit à l'accumulation de phénoxazinones, des molécules aux activités antifongique et antibactérienne. La sécrétion de DIMBOA affecte donc fortement la population de la rhizosphère et permet la sélection de bactéries résistantes, certaines telles que *Pseudomonas putida* étant parfois attirées par ces produits toxiques (Neal *et al*, 2012).

La rhizosphère et son microbiome constituent donc un environnement complexe et dynamique qui abrite une diversité importante de microorganismes. Comme détaillé ci-dessus, la population de la rhizosphère est fortement influencée par la plante. Cette dernière peut moduler le microbiome en fonction de son stade de développement, mais également en cas d'attaque par un pathogène afin de s'adapter aux conditions environnementales (figure I.1)(Zhang *et al*, 2011 ; Berendsen *et al*, 2012). La compréhension dans le détail de ces mécanismes, de ces interactions et de leurs diversités est aujourd'hui au centre de nombreux travaux de recherche. La maîtrise et l'utilisation

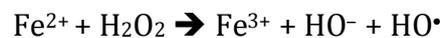
I. Introduction

de ces interactions sont des solutions actuellement proposées pour le développement d'une agriculture durable.

2. Le fer

Le fer est un élément essentiel au développement des organismes vivants. De par sa grande réactivité chimique, il constitue un acteur primordial dans de nombreuses activités cellulaires telles que la photosynthèse, la respiration ou encore la synthèse d'hormones, en particulier *via* son incorporation dans des protéines, notamment sous forme d'hème ou de cluster fer-soufre (Fe-S) (Guerinot & Yi, 1994 ; Darbani *et al*, 2013). Sa capacité à capter et à libérer des électrons en fait un cofacteur majeur.

Le fer se classe dans la catégorie des métaux de transition, c'est-à-dire disposant d'une couche électronique « d » incomplète. Cette caractéristique en fait un élément chimiquement très intéressant : il peut se trouver sous différents degrés d'oxydation, peut participer à différents types de liaisons et est incorporé dans un grand nombre de complexes moléculaires. Le fer possède deux degrés d'oxydation physiologique, le Fe²⁺ (ion ferreux ou fer II) et Fe³⁺ (ion ferrique ou fer III), caractérisés par le couple d'oxydo-reduction (Fe²⁺/Fe³⁺) qui présente un potentiel de +0,77 V (Thèse E. Yeterian, 2010). La forte réactivité du fer le rend potentiellement dangereux pour les organismes. En effet, la présence d'ions ferreux libres dans la cellule peut conduire à la production du radical hydroxyle (HO•) hautement réactif *via* la réaction de Fenton :



L'absorption, le stockage ainsi que l'utilisation du fer dans les organismes sont ainsi soumis à un contrôle très fin.

2.1. L'assimilation du fer chez les plantes

Le fer est le 4^{ème} constituant le plus abondant de la croûte terrestre. Malgré son sa teneur élevée, il est très faiblement bio-disponible notamment dans les sols alcalins qui représentent plus de 30 % de la surface cultivable mondiale. En effet, le fer se trouvant majoritairement sous forme insoluble oxydée ou précipitée, il constitue l'un des facteurs limitant la croissance des plantes et sa disponibilité influence le rendement des cultures (Guerinot, 2001 ; Jin *et al*, 2014). En conséquence, les plantes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes leur permettant d'assimiler le fer présent dans le sol de manière efficace. Deux principaux mécanismes d'assimilation du fer ont été décrits : la stratégie I basée sur la réduction du fer et utilisée par les non-Graminées et la stratégie II,

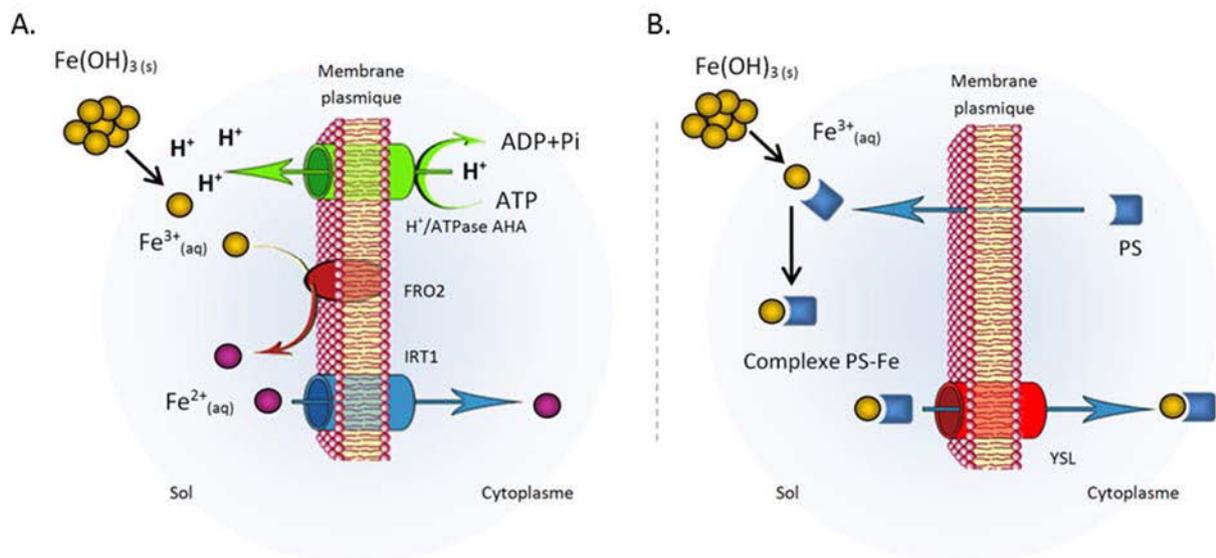


Figure I.2 : Systèmes d'assimilation du fer utilisés par les végétaux (d'après thèse E. Koen, 2012)

A. Stratégie I. Dans cette stratégie employée par les non graminées, le fer est assimilé en 3 étapes : il est d'abord solubilisé *via* l'acidification du milieu extracellulaire grâce à des AHA ATPases, ensuite réduit par FRO2 puis internalisé dans les cellules de l'assise pilifère *via* IRT1. Est donné ici l'exemple d'*A. thaliana*.

B. Stratégie II. Dans celle-ci, développée par les graminées, des phytosidérophores (PS) présentant une très grande affinité pour le fer ferrique sont sécrétés puis, une fois chargés en atomes de fer, sont internalisés par les cellules de l'assise pilifère *via* un transporteur YSL. La consommation de Fe³⁺ libre dans le sol lors de l'association avec le PS déplace l'équilibre de solubilité du Fe(OH)₃ dans le sens de la libération de Fe³⁺. Adapté de Guerinot (2001).

I. Introduction

basée sur l'excrétion de molécules chélatrices du fer utilisée par les Graminées (Guerinot, 2001 ; Kim & Guerinot, 2007 ; Lemanceau *et al*, 2009).

2.1.1. L'assimilation du fer : La stratégie I

Chez les non Graminées telles qu'*A. thaliana*, l'assimilation du fer s'appuie sur trois étapes : (i) l'acidification de la rhizosphère, (ii) la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , (iii) l'import du Fe^{2+} au niveau de l'assise pilifère. Un ensemble de trois protéines transmembranaires des cellules de l'assise pilifère est impliqué dans ce mécanisme (figure **I.2 A**) (Vert *et al*, 2002 ; thèse E. Koen, 2012).

L'acidification du milieu extracellulaire s'opère *via* l'excrétion de protons et de composés phénoliques. Cette acidification facilite la solubilisation du fer et sa libération sous forme ferrique. En effet, la diminution d'une unité de pH permet d'accroître 100 fois la solubilité du fer (Olsen R.A. *et al*, 1981). Plusieurs H^+ -ATPases de la famille AHA peuvent être impliquées dans cette première étape (Santi & Schmidt, 2009). Chez *A. thaliana*, l'acidification de la rhizosphère impliquerait principalement la protéine codée par le gène *AtAHA2* dont l'activation transcriptionnelle est induite en condition de carence en fer (Santi & Schmidt, 2009). Dans la seconde étape, les ions Fe^{3+} , ainsi libérés, sont réduits en Fe^{2+} par une réductase ferrique codée par le gène *AtFRO2* (*ferric-chelate reductase oxidase 2*) (Robinson *et al*, 1999). Cette étape est considérée comme l'étape limitant l'assimilation du fer par la plante. En effet, comparées à des plantes sauvages, des plantes d'*A. thaliana* surexprimant *AtFRO2* présentent une meilleure croissance lors d'une faible disponibilité en fer (Connolly *et al*, 2003). Les ions Fe^{2+} seront finalement internalisés par les cellules de l'assise pilifère grâce à un ou plusieurs transporteurs, le mieux caractérisé chez *A. thaliana* étant le transporteur IRT1 (*iron regulated transporter 1*) (Vert *et al*, 2002). IRT1 fait partie de la famille des transporteurs ZIP (*zinc-regulated transporter (ZRT), IRT-like proteins*). Il est intéressant de noter qu'IRT1 n'est pas spécifique du fer mais peut transporter d'autres métaux divalents comme le zinc (Zn^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) ou le cadmium (Cd^{2+}) (Kim & Guerinot, 2007). Des homologues d'*AtIRT1* et de *AtFRO2* ont été clonés chez d'autres espèces non Graminées (Kobayashi & Nishizawa, 2012). Même si la majorité des études menées sur les systèmes d'assimilation du fer chez *A. thaliana* s'est concentrée sur IRT1 et FRO2, d'autres acteurs moléculaires associés à l'import de fer sont décrits pour être mobilisés dans la réponse à la carence en fer. Une étude récente a notamment démontré l'implication de la scopolétine, un composé phénolique, et de son

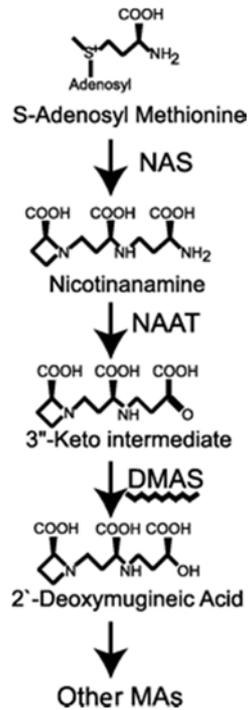


Figure I.3 : Voie de synthèse des acides muginéiques (MA) à partir de la S-adénosylméthionine (SAM) (d'après Bashir *et al*, 2006)

Trois molécules de SAM sont combinées par la nicotianamine synthase (NAS) pour former la nicotianamine (NA). Le groupe amine de la NA est désaminé par la nicotianamine aminotransférase (NAAT) formant ainsi l'intermédiaire 3', avant d'être réduit en acide 2'-désoxymuginéique (DMA) par la DMA synthase (DMAS).

I. Introduction

transporteur ABCG37 (*ATP binding cassette g37* aussi appelé PDR9 : *pleiotropic drug resistance 9*) dans l'amélioration de la nutrition en fer lors d'une carence (Fourcroy *et al*, 2014).

2.1.2. L'assimilation du fer : La stratégie II

Les Graminées telles que le blé utilisent une stratégie différente pour assimiler le fer appelée stratégie II (figure **I.2 B**). Cette dernière est basée sur la production et la sécrétion de molécules de faible masse moléculaire nommées phytosidérophores (PS). Les PS sont synthétisés à partir d'acide muginéique (MA) (Bashir *et al*, 2006 ; Kobayashi & Nishizawa, 2012) et secrétés dans le sol à l'aide de transporteurs spécifiques identifiés comme étant OsTOM1 (*transporter of mugineic acid family phytosiderophores 1*) et HvTOM1 chez le riz et l'orge, respectivement (Nozoye *et al*, 2011). Tout comme les sidérophores bactériens, ils présentent une forte affinité pour le Fe³⁺ leur permettant de l'extraire efficacement du sol. Une fois les PS chélatés au Fe³⁺, les complexes PS-Fe sont transportés dans les cellules de l'assise pilifère des racines à l'aide des transporteurs spécifiques YSL (*yellow-stripe-like*)(Curie *et al*, 2001 ; Inoue *et al*, 2009). Les Graminées survivant généralement mieux à des conditions de carence drastique en fer, on peut en conclure que la stratégie II est plus efficace que la stratégie I (Mori, 1999 ; Kim & Guerinot, 2007). La résistance à la carence en fer des Graminées est cependant dépendante du type de PS et de la quantité sécrétée. Par exemple, le riz n'excrète que de l'acide 2'-désoxymuginéique (DMA) et ceci en quantité relativement faible et, en conséquence, supporte assez difficilement la carence. Au contraire, l'orge qui synthétise et sécrète plusieurs types de PS (MA, DMA et epi-HMA : acide 3-épihydroxymuginéique) et en grandes quantités est bien plus tolérante à la carence en fer (Bashir *et al*, 2006 ; Kim & Guerinot, 2007).

La voie de biosynthèse des MA a fait l'objet de nombreuses études et commence à être bien caractérisée (Kobayashi & Nishizawa, 2012). Elle a pour précurseur la S-adénosylméthionine (SAM) et fait intervenir trois enzymes séquentiellement. Tout d'abord, la nicotianamine synthase (NAS) catalyse la production de nicotianamine (NA, voir § 2.2 de l'introduction) *via* la trimérisation de molécules de SAM. La NA est ensuite désaminée par la nicotianamine aminotransférase (NAAT) en un intermédiaire 3''-oxo qui est finalement réduit par la DMA synthase pour former le DMA qui sera ensuite hydroxylé pour former les différents MA (Figure **I.3**)(Bashir *et al*, 2006).

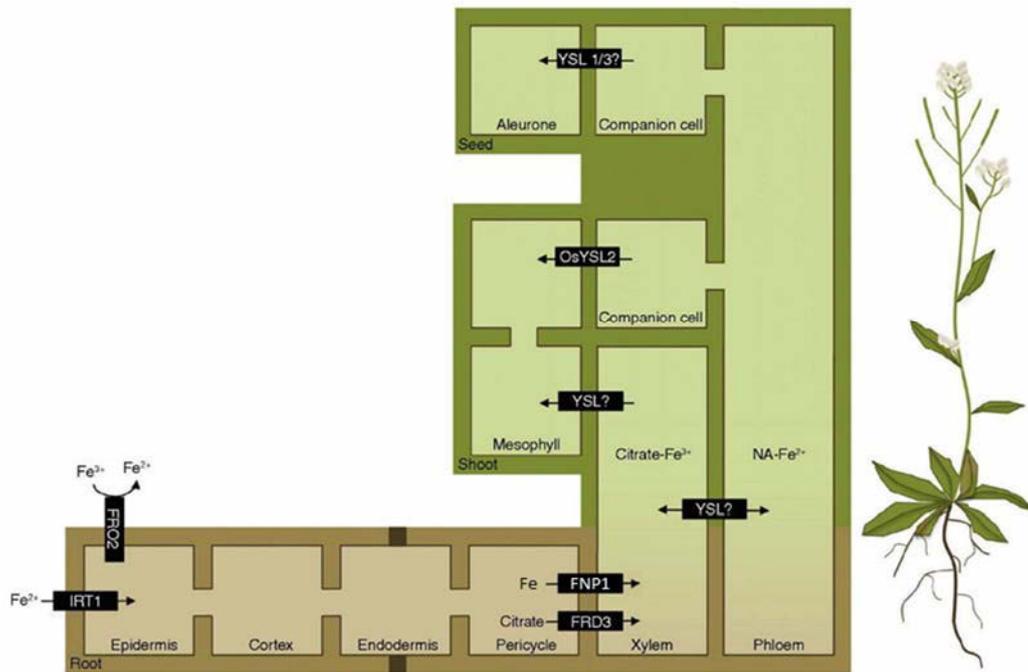


Figure I.4 : Transport du fer *in planta* (d'après Palmer & Guerinot, 2009)

Le fer est réduit puis transporté dans la plante au niveau de l'assise pilifère à l'aide des protéines transmembranaires IRT1 et FRO2. Le fer transite par la voie symplasmique jusqu'à la stèle. Les protéines FRD3 et FNP1 sont impliquées respectivement dans le transport du citrate et du fer dans le xylème. Les membres de la famille YSL sont des transporteurs potentiellement impliqués dans le chargement et le déchargement du fer dans les différents tissus de la plante. Dans le phloème, le fer est principalement pris en charge par la nicotianamine (NA).

I. Introduction

La distinction franche faite dans la littérature entre les plantes non Graminées utilisant la stratégie I et les Graminées utilisant la stratégie II n'est pas stricte. En particulier, le riz, une Graminée utilisant la stratégie de type II, contient dans son génome deux gènes orthologues d'*AtIRT1* : *OsIRT1* et *OsIRT2*. Les protéines correspondantes ont été démontrées comme étant fonctionnelles, permettant ainsi un import du fer sous forme Fe^{2+} (Ishimaru *et al*, 2006). En revanche, même si des gènes homologues à *AtFRO2* ont été identifiés chez le riz, aucune activité réductase de type FRO2 ne leur a été attribuée. Il semblerait donc que cette Graminée soit capable d'absorber du fer directement présent sous forme Fe^{2+} , abondamment présent dans les milieux immergés et anaérobies. La stratégie II du riz étant peu efficace, cette adaptation est particulièrement avantageuse pour la plante.

2.2. Le transport du fer *in planta*

Une fois internalisé dans la plante, le fer doit être pris en charge afin d'être apporté aux organes sources afin d'être stocké et/ou aux organes puits afin d'être utilisé. Du fait de sa réactivité potentielle et de sa capacité à catalyser la synthèse de formes réactives de l'oxygène (ROS, voir § 2 de l'introduction), mais également afin de faciliter sa solubilité, le fer est peu ou n'est pas présent sous forme libre mais est préférentiellement associé à des molécules organiques, à la NA ou à des protéines (Curie *et al*, 2009). Une fois internalisé par les racines, le fer ainsi complexé transite par la voie symplastique *via* son gradient de concentration jusqu'à la stèle (Kim & Guerinot, 2007 ; Samira *et al*, 2013). A l'inverse de la voie dite apoplastique, la voie symplastique désigne le transfert de solutés cytoplasmiques de cellules à cellules *via* les plasmodesmes. La voie apoplastique fait référence à la diffusion des solutés à l'extérieur de la cellule *via* l'apoplasme. Une fois la stèle atteinte, le fer est chargé dans la sève brute s'écoulant dans les vaisseaux du xylème (voie apoplastique) et est principalement présent sous forme de complexe Fe^{3+} -citrate (Samira *et al*, 2013). Deux protéines sont impliquées dans le chargement du fer et du citrate dans le xylème : FRD3 (*ferric reductase defective 3*) appartenant à la famille des MATE (*multidrug and toxin efflux*) qui semble être impliquée dans le transport du citrate et FNP1 (*ferroportin 1*) qui participe à l'efflux du fer (Roschzttardtz *et al*, 2011). Le complexe Fe^{3+} -citrate qui se forme dans le xylème est transporté puis déchargé dans les parties aériennes.

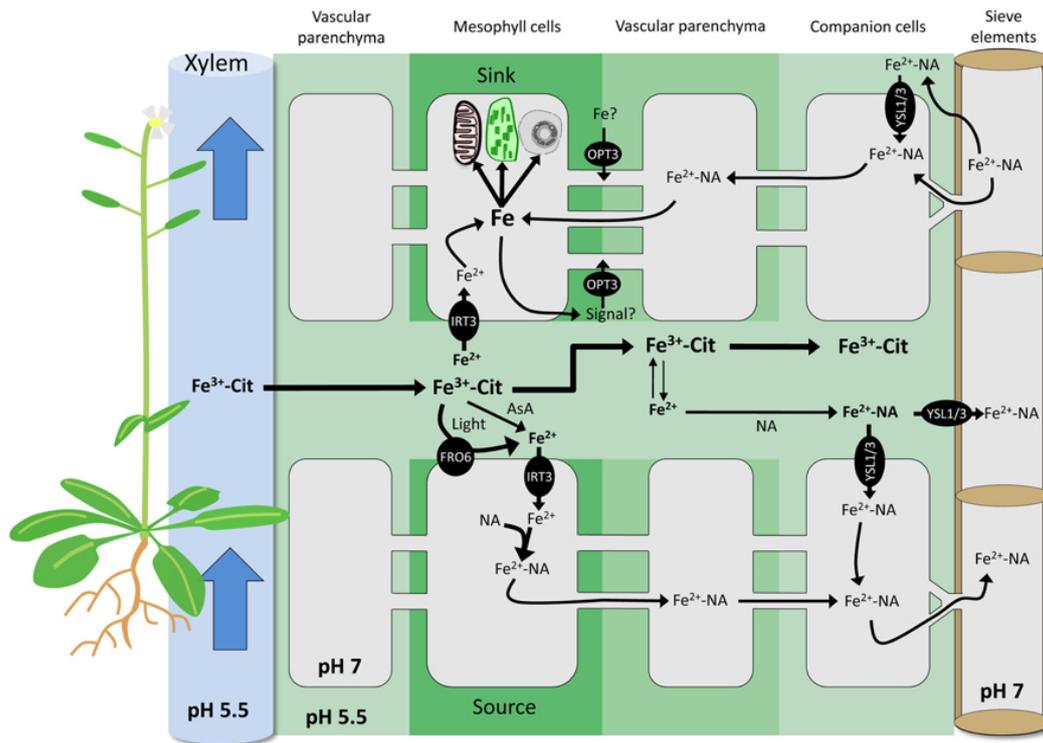


Figure I.5 : Distribution du fer entre les différents tissus et compartiments cellulaires d'*A. thaliana* (d'après Grillet *et al*, 2014)

Le fer absorbé par les racines est transporté *via* le xylème aux parties aériennes sous forme de complexe fer(III)-citrate. Dans les feuilles, le fer(III)-citrate peut être réduit en fer(II) par la protéine FRO6, la lumière ou encore l'ascorbate (AsA). L'assimilation du fer dans les cellules sources (de stockage) ou puits (d'utilisation) pourrait être réalisée *via* un mécanisme de réduction-transport similaire à celui présent dans les racines. Les protéines IRT3 et FRO6 sont probablement impliquées. Les complexes Fe-NA présents majoritairement dans le cytoplasme peuvent accéder au phloème par la voie symplasmique. Si des complexes Fe²⁺-NA sont formés dans l'apoplaste, des transporteurs de la famille YSL (YSL1/3) peuvent les transporter dans les cellules ou dans le phloème. Les complexes Fe²⁺-NA peuvent également rejoindre les organes puits *via* la voie symplasmique. OPT3, un transporteur de peptides, pourrait être impliqué dans le transport du fer de l'apoplaste au cytoplasme ou dans le transport d'une molécule signal permettant le maintien de l'homéostasie du fer.

I. Introduction

D'après Roschttardt *et al* (2011), FRD3 jouerait un rôle lors du déchargement en fer du xylème au niveau des feuilles. Des transporteurs de la famille YSL pourraient aussi être impliqués dans ce mécanisme, ainsi que dans le transfert du fer du xylème au phloème (Palmer & Guerinot, 2009). Robinson *et al* (1999) ont également émis l'hypothèse que le complexe Fe^{3+} -citrate pourrait être réduit au niveau des feuilles par des enzymes de la famille FRO. Enfin, la protéine d'*A. thaliana* IRT3, fortement exprimée dans les feuilles mais également dans les tissus vasculaires et localisée au niveau de la membrane plasmique, pourrait de même jouer un rôle dans le déchargement du fer (Lin *et al*, 2009). Ainsi, comme suggéré par Palmer & Guerinot (2009), un mécanisme IRT-like couplé à une réduction par une protéine de la famille FRO pourrait permettre le déchargement/chargement du fer. Les figures I.4 et I.5 illustrent les éléments décrits ci-dessus à propos du transport de fer *in planta*.

Le citrate n'est pas le seul chélateur de fer présent dans le xylème. La NA et les DMA sont également présents en condition de carence en fer (voir § 2.1.2 de l'introduction). Du fait du faible pH de la sève brute, leur stabilité est toutefois limitée (Darbani *et al*, 2013). En revanche, la sève élaborée du phloème dont le pH est plus neutre, voire faiblement alcalin, favorise la formation de complexes Fe^{2+} -Na (Darbani *et al*, 2013). Le mécanisme permettant le passage du complexe Fe^{3+} -citrate retrouvé principalement dans le xylème au complexe Fe^{2+} -Na retrouvé dans le phloème, n'est pas connu à ce jour. L'alimentation en fer des parties en croissance de la plante, assurée par le phloème, impliquerait donc des complexes Fe^{2+} -NA (Kim & Guerinot, 2007). Toutefois, le fer circulant dans le phloème pourrait également être associé à la protéine ITP (*iron transport protein*) (Kruger *et al*, 2002) et au glutamate (Harris *et al*, 2012) suivant son état redox. La figure I.6 présente le transport du fer à travers les différents organes de la plante ainsi que les ligands impliqués.

La NA semble être le chélateur majoritaire du fer dans le phloème (99 %). Cependant, il est important de noter que la NA transporte également dans le phloème des quantités non négligeables de Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} présents dans le phloème (Harris *et al*, 2012). Le génome d'*A. thaliana* contient quatre gènes codant pour des NAS (*AtNAS1-4*) (Schuler & Bauer, 2011), gènes dont l'expression est induite notamment en réponse à une carence en zinc, en cuivre et/ou en fer, indiquant un rôle de la NA dans l'homéostasie des métaux de manière générale (Wintz *et al*, 2003). Le quadruple mutant *nas4x-2* invalidé

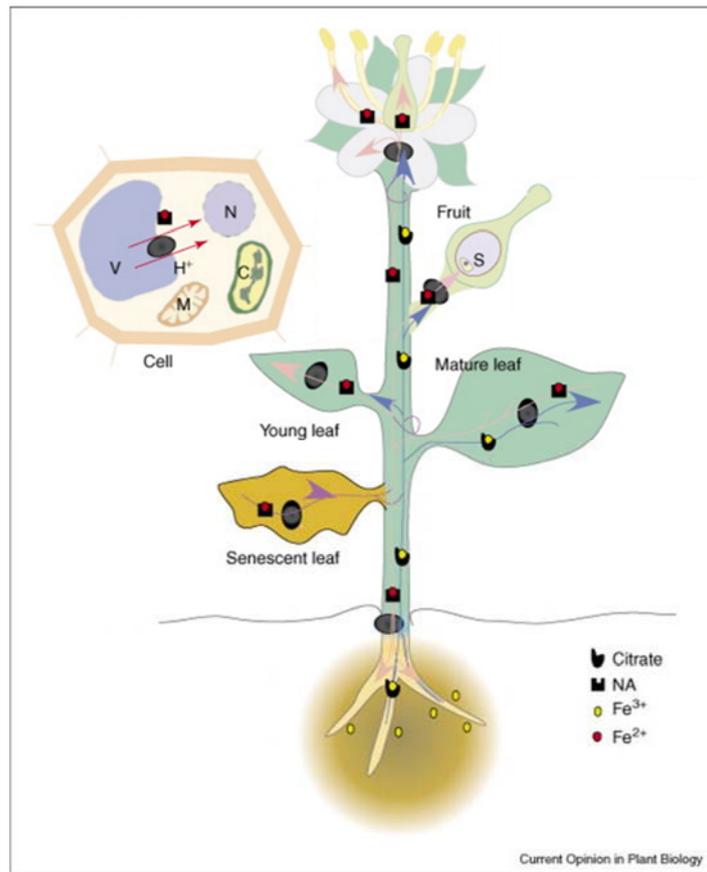


Figure I.6 : Transport longue distance du fer dans la plante (d'après Briat *et al*, 2007)

Le transport *via* le xylème est représenté par les flèches bleues alors que le transport *via* le phloème est représenté par les flèches roses. Les connections entre le xylème et le phloème sont représentées à l'aide de lignes mauves. Les points sombres représentent la localisation des transporteurs YSL potentiellement impliqués dans le transport du fer. Au niveau intracellulaire, le fer est majoritairement stocké dans la vacuole, la remobilisation du fer de la vacuole pourrait également faire appel à des transporteurs de la famille YSL (YSL4 et YSL6).

I. Introduction

dans l'expression des quatre gènes *NAS* se caractérise par une inhibition de croissance et une chlorose des jeunes feuilles. Ce mutant présente en outre une infertilité avec une absence de production de graines. Ces résultats soulignent donc le rôle fondamental de la NA dans la physiologie de la plante et plus particulièrement dans le transport longue distance du fer vers les organes puits (jeunes feuilles, fleurs et graines) (Schuler *et al*, 2012). Des études menées dans mon équipe d'accueil ont démontré l'importance du gène *AtNAS4* dans la synthèse de NA. En effet, le mutant *nas4* n'exprimant pas le gène correspondant contient 27 à 55 % de moins de NA que les plantes sauvages selon les organes. L'hypersensibilité du mutant *nas4* sur un milieu carencé en fer ainsi qu'en réponse à l'exposition au cadmium a révélé un rôle majeur d'*AtNAS4* dans ces deux processus. En particulier, l'analyse du mutant *nas4* a mis en exergue une dérégulation de l'expression du système d'import du fer IRT1/FRO2. Ces résultats soulignent le rôle déterminant d'*AtNAS4* dans l'homéostasie du fer chez *A. thaliana* en particulier dans la réponse adaptative à la carence en fer (Koen *et al*, 2013a).

Enfin, la dernière étape dans le transport du fer est son déchargement et son import dans les organes puits. Comme mentionné plus haut, les protéines de la famille des YSL semblent être impliquées dans le chargement et le déchargement des complexes Fe^{2+} -NA ou Fe^{3+} -Citrate (Kim & Guerinot, 2007 ; Samira *et al*, 2013). En effet, trois protéines de la famille des YSL (ZmYS1, OsYS2 et TcYSL3) sont capables de transporter le complexe Fe^{2+} -NA (Briat *et al*, 2007). De plus, l'existence de plusieurs gènes *AtYSL* et leur expression spécifique suggèrent que ces derniers jouent un rôle important dans l'import de fer dans différents tissus de la plante (Kim & Guerinot, 2007). Par exemple, *AtYSL1* et *AtYSL3* sont exprimés dans divers tissus (racines, feuilles, fleurs et tissus vasculaires) et sont régulés lors d'une carence en fer. L'absence d'expression d'*AtYSL1* et d'*AtYSL3* dans le double mutant *ysl1ysl3* d'*A. thaliana* a pour conséquence une forte chlorose internervaire ainsi qu'une réduction de la fertilité (Waters *et al*, 2006). Ce phénotype étant partiellement annulé par l'application foliaire de complexes Fe-EDTA, les auteurs ont conclu que ces protéines sont nécessaires au maintien de l'homéostasie du fer pendant la croissance végétative et celle des organes reproducteurs. L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse selon laquelle la distribution du fer dans les tissus implique des protéines de la famille YSL (figure I.4, I.5 et I.6). Toutefois, l'échange de solutés entre le phloème et les tissus peut également s'effectuer par les plasmodesmes ou un transport à travers la membrane plasmique (figure I.5)(Lalonde *et al*, 2003 ; Grillet *et al*, 2014). Le passage de

I. Introduction

fer complexé au niveau des plasmodesmes pourrait faire intervenir la protéine OPT3 (*oligopeptide transporter 3*) de la famille des transporteurs d'oligopeptides (Grillet *et al*, 2014). Chez les levures, OPT3 est capable de transporter le fer (Wintz *et al*, 2003). De plus, l'analyse de mutants déficients dans l'expression d'*AtOPT3* chez *A. thaliana* montre une surexpression d'*AtIRT1* et *AtFRO2*, malgré une importante quantité de fer présente dans les feuilles (Stacey *et al*, 2002). Cependant, le rôle exact d'OPT3 dans le transport et/ou l'homéostasie du fer reste à déterminer.

2.3. Le fer intracellulaire : utilisation et stockage

Au niveau cellulaire, le fer est majoritairement concentré et utilisé dans les mitochondries et les plastes. En effet, les chloroplastes contiennent environ 80 % du fer présent dans les cellules foliaires (Nouet *et al*, 2011). Des protéines potentiellement associées au transport chloroplastique et mitochondrial du fer ont été identifiées. Par exemple, au niveau des chloroplastes, PIC1 (*permease in chloroplast 1*), une protéine située sur la membrane interne des chloroplastes et initialement identifiée comme responsable du transport de protéines, est capable de transporter du fer. En effet, chez les mutants *pic1* d'*A. thaliana*, une chlorose sévère, un phénotype de nanisme ainsi qu'une dérégulation de l'homéostasie du fer ont été observés, indiquant un rôle important de la protéine dans la distribution du fer intracellulaire (Duy *et al*, 2007). La recherche d'homologues chez *A. thaliana* du transporteur mitochondrial de fer chez le riz appelé MIT (*mitochondrial Fe transporter*)(Bashir *et al*, 2011) a conduit à l'identification du gène *AtMf1*, codant pour la protéine *mitoferrinlike1*. L'analyse de l'expression de ce gène ainsi que l'analyse de mutants T-DNA modifiés dans son expression semblent confirmer l'implication de la protéine correspondante dans l'import de fer dans les chloroplastes (Tarantino *et al*, 2011). Une réductase ferrique, FRO7, a également été identifiée au niveau des chloroplastes. Chez le mutant d'*A. thaliana fro7*, la diminution importante de l'activité réductase ferrique ainsi que la réduction du fer présent dans les chloroplastes démontrent l'implication de FRO7 dans l'import du fer chloroplastique (Jeong *et al*, 2008). Au niveau des mitochondries, peu de protéines associées au transport de fer ont été clairement identifiées. Toutefois, comme pour les chloroplastes, il semble qu'une activité réductase ferrique soit nécessaire. La protéine FRO8, identifiée dans le protéome de la mitochondrie, pourrait remplir cette fonction (Nouet *et al*, 2011). Concernant le transport proprement dit, trois orthologues d'un ABC transporteur mitochondrial de levure

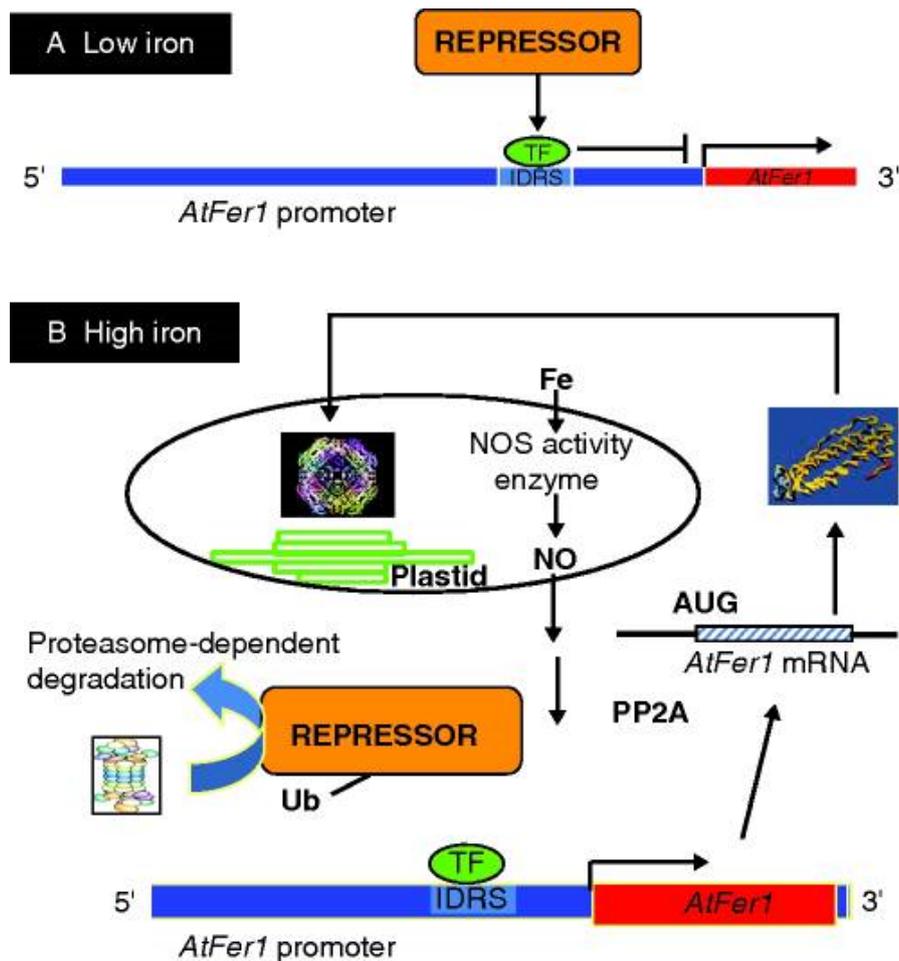


Figure I.7 : Modèle de régulation de l'expression du gène *AtFER1* (d'après Briat *et al*, 2010)

A. Au cours d'une carence en fer, un répresseur agit indirectement sur une séquence régulatrice IDRS (*iron-dependent regulatory sequence*) située dans le promoteur d'*AtFER1*, probablement *via* un facteur de transcription (*TF*) encore inconnu, le tout conduisant à la répression de l'expression du gène *AtFER1*.

B. Lors d'un excès de fer, une production de NO a lieu au sein des plastes ce qui entraîne l'ubiquitinylation ainsi que la dégradation du répresseur mentionné en A. *via* le protéasome. Des événements de déphosphorylation catalysés par une ser/thr phosphatase (PPA2) sont également impliqués dans ce mécanisme mais le rôle exact de cette protéine n'a pas encore été élucidé. Ces événements permettent ainsi la dé-répression de l'expression du gène *AtFER1*, la synthèse de la protéine ainsi que son assemblage dans les plastes.

I. Introduction

(ScATM1) permettant l'export de clusters Fe-S ont été identifiés chez *A. thaliana*. AtATM1, AtATM2 et AtATM3 (ou STA1) sont également mitochondriaux. AtATM3 (STA1) est capable de compléter le mutant de levure *Scatm1*, suggérant un rôle similaire de cette protéine *in planta* (Kushnir *et al*, 2001 ; Jeong & Guerinot, 2009).

Le fer importé dans les plastes et les mitochondries peut être stocké sous forme de complexes avec les ferritines (Briat *et al*, 2010 ; Darbani *et al*, 2013). Les ferritines sont des assemblages de 24 sous-unités, formant une sphère dont la cavité est capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer (Kim & Guerinot, 2007) représentant ainsi un pool de fer très important et accessible. Le fer est stocké sous forme Fe³⁺. Il est préalablement oxydé par le domaine ferroxidase des ferritines (Briat *et al*, 2010). En revanche, le mécanisme permettant la libération du fer stocké est actuellement mal connu (Jain & Connolly, 2013). *A. thaliana* possède quatre isoformes de ferritine, AtFER1 à AtFER4. En fonction de son stade de développement et des différents signaux environnementaux, la plante exprimera préférentiellement une isoforme plutôt qu'une autre (Petit *et al*, 2001 ; Briat *et al*, 2010). Par exemple, lors d'un excès de fer, l'expression d'AtFER1 est principalement induite (Petit *et al*, 2001 ; Ravet *et al*, 2009). Les mécanismes de régulation de l'expression d'AtFER1 sont présentés dans la figure I.7 (d'après Murgia *et al*, 2002 ; Arnaud *et al*, 2006 ; Briat *et al*, 2010). L'analyse du triple mutant d'*A. thaliana fer1-3-4* invalidé dans l'expression des isoformes 1, 3 et 4 de ferritine et du mutant *fer2* n'exprimant pas la protéine correspondante ne révèle aucun phénotype significatif, excepté une réduction de croissance pour *fer1-3-4* lors d'une culture avec d'importantes quantités de fer. Ces résultats indiquent que les ferritines d'*A. thaliana* ne constituent pas un élément majeur de stockage du fer contrairement au pois (Ravet *et al*, 2009). En revanche, la forte sensibilité de ces mutants à des agents oxydants, ainsi que l'augmentation d'activité des enzymes de détoxification des ROS, mettent en évidence leur importance dans la réponse au stress oxydatif (Ravet *et al*, 2009). De manière plus générale, ces protéines sont essentielles pour la séquestration du fer et ainsi limitent le stress oxydatif et les dégâts associés (Jain & Connolly, 2013). Dans les mitochondries, le fer peut être également lié à des frataxines (FH). Le mutant d'*A. thaliana* «*know-down*» *atfh* présente des niveaux élevés de fer et de ROS dans les mitochondries (Martin *et al*, 2009). De même que son homologue chez la levure, la FH d'*A. thaliana* assure un rôle de chaperonne vis-à-vis du fer. Chez ce mutant, on note une réduction des activités de l'aconitases, de la succinate déshydrogénase (deux protéines à clusters Fe-S) et de la

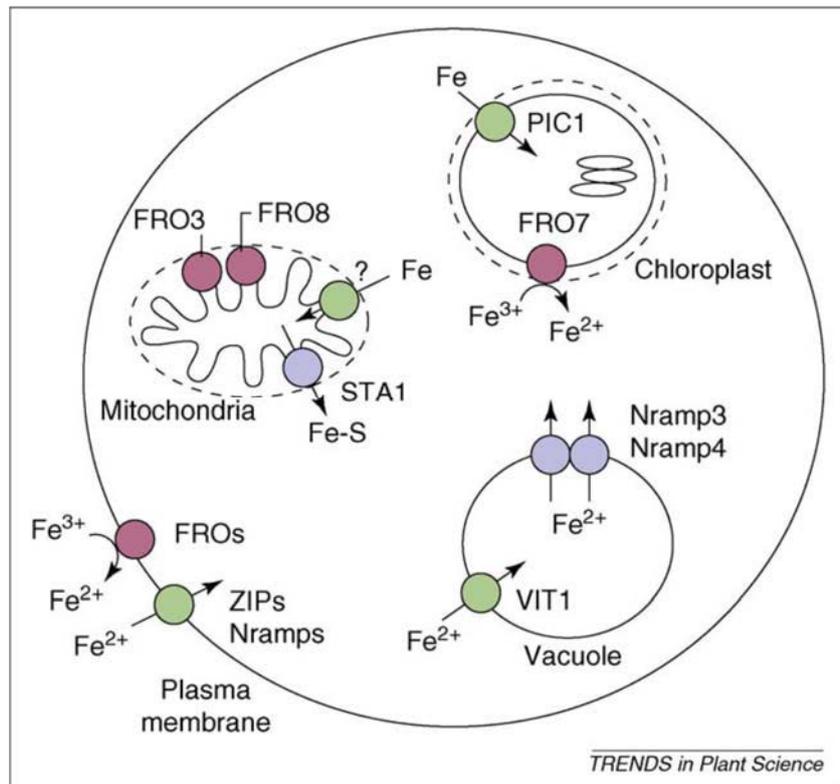


Figure I.8 : Protéines impliquées dans le transport et la compartimentation du fer dans la cellule végétale (d'après Jeong & Guerinot, 2009)

Des protéines des familles ZIP/IRT et FRO sont impliquées dans l'import du fer dans la cellule. Les trois compartiments ayant un rôle majeur dans l'homéostasie du fer sont le chloroplaste, la mitochondrie et la vacuole. Les ronds roses représentent des réductases ferriques. Les transporteurs impliqués dans l'import de fer sont présentés en vert, ceux spécifiques à l'export des compartiments intracellulaires au cytosol sont présentés en bleu.

I. Introduction

catalase mitochondriale (contenant de l'hème) (Maliandi *et al*, 2011 ; Turowski *et al*, 2012). Ces résultats mettent en évidence le rôle des FH dans la protection contre les stress oxydatifs et la biosynthèse de l'hème et des clusters Fe-S (Maliandi *et al*, 2011 ; Jain & Connolly, 2013).

Outre le chloroplaste et la mitochondrie, la vacuole peut accumuler des quantités importantes de fer. Il a été proposé que celle-ci serait impliquée dans le stockage du fer en excès et dans sa redistribution vers le cytosol en cas de besoin (Kim & Guerinot, 2007 ; Darbani *et al*, 2013). Ce rôle de stockage et de redistribution du fer semble impliquer la NA (Pich *et al*, 2001) mais dans la graine et au cours des premiers jours de la germination, des phytates peuvent également être mobilisés (Darbani *et al*, 2013). Chez *A. thaliana*, Kim *et al*. (2006) ont identifié un transporteur impliqué dans le stockage du fer dans la vacuole. Il s'agit de VIT1 (*vacuolar iron transporter 1*). Ce dernier présente 62 % d'homologie avec le transporteur de fer vacuolaire CCC1 de levure. L'insertion du gène *AtVIT1* permet en outre de compléter le mutant *ccc1* de levure. Des mutants d'*A. thaliana* invalidés dans l'expression de VIT1 présentent une réduction de croissance en condition de carence de fer et une perturbation de la distribution du fer, en particulier dans la graine, démontrant ainsi l'importance du stockage vacuolaire du fer (Kim *et al*, 2006 ; Kim & Guerinot, 2007).

Une fois stocké dans la vacuole, le fer doit pouvoir être remobilisé. Cette fonction est assumée par des membres de la famille protéique NRAMP (*natural resistance associated macrophage protein*). *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4*, codent pour deux protéines NRAMP qui sont localisées dans le tonoplaste. Leur expression est induite lors d'une carence en fer. Tout comme les mutants *vit*, les mutants n'exprimant pas *NRAMP3* ou *NRAMP4* présentent une croissance et une germination affectées en condition de carence en fer, soulignant leur rôle essentiel dans la remobilisation du fer de la plante (Thomine *et al*, 2003 ; Lanquar *et al*, 2005).

L'ensemble de ces éléments, résumé figure **I.8**, démontre l'importance du fer pour la plante et illustre la nécessité de disposer de mécanismes efficaces pour son assimilation, son stockage et la régulation fine de son homéostasie comme décrite ci-dessous.

2.4. La régulation de l'homéostasie du fer

Les acteurs de l'homéostasie du fer sont finement régulés au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel. Les processus signalétiques sous-jacents à ces régulations font l'objet de nombreux travaux.

Au niveau transcriptionnel, le premier élément à avoir été découvert est le facteur de transcription FER chez la tomate (Ling *et al*, 2002). Ce dernier régule l'expression de *LeNRAMP* et de *LeIRT1*, impliqués respectivement dans l'import et la remobilisation du fer (Bereczky *et al*, 2003). Un gène homologue de *LeFER* a été identifié chez *A. thaliana* : il s'agit d'*AtbHLH29* (*basic helix-loop-helix 29*) également nommé *FER like iron deficiency induced transcription factor* (FIT) (Colangelo & Guerinot, 2004). Tout comme *LeFER*, l'expression d'*AtFIT* est induite dans les racines en condition de carence en fer (Kobayashi & Nishizawa, 2012). Consécutivement à l'expression d'*AtFIT*, plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie du fer sont également induits, en particulier *AtNRAMP1*, *AtFRO2*, *AtNAS1* et *AtIRT1* (Colangelo & Guerinot, 2004). L'activation de FIT et, en conséquence, l'induction du système d'import du fer requièrent son association avec certains partenaires (Colangelo & Guerinot, 2004 ; Jakoby *et al*, 2004), en particulier les protéines bHLH38 (ou ORG2) et bHLH39 (ou ORG3) (Yuan *et al*, 2008). D'autres facteurs de transcription de type bHLH fortement induits lors d'une carence en fer ont été identifiés. Par exemple, bHLH100 et bHLH101 régulent positivement l'expression de gènes dont les protéines sont impliquées dans la remobilisation et le transport du fer, telles que NRAMP3, NRAMP4 et les NAS. Malgré leur proximité phylogénétique avec ORG2 et ORG3 qui sont nécessaires à l'action de FIT, bHLH100 et bHLH101 agissent indépendamment de celui-ci (Sivitz *et al*, 2012). Le rôle de ces facteurs de transcription reste encore peu compris et une étude récente démontre de manière contradictoire que l'implication de bHLH39 dans l'acquisition du fer serait indépendante de l'induction de l'expression d'*AtIRT1* et *AtFRO2* (Maurer *et al*, 2014). De plus, les auteurs de cette étude suggèrent que les trois facteurs bHLH (39, 100 et 101) seraient impliqués dans l'adaptation des feuilles et des racines à la carence en fer. Cette famille multigénique, dont les membres pourraient présenter des fonctions redondantes, complique le décryptage de leurs fonctions propres. Des analyses complémentaires à l'aide du quadruple mutant *bhlh38 bhlh39 bhlh100 bhlh101* seraient souhaitables. Par ailleurs, d'autres facteurs de transcription ont récemment été découverts. L'analyse du double mutant *myb10 myb72* a démontré

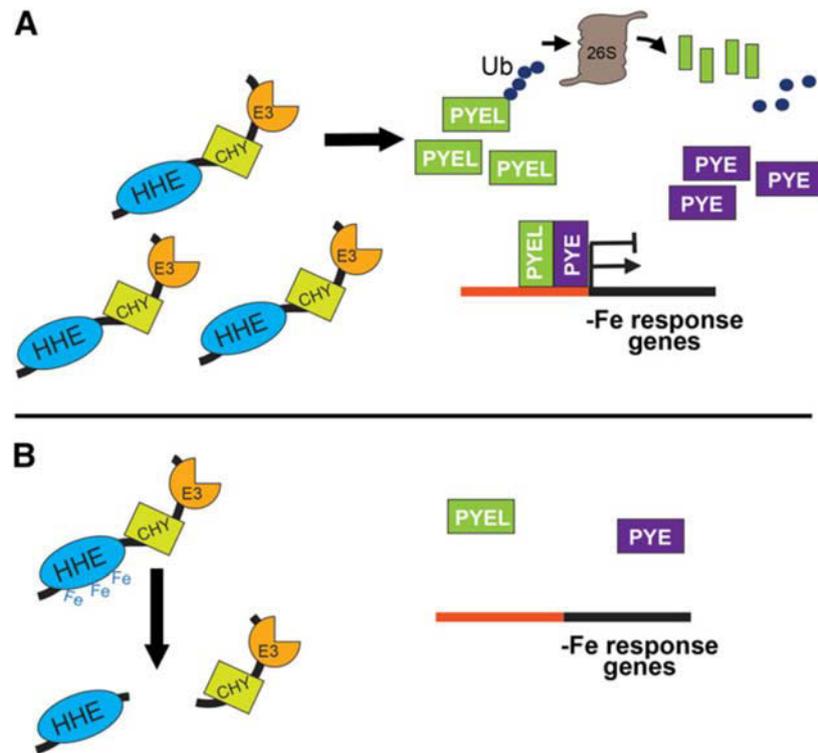


Figure I. 9 : Modèle d'action et de régulation du facteur de transcription BRUTUS (BTS). La protéine BTS se caractérise par une activité E3 ligase (E3), trois domaines d'hémérythrine (HHE) de fixation du Fe et un doigt de zinc de type CHY (d'après Selote *et al*, 2015)

A. BTS, POPEYE (PYE) ainsi que ses partenaires (PYE Like ou PYEL) sont induits en réponse à la carence en fer. En absence de fer, la protéine BTS est stable et reste active. Grâce à son activité E3 ligase, celle-ci déstabilise les complexes PYE/PYEL *via* l'ubiquitinylation et la dégradation par le protéasome des protéines PYEL. Ce processus assure une régulation fine de la réponse à la carence en fer induite par ces complexes.

B. Lorsque du fer est à nouveau présent, l'expression de BTS, PYE et des PYEL est réprimée. Le fer assimilé par la plante et présent dans la cellule est détecté par BTS *via* ses domaines HHE. La fixation du fer sur BTS déstabilise la protéine et induit sa protéolyse, aboutissant à la réduction de l'activité E3 ligase.

I. Introduction

l'importance de ces deux facteurs de transcription dans la survie en condition de carence en fer. De plus, MYB72 est régulé par FIT (Sivitz *et al*, 2012). L'implication de MYB10 et MYB72 dans la résistance à la carence en fer passe majoritairement par l'induction des NAS (2 et 4) qui est nécessaire à une correcte acquisition et distribution du fer dans la plante (Palmer *et al*, 2013).

Alors que FIT et ses partenaires agissent majoritairement au niveau de l'épiderme, un autre ensemble de facteurs de transcription agit au niveau des tissus vasculaires. La protéine bHLH47, aussi nommée POPEYE (PYE) et l'ubiquitine-ligase E3 BRUTUS (BTS) font partie de ce second réseau de régulation (Long *et al*, 2010). Des planles d'*A. thaliana* invalidées dans l'expression d'*AtPYE* (*pye-1*) présentent une réduction de croissance en condition de carence en fer ainsi qu'une inhibition de l'acidification de la rhizosphère et de l'activité réductase ferrique. Ces résultats suggèrent le rôle de régulateur positif de PYE au cours de la carence en fer. Les cibles de PYE actuellement identifiées sont impliquées dans l'homéostasie et la distribution des métaux et incluent NAS4, FRO3 et ZIF1, un transporteur vacuolaire impliqué dans la tolérance au zinc. L'expression prolongée de ces gènes cibles dans des plantes invalidées dans l'expression de PYE en condition de carence en fer indique que ce dernier réprime leur expression. A l'image de FIT, PYE interagit également avec des partenaires dont BTS ainsi que d'autres protéines bHLH (PYE Like (PYEL) : ILR3, bHLH104 et bHLH115) (Long *et al*, 2010 ; Selote *et al*, 2015). Le mutant *bts* n'exprimant pas la protéine correspondante présente constitutivement certaines caractéristiques de la carence en fer telles que l'allongement des racines ou une activité d'acidification de la rhizosphère. Ces observations suggèrent que BTS pourrait réguler négativement les réponses mises en place lors d'une carence en fer (Long *et al*, 2010). En addition de ce rôle de régulation, une étude récente indique que BTS pourrait agir comme un senseur de fer chez *A. thaliana* (Kobayashi & Nishizawa, 2014). La présence de trois domaines d'hémérythrine (HHE), un domaine commun chez les protéines bactériennes et animales capable de fixer le fer, appuie cette hypothèse. BTS est capables de fixer *via* ses domaines HHE du fer et du zinc *in vitro* (Kobayashi *et al*, 2013). De plus, une étude récente indique qu'en présence de fer (ferreux et/ou ferrique), la protéine BTS est déstabilisée, ce qui conduit à une diminution de son accumulation (Selote *et al*, 2015). Les auteurs supposent que les domaines HHE permettent de réguler la quantité de BTS active dans la cellule en fonction de la disponibilité du fer. Dans cette même étude, les auteurs proposent un mode d'action pour BTS (voir figure I.9). Le domaine RING de BTS, caractéristique de

I. Introduction

protéines à activité ligase E3, serait impliqué dans la régulation des protéines de l'homéostasie du fer. En effet, *via* l'ubiquitylation et l'adressage au protéasome de ces protéines cibles, BTS pourrait contrôler leur accumulation et donc moduler leurs activités. Même si actuellement les cibles de BTS ne sont pas identifiées, des protéines telles que FIT ou d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'homéostasie du fer sont des candidats potentiels (Kobayashi & Nishizawa, 2014). L'étude récente de Selote *et al.* (2015) propose trois cibles pour BTS : ILR3, bHLH104 et bHLH115 (PYE Like PYEL). Leur dégradation conduirait à une déstabilisation de leur complexation avec PYE, aboutissant alors à une modification de la régulation de l'homéostasie du fer (Figure I.9 A)(Selote *et al.*, 2015). Malgré ces éléments récents, des études plus poussées seront nécessaires afin d'identifier les rôles précis de PYE et BTS.

Les voies de signalisation associées à la régulation de l'homéostasie du fer impliquent également des hormones. Ce lien fonctionnel a été révélé par la découverte d'une interaction entre le facteur de transcription FIT et les deux facteurs de transcription *ethylene insensitive3* (EIN3) et *ethylene insensitive3-like1* (EIL1) impliqués dans la réponse à l'éthylène (Et) (Lingam *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la production d'éthylène induite par une carence en fer conduit à la stabilisation de FIT *via* son interaction physique avec EIN3 et EIL1 aboutissant à une expression plus importante des gènes cibles de FIT associés à l'import de fer. Les auxines sont aussi mobilisées au cours de la carence en fer. Cette situation physiologique conduit en effet à l'accumulation de ces hormones, celles-ci étant impliquées dans la formation de racines secondaires et étant corrélées à une expression accrue de *FIT* et de *FRO2* (Giehl *et al.*, 2012). En effet, une augmentation du taux d'accumulation de ces transcrits est observée chez des plantes d'*A. thaliana* surproduisant des auxines, alors qu'à l'inverse des plantes d'*A. thaliana* privées d'auxines voient l'expression de ces gènes diminuer en comparaison avec une plante sauvage (Chen *et al.*, 2010). L'acide abscissique (ABA), est également associé à la régulation de l'homéostasie du fer. Lei *et al.* (2014) ont montré que, contrairement aux autres hormones qui semblent plutôt contribuer à la mise en place des systèmes d'import, l'ABA serait impliqué dans la remobilisation du fer, majoritairement apoplastique, des racines vers les feuilles. Selon cette étude, l'ABA agirait initialement au niveau des racines, en rendant le fer plus disponible. On retrouve également plus de fer au niveau du transport xylémique. En effet, l'application exogène d'ABA sur des plantes d'*A. thaliana* en condition de carence en fer augmente l'expression de gènes codant des

I. Introduction

protéines de transport du fer *in planta* telles que FRD3, YSL2 et NAS1 (Lei *et al*, 2014). Enfin, il est important d'indiquer que l'acide jasmonique (JA), une hormone impliquée dans la réponse à différents stress (blessures, insectes, lumière) a été décrit comme un régulateur négatif de la réponse à la carence en fer (Maurer *et al*, 2011 ; Hindt & Guerinot, 2012). Maurer *et al* (2011) ont démontré que le JA inhibe l'expression d'*AtIRT1* et *AtFRO2* indépendamment de FIT. Ces auteurs suggèrent que le JA pourrait avoir un rôle dans la régulation fine des mécanismes mis en place en réponse à la carence en fer sans pour autant réprimer systématiquement celle-ci. Une autre possibilité serait que la réduction de l'import de fer dépendante du JA constitue un système de défense contre les pathogènes nécrotrophes, dont les enzymes impliquées dans le développement des nécroses sont Fe-dépendantes (Maurer *et al*, 2011 ; Hindt & Guerinot, 2012).

Enfin, le monoxyde d'azote (NO, voir chapitre V) semble également avoir un rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer, ceci dans des conditions d'excès comme de carence. En effet, le traitement par des donneurs de NO (sodium nitroprusside (SNP) et S-nitroso-N-acétylpénicillamine (SNAP)) de plants de maïs cultivés en condition de carence en fer permet de réduire fortement la chlorose internervaire. Ces plants de maïs retrouvent une taille et un taux de chlorophylle similaires à ceux de plants cultivés dans un milieu non carencé en fer (Graziano *et al*, 2002). De plus, le traitement par du SNP de plants de maïs déficients dans l'acquisition du fer (mutants *ys1* et *ys3*) et de plants de riz déficients dans l'acquisition et la distribution du fer (mutant *ysl15*) conduit à l'annulation des phénotypes chlorotiques (Graziano *et al*, 2002 ; Lee *et al*, 2009a). Une étude similaire sur des embryons de sorgho a montré qu'en condition de carence en fer, le NO exogène améliore la quantité de fer mobile (*labile iron pool* ou LIP) et la disponibilité du fer, mais ne permet pas l'augmentation de la quantité de fer total dans la plante (Jasid *et al*, 2008). *In planta*, le NO est rapidement produit par les racines de tomates lors de la carence en fer et agit comme un régulateur positif de l'expression des gènes impliqués dans l'import de fer (*LeFER*, *LeIRT1* et *LeFRO2*) (Graziano & Lamattina, 2007). De plus, le traitement d'*A. thaliana* par le nitrosoglutathion (GSNO), un donneur physiologique de NO, conduit à l'expression des gènes IDED (*iron deficiency-induced ethylene-dependent*) tels qu'*AtFIT* mais aussi *AtFRO2* ou encore *AtIRT1*, indiquant un lien fonctionnel entre le NO et l'Et (García *et al*, 2010 ; thèse E. Koen, 2012). Un lien NO-auxine a également été mis en évidence chez les mutants d'*A. thaliana* *noa1* et *nia1-nia2* produisant des quantités réduites de NO. En condition de carence en fer, ces plantes présentent une moindre

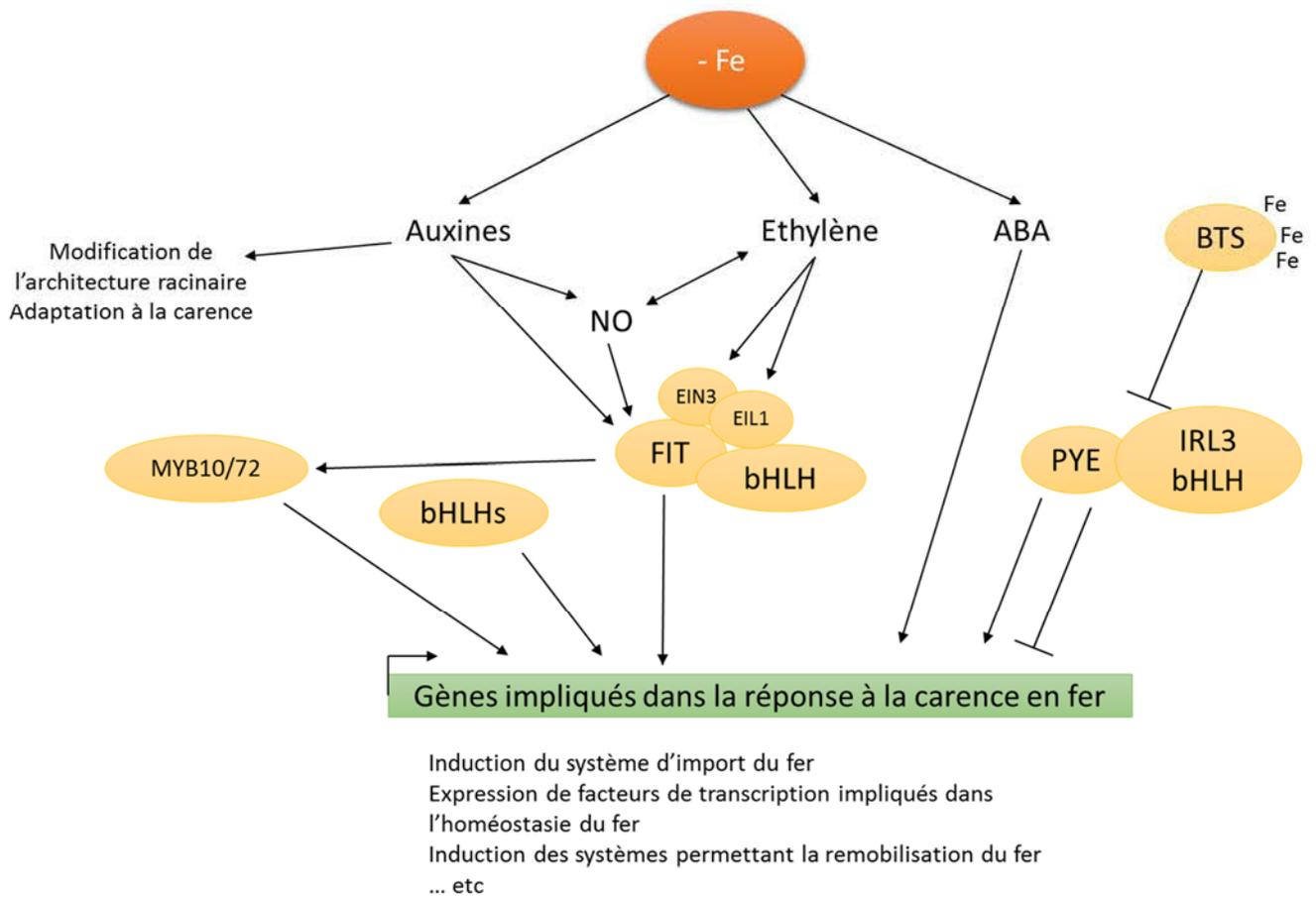


Figure I.10 : Résumé des différents éléments de la régulation de la réponse à une carence en fer chez *A. thaliana* (d'après Brumbarova *et al*, 2015)

Lors d'une carence en fer, plusieurs hormones ainsi que le NO sont produits et induisent l'expression de gènes dont les protéines sont impliquées dans la réponse à la carence. De nombreux facteurs de transcriptions tel que FIT, PYE ou BTS (figure I.9), sont également impliqués dans cette cascade de signalisation. L'ensemble de ces interactions permet la mise en place et une régulation fine des mécanismes moléculaires permettant l'import de fer ainsi que la remobilisation du fer stocké dans la plante.

I. Introduction

activité réductase ferrique. L'insensibilité de ces plantes suite à un traitement NAA (un analogue des auxines) démontre que les auxines agissent en amont du NO dans la régulation de l'expression des gènes tels que *FRO2* et *FIT* (Chen *et al*, 2010). Une étude récente indique par ailleurs que le NO augmente la stabilité de FIT en réduisant sa dégradation par le protéasome (Meiser *et al*, 2011). Le NO semble donc être impliqué dans la régulation et la coordination des différents signaux permettant la mise en place de la réponse à la carence en fer. Toutefois, son mode d'action n'est pas déterminé mais il est envisageable qu'il agisse *via* la modification post-traductionnelle de protéines (S-nitrosylation, tyrosine-nitration ou métal nitrosylation) (Besson-Bard *et al*, 2008b).

Le NO est également impliqué dans la réponse lors d'un excès de fer. Murgia *et al* (2002) ont démontré le rôle du NO dans l'expression d'*AtFER1*. L'application de SNP mime un excès de fer et conduit à l'induction d'*AtFER1* alors que l'application de cPTIO (un piègeur de NO, 2-(4-carboxyphényl)-4,4,5,5-tetraméthylimidazole-1-oxyl-3-oxyle) sur des plantes d'*A. thaliana* cultivées en excès de fer inhibe l'expression d'*AtFER1* (Figure I.7). D'autre part, la présence de Fe²⁺ et de NO conduit très rapidement à la formation de MNIC ou DNIC (*Mono* ou *Di-Nitrosyl iron complexes*) rendant ainsi le Fe²⁺ indisponible pour la réaction de Fenton (Lu & Koppenol, 2005). Ce mécanisme pourrait être un moyen déployé par les cellules pour chélater le fer et ainsi réduire sa réactivité (Ramirez *et al*, 2011).

La régulation de l'homéostasie du fer chez les plantes est de mieux en mieux comprise mais de nombreuses zones d'ombres persistent encore. La figure I.10 (d'après Brumbarova *et al*, 2015) présente un résumé des différents éléments présentés ci-dessus.

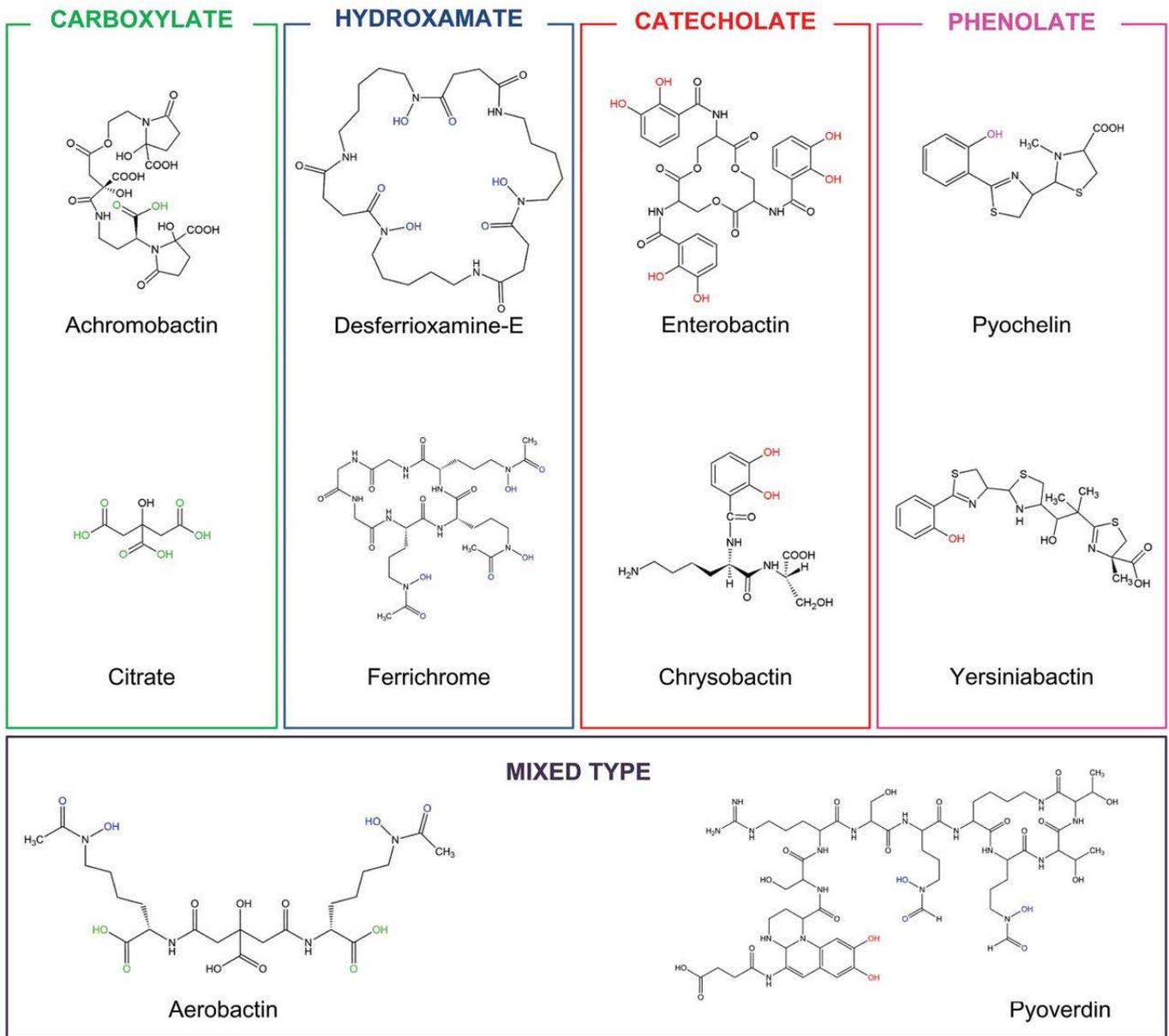


Figure I.11 : Exemple des différents types de sidérophores classés selon leurs groupements fonctionnels (Aznar & Dellagi, 2015).

Les groupements impliqués dans la coordination du fer sont indiqués en rouge pour les catécholates, en violet pour les phénolates, en bleu pour les hydroxamates et en vert pour les carboxylates.

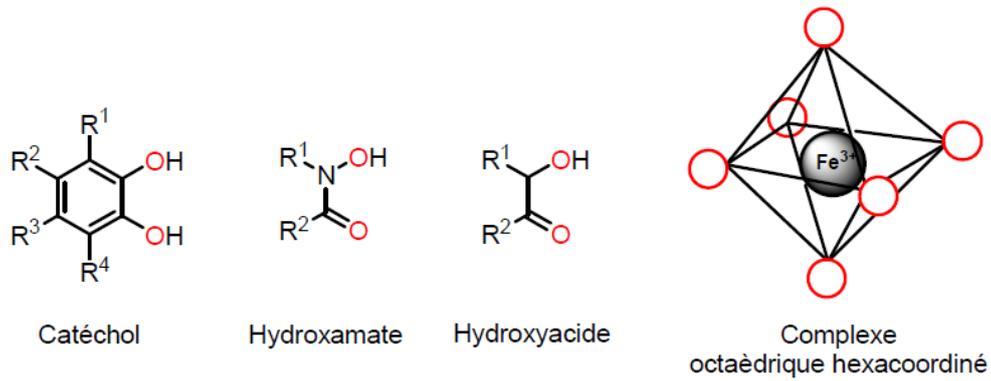
3. Les sidérophores bactériens

Les microorganismes aérobies hétérotrophes du sol, et tout particulièrement ceux de la rhizosphère, ont développé une stratégie active d'acquisition du fer ferrique en situation de carence, pour assimiler le fer nécessaire à leur métabolisme. Chez les bactéries aérobies, le système d'assimilation du fer le plus répandu est basé sur la synthèse de sidérophores et de protéines membranaires réceptrices des complexes ferri-sidérophores permettant l'import du complexe dans la bactérie (Cornelis, 2010). A l'image des phytosidérophores, les sidérophores bactériens sont des molécules organiques de faible masse moléculaire (<2500 Da) présentant une importante affinité pour le fer. Leur principale fonction est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer présent dans le sol pour permettre son assimilation par la bactérie. Les sidérophores peuvent avoir des structures très variables.

3.1. Généralités

Les sidérophores, chélateurs organiques de 500 à 2500 Daltons, possèdent une très forte affinité et sélectivité pour le fer ferrique Fe^{3+} . Les sidérophores ont été beaucoup étudiés au cours de ces dernières années et plus de 500 ont été dénombrés dont plus de 60 pyoverdines (Chu *et al*, 2010 ; Hider & Kong, 2010 ; Schalk & Guillon, 2013b). En général, l'affinité des sidérophores pour le fer se caractérise par une constante d'affinité d'environ $10^{30} M^{-1}$ (Meyer & Abdallah, 1978 ; Schalk *et al*, 2011) mais certains sidérophores peuvent présenter des affinités plus élevées comme par exemple l'entérobactine avec une constante d'équilibre record de $10^{49} M^{-1}$ (Hay *et al*, 2001). En fonction de la nature chimique des groupes chélatants, les sidérophores sont classés en trois catégories : les catécholates (qui incluent également les phénolates), les hydroxamates et les carboxylates (Miethke & Marahiel, 2007 ; Aznar & Dellagi, 2015). L'analyse des structures des sidérophores a également révélé l'existence de groupes mixtes comme illustré dans la figure I.11 (Aznar & Dellagi, 2015). Ces structures sont composées de plusieurs groupes chélatants bidentés (figure I.12. A). Une molécule généralement hexadentée est obtenue *in fine* et s'associe avec les atomes de fer sous forme de complexe octaédrique hexacoordonné (figure I.12.A)(Hider & Kong, 2010 ; thèse E. Yeterian, 2010). La figure I. 12. B présente l'exemple de l'entérobactine de *E. coli* qui chélate le fer à l'aide de trois groupes bidentés de type catécholate (Raymond *et al*, 2003 ; Hider & Kong, 2010). Les atomes impliqués dans la fixation du fer sont majoritairement

A.



B.

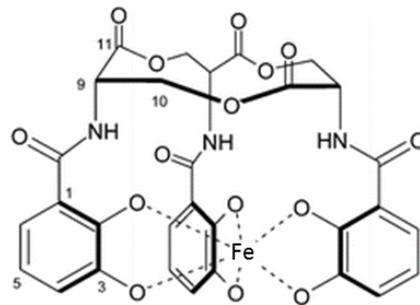


Figure I.12 : Groupements fonctionnels des sidérophores permettant la fixation du fer

A. Exemple de groupes bidentés inclus dans les sidérophores (les atomes impliqués dans la fixation du fer sont indiqués en rouge) et organisation spatiale de ces groupes autour de l'atome de fer(III) après fixation (d'après thèse E. Yétérian, 2010)

B. Exemple de l'entérobactine d'*E. coli* complexée à un atome de fer *via* trois groupes bidentés catécholates (d'après Raymond *et al*, 2003)

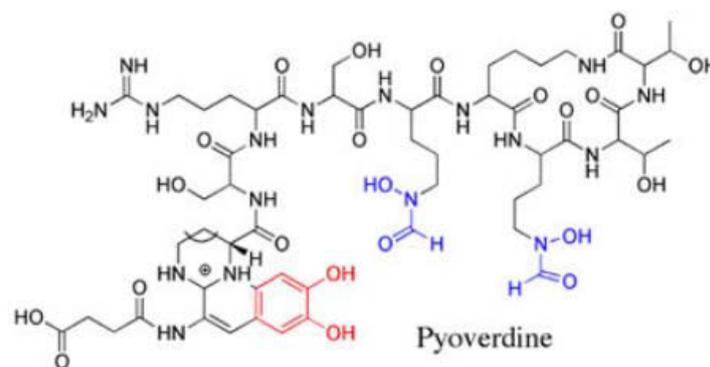


Figure I.13 : Structure de la pyoverdine de *P. aeruginosa* (d'après Schalk & Guillon, 2013a)

Les groupements colorés sont impliqués dans la fixation du fer, en rouge le groupe catécholate et en bleu les groupes de la chaîne peptidique.

I. Introduction

des oxygènes. On observe parfois des atomes d'azote ou de soufre mais, comparativement aux atomes d'oxygène, il en résulte bien souvent une affinité réduite (Hider & Kong, 2010). La prédominance des atomes d'oxygène dans les groupes chélatants des sidérophores contribue à une meilleure affinité pour le fer ferrique que pour le fer ferreux. D'après Hider & Kong (2010), cette préférence pour l'ion Fe^{3+} a également une explication biologique. En effet, dans la mesure où il existe de nombreux cations divalents (Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), il est difficilement concevable qu'un chélateur soit très sélectif vis-à-vis du Fe^{2+} . Au contraire, la spécificité vis-à-vis du Fe^{3+} est confortée par la moindre occurrence de cations trivalents.

3.2. Les pyoverdines produites par les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les pyoverdines sont des pigments fluorescents vert-jaune solubles dans l'eau constituant les sidérophores majoritaires des *Pseudomonas* spp. fluorescents, bactérie très représentée dans l'environnement rhizosphérique et décrite comme ubiquiste (Meyer, 2000 ; Lemanceau *et al*, 2009). Ainsi, de nombreux travaux ont montré que les populations rhizosphériques de *Pseudomonas* spp. fluorescents apparaissent globalement plus aptes à mobiliser le fer que celles du sol nu (Lemanceau *et al*, 1988 ; Loper & Henkels, 1997). La capacité des pyoverdines à chélater et à importer le fer dans la cellule a été découverte en 1978 (Meyer & Abdallah, 1978 ; Meyer & Hornsperger, 1978).

Trois éléments structuraux composent les pyoverdines :

- (i) un chromophore dihydroxyquinoline fluorescent conservé dans toutes les pyoverdines, liant le Fe^{3+} par sa fonction catéchol,
- (ii) une chaîne latérale acyl (un acide dicarboxylique ou une amine selon la souche et/ou les conditions de croissance) liée en position C3 du chromophore,
- (iii) une chaîne peptidique variable également liée au chromophore par un groupe amine (Meyer, 2000 ; Visca *et al*, 2007 ; Schalk & Guillon, 2013b).

La chaîne peptidique est composée de 6 à 12 résidus amino-acides (Meyer, 2000 ; Budzikiewicz, 2004) et peut intégrer des acides aminés non-protéiques tels que l'ornithine et ses dérivés ou l'acide α - γ -di-amino-butyrique (DAB) ainsi que des acides aminés ayant une configuration D tels que la D-sérine ou la D-tyrosines comme dans la pyoverdine de *P. aeruginosa* PAO1 (Schalk & Guillon, 2013b). Le fer est complexé *via* des résidus d'acides aminés hydroxylés de la chaîne peptidique ainsi que le groupe *catechol*-

I. Introduction

like du chromophore, comme illustré dans la figure I.13 (Schalk & Guillon, 2013a). Meyer & Abdallah (1978) ont démontré que la pyoverdine de *P. fluorescens* s'associe avec le fer selon une constante d'affinité de l'ordre de 10^{32} à raison d'une molécule de pyoverdine pour un atome de fer (stœchiométrie 1 : 1). La chaîne peptidique peut être linéaire ou cyclique, sa composition et sa longueur varient fortement entre les espèces et même entre les souches d'une même espèce (Meyer, 2000 ; Schalk, 2008). Ainsi, cette diversité structurale des pyoverdines peut être utilisée comme marqueur taxonomique (Meyer *et al*, 2007 ; Meyer, 2010).

De par leurs propriétés chélatrices du fer, les pyoverdines exercent des fonctions diverses en particulier dans le contexte des interactions avec leurs hôtes. Elles peuvent agir comme facteur de virulence, comme par exemple chez *P. aeruginosa* ou *P. syringae* (§ 4.2.1 de l'introduction), elles sont impliquées dans le phénomène de biocontrôle notamment induit par les *P. fluorescens* ainsi que dans le déclenchement des réponses de défense des plantes (§ 4.1.4 et 4.2.2 de l'introduction). Enfin, elles permettent également de protéger la bactérie contre la toxicité des métaux présents dans l'environnement *via* leur chélation (Schalk *et al*, 2011). On peut également noter que, chez *P. aeruginosa*, la détection par la bactérie de ferri-pyoverdine induit l'activation transcriptionnelle de l'expression des gènes permettant la production et la sécrétion de facteurs de virulence (Lamont *et al*, 2002)

3.3. Synthèse des pyoverdines

La synthèse de pyoverdine est un processus complexe nécessitant de nombreuses étapes qui impliquent au moins 11 enzymes différentes et faisant intervenir plus de 20 gènes (Visca *et al*, 2007 ; Cézard *et al*, 2015). La synthèse de la pyoverdine est initiée dans le cytoplasme et se termine dans le périplasme, où elle est excrétée dans l'environnement extérieur de la bactérie par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. La synthèse de pyoverdine est très documentée pour la souche *P. aeruginosa* PAO1 (Cornelis, 2010 ; Schalk & Guillon, 2013b). Chez cette souche modèle, un premier ensemble, codé par les gènes *PaPvdL*, *PaPvdI*, *PaPvdJ* et *PaPvdD*, correspond à différentes enzymes de synthèse peptidique non ribosomique (NRPS : *non-ribosomal peptide synthases*). Ces enzymes assurent la synthèse de peptides non codés par un gène et, en conséquence, peuvent assembler des résidus distincts des vingt acides aminés de base (Schalk & Guillon, 2013b). Ces quatre NRPS débute la production de la pyoverdine par la synthèse d'un précurseur cytoplasmique

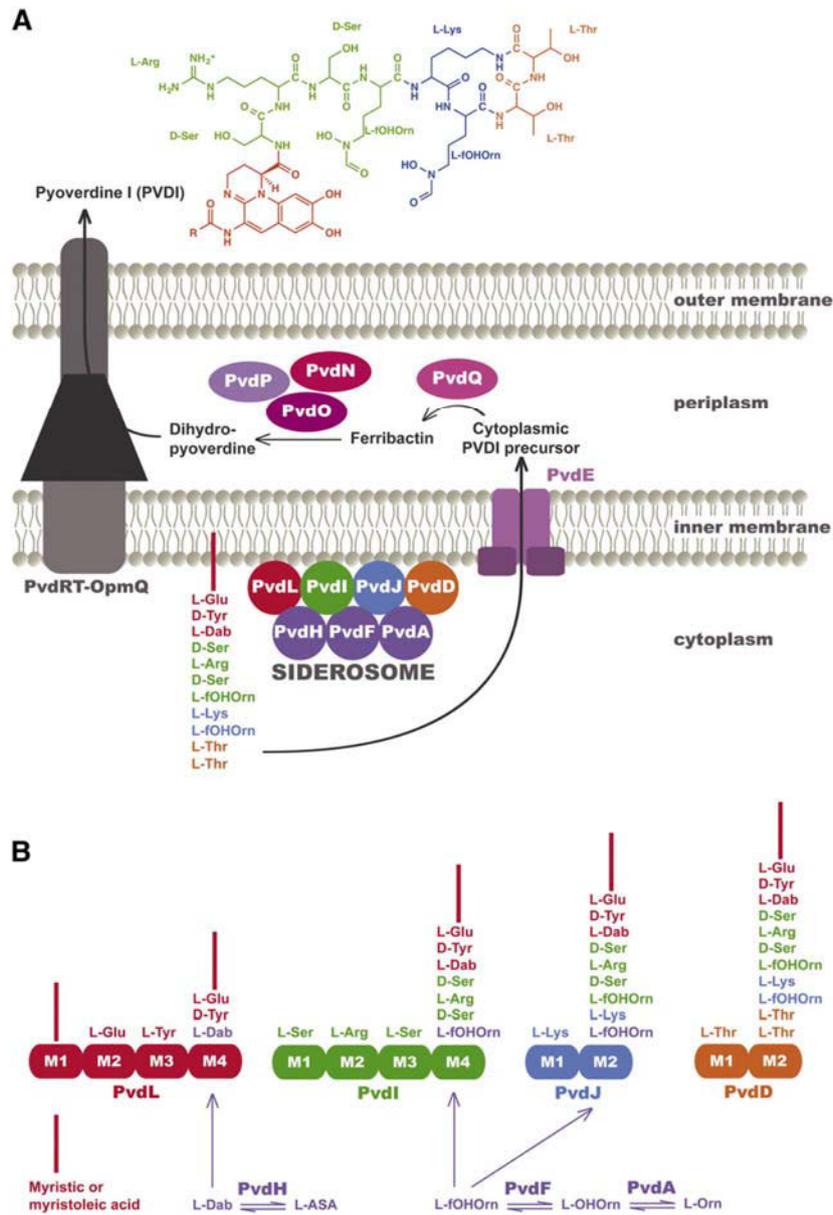


Figure I.14 : Synthèse de la pyoverdine I de *P. aeruginosa* (d'après Schalk & Guillon, 2013b ; Gasser *et al*, 2015)

La biosynthèse de la pyoverdine est initiée dans le cytoplasme et implique quatre enzymes de synthèse de peptides non ribosomiques (NRPS) : PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD (A). Ces protéines sont composées de deux à quatre modules (M1 à M4) permettant l'assemblage séquentiel des acides aminés formant le précurseur cytoplasmique (B). PvdA, PvdF et PvdH sont impliquées dans la production des acides aminés atypiques nécessaires à la synthèse. La ferribactine est ancrée à la membrane plasmique *via* un acide gras myristique ou myristoléique (A et B). Le précurseur passe dans le compartiment périplasmique *via* le transporteur PvdE. L'acide gras est retiré par une acylase PvdQ. La condensation de la Tyr et du DAB par PvdN, PvdO et PvdP conduit à la formation du chromophore. La pyoverdine mature est ensuite excrétée dans le milieu *via* la pompe ATP-dépendante PvdRT-OpmQ.

ASA, aspartate ; β -semialdehydesemialdéhyde ; DAB, 2,4-diaminobutyrate ; fOHOrn, Nd-formyl-Nd-hydroxyornithine ; OHOrn, Nd-hydroxyornithine ; Orn, ornithine ; R, acyl chain.

I. Introduction

(figure I.14)(Schalk & Guillon, 2013b ; Gasser *et al*, 2015). PvdA, PvdF et PvdH sont des enzymes cytoplasmiques indispensables à la production de pyoverdine car elles produisent des acides aminés non-protéiques nécessaires à la synthèse. Dans un second temps, le précurseur est excrété *via* la protéine transmembranaire PvdE (ABC transporteur) dans le périplasma où plusieurs étapes de maturation permettront la production de la ferribactine puis de la pyoverdine fluorescente. Un acide myristique ou myristoléique est attaché au premier résidu (N-ter) et permet le maintien à la membrane cytoplasmique du précurseur au cours des premières étapes de synthèse réalisées au sein d'un sidérosome (Schalk & Guillon, 2013b ; Gasser *et al*, 2015). Les sidérosomes sont des complexes multi-enzymatiques associés au feuillet interne de la membrane cytoplasmique contenant les NRPS impliquées dans la voie de biosynthèse des sidérophores (Gasser *et al*, 2015). PvdQ, une enzyme périplasmique, enlève cet acide myristique ou myristoléique, libérant ainsi le précurseur dans le périplasma pour sa maturation (Drake & Gulick, 2011 ; Gasser *et al*, 2015). PvdP est une tyrosinase impliquée dans la cyclisation du chromophore (Nadal-Jimenez *et al*, 2014). Les enzymes périplasmiques PvdN et PvdO sont impliquées dans la maturation de la pyoverdine mais leurs rôles exacts restent à déterminer (Voulhoux *et al*, 2006 ; Yeterian *et al*, 2010a ; Schalk & Guillon, 2013b ; Gasser *et al*, 2015). L'excrétion de la pyoverdine fait intervenir les produits de trois gènes *pvdT-pvdRT-ompQ* (Yeterian *et al*, 2010b), PvdT étant une protéine de la membrane interne/cytoplasmique, PvdR un adaptateur périplasmique, et OmpQ une protéine de la membrane externe formée d'un tonneau β et d'une extension périplasmique (Schalk & Guillon, 2013b). L'analyse des génomes d'autres *Pseudomonas* suggère qu'il existe des voies de biosynthèse similaires dans les autres souches et genres (Visca *et al*, 2007 ; Schalk & Guillon, 2013b). La protéine PvdL qui est impliquée dans la première étape de synthèse du précurseur et dans l'incorporation de la Tyr et du DAB formant le chromophore est fortement conservée, alors que PvdI, PvdJ and PvdD et PvdE sont très divergentes (Smith *et al*, 2005). La grande spécificité des enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques décrites ci-dessus conduit à la large diversité de structures et de parties peptidiques des pyoverdines.

3.4. Les récepteurs et l'assimilation du fer

Une fois excrétée dans le milieu extracellulaire, la pyoverdine chélate le fer ferrique présent dans le sol, puis le complexe ferri-pyoverdine est importé dans la

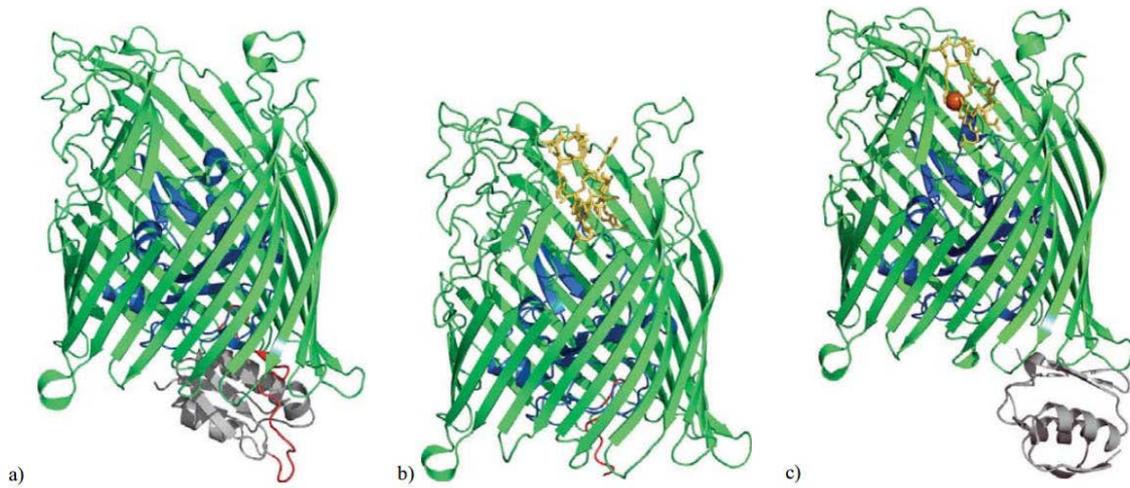


Figure I.15 : Structure cristallographique du transporteur TonB-dépendant FpvAI (d'après Cézard *et al*, 2015)

Les structures de FpvAI **(a)**, FpvAI-PvdI **(b)** et FpvAI-PvdI-Fe **(c)** sont présentées en vues de côté (milieu extracellulaire en haut et périplasma en dessous). Le tonneau β est en vert, le bouchon N terminal en bleu, la boucle périplasmique de signalisation en gris, la boîte TonB en rouge, la ferri-pyoverdine est représentée en jaune et le fer est symbolisé par une sphère rouge.

I. Introduction

bactérie afin d'internaliser le fer. Chez *P. aeruginosa*, plusieurs transporteurs impliqués dans l'import de la pyoverdine ont été identifiés, à raison d'un transporteur pour chacune des trois pyoverdines produites par cette bactérie. Le transporteur spécifique de la ferri-pyoverdine I localisé à la membrane externe, FpvAI, est le mieux caractérisé (Schalk, 2008 ; Cornelis, 2010). Ce transporteur de ferri-pyoverdine de type I est codé par le gène *fpvA*. Le transporteur FpvAI, tout comme les autres transporteurs de ferri-sidérophores connus, est composé de 3 domaines :

- un tonneau β , composé de 600 résidus amino-acides divisés en 22 feuillets β avec 11 boucles extracellulaires,

- un domaine N-terminal globulaire, appelé bouchon, localisé à l'intérieur du pore formé par le tonneau β . Ce domaine est composé d'un feuillet de 4 brins β de 150 résidus,

- une boîte TonB correspondant à une séquence de résidus amino-acides située dans le domaine N-terminal du bouchon, assurant la signalisation *via* l'interaction entre les récepteurs des sidérophores et la partie périplasmique de la protéine TonB (figure I.15)(Cézard *et al*, 2015). La conformation de la boucle périplasmique N-terminale est affectée par la fixation du substrat sur le récepteur (figure I.15)(Wirth *et al*, 2007 ; Schalk, 2008). Le site de reconnaissance du sidérophore est situé sur la face extracellulaire du récepteur et est constitué de résidus principalement aromatiques du tonneau β et du bouchon. Les résidus faisant partie du bouchon reconnaissant le chromophore sont communs à toutes les pyoverdines, alors que les résidus issus du tonneau β déterminent la spécificité pour une pyoverdine (Cobessi *et al*, 2005). En effet, les récepteurs de pyoverdines sont hautement spécifiques pour une seule pyoverdine et ne sont pas, ou peu, capables de reconnaître des pyoverdines exogènes structurellement différentes (Hohnadel & Meyer, 1988 ; Schalk, 2008). L'assimilation d'une pyoverdine hétérologue *via* un même récepteur s'explique par la présence d'une structure conservée dans la chaîne peptidique avec la pyoverdine endogène (Meyer *et al*, 2002). Enfin, notons que l'apo-pyoverdine, tout comme la ferri-pyoverdine sont capables de se fixer sur le récepteur, mais seule la ferri-pyoverdine peut être importée dans le périplasme (Schalk *et al*, 2001).

L'import de la ferri-pyoverdine semble se réaliser *via* un mécanisme à « deux portes » (figure I.16). La première porte est une boucle extracellulaire qui se referme sur

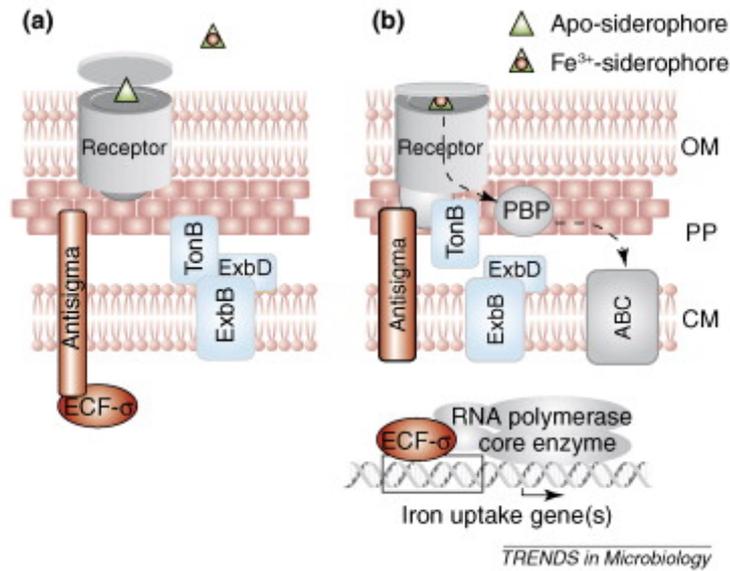


Figure I.16 : Transport des ferri-sidérophores dans les bactéries Gram-négatives (d'après Visca *et al*, 2007)

Les sidérophores chélatés au Fe^{3+} sont spécifiquement reconnus par des récepteurs de la membrane externe (*Outer Membrane*, OM) des bactéries Gram négatives, auxquels ils se lient avec de fortes affinités pour être ensuite importés dans la cellule. **(a)** En absence de ferri-sidérophores, certains de ces récepteurs sont liés à des apo-sidérophores. **(b)** Le remplacement de l'apo-sidérophore par le ferri-sidérophore initie son transport à travers la membrane externe. Le transport du ferri-sidérophore est couplé à la dissipation d'un gradient de protons de la membrane cytoplasmique (*Cytoplasmic Membrane*, CM) assuré par les protéines ExbB et ExbD. Le transfert d'énergie est réalisé *via* la protéine périplasmique (*Periplasm*, PP) TonB. TonB se déplace de la membrane cytoplasmique vers la membrane externe et s'associe au récepteur liant le ferri-sidérophore afin de lui transférer l'énergie accumulée. Une fois le transfert d'énergie réalisé, il retourne s'associer avec ses protéines partenaires ExbB et ExbD. La fixation du ferri-sidérophore induit une modification de conformation du récepteur : la boucle extracellulaire se referme, occultant l'entrée du tonneau, alors que le bouchon localisé au niveau du périplasm subit une modification de conformation autorisant son interaction avec TonB et le transport du ferri-sidérophore. Une fois dans le périplasm, le fer de la ferri-pyoverdine est réduit et s'associe avec des *periplasmic binding proteins* (PBP : FvpC FvpF) qui délivrent le substrat à un ABC transporteur permettant son transport dans le cytoplasme de la bactérie.

La protéine transmembranaire *Antisigma* est couplée dans le cytoplasme à des facteurs de transcription sigma σ . La modification de conformation du récepteur facilite son interaction avec *Antisigma*. In fine, ce mécanisme conduit à la libération des facteurs sigma σ qui agissent positivement sur l'expression des gènes de la synthèse du sidérophore et des gènes codant pour les récepteurs associés.

I. Introduction

le site de fixation lorsque la ferri-pyoverdine est en place. La seconde est matérialisée par le bouchon N-terminal : celui-ci ferme le canal formé par le tonneau β et empêche l'accès au périplasma en absence de ferri-pyoverdine (Ferguson *et al*, 2002 ; Schalk, 2008). L'ouverture du canal nécessite un apport d'énergie impliquant la protéine périplasmique TonB et les protéines ExbB et ExbD (Schalk, 2008). Une fois dans le périplasma, le complexe ferri-pyoverdine se dissocie afin de permettre l'import du fer dans la bactérie (Poole & McKay, 2003). Le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} , diminuant l'affinité entre le fer et la pyoverdine (Yeterian *et al*, 2010b). Le Fe^{2+} ainsi libéré s'associe par affinité à deux protéines PBP (*periplasmic binding proteins*), FpvC et FpF (Brillet *et al*, 2012). L'ABC transporteur FvpD₂E₂ est impliqué dans l'import du fer vers le cytoplasme (Brillet *et al*, 2012). Cependant, les mécanismes permettant la dissociation n'ont pas encore été élucidés (Schalk & Guillon, 2013a). Quant à l'apo-pyoverdine, après avoir libéré le fer dans le périplasma, elle peut être excrétée de nouveau dans le milieu extracellulaire (Schalk & Guillon, 2013a). Signalons que la dissociation du fer dans le périplasma n'a été décrite que pour les pyoverdines. Pour les autres sidérophores, les ABC transporteurs de la membrane cytoplasmique transportent directement le complexe ferri-sidérophore et l'étape de dissociation du complexe a lieu dans le cytoplasme par réduction puis recyclage du sidérophore ou par hydrolyse du sidérophore et réduction du fer (Schalk & Guillon, 2013a).

3.5. La régulation

Chez *Pseudomonas* et de nombreuses autres bactéries, il existe un régulateur majoritaire de l'homéostasie du fer, la protéine Fur. La présence de fer en excès induit la dimérisation de Fur qui, en utilisant le Fe^{2+} comme co-répresseur, conduit à la répression de l'expression de ses gènes cibles *via* la fixation du complexe au niveau des promoteurs. A l'inverse, en absence de fer, la protéine Fur ne peut plus former de dimères et perd sa capacité à fixer l'ADN et donc à réprimer l'expression de ses gènes cibles (Escolar *et al*, 1999 ; Cornelis, 2010). Parmi les cibles de Fur répondant directement à la carence en fer, plusieurs facteurs de transcription ECF-sigma (*extra-cytoplasmic sigma factor*) sont présents, notamment les facteurs ECF- σ PvdS et FpvI qui régulent positivement l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la pyoverdine et de son récepteur (Cornelis, 2010). Certains sidérophores disposent d'un système d'autorégulation permettant une expression optimale du sidérophore et de son récepteur associé lorsque

I. Introduction

l'import de fer est efficace. Ce mécanisme implique la protéine antisigma et les facteurs de transcription ECF- σ PvdS et FpvI (figure **I.16**, Visca *et al*, 2007). Ainsi, chez *P. aeruginosa*, la protéine antisigma interagissant avec le récepteur du sidérophore va être capable de détecter la modification de conformation induite par la fixation de ferri-pyoverdine. Antisigma va alors libérer les facteurs ECF- σ PvdS et FpvI qui vont par la suite permettre l'induction de l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans la synthèse de la pyoverdine et dans son import (Visca *et al*, 2007 ; Cornelis, 2010).

4. L'implication du fer et des sidérophores dans les défenses immunitaires

Chez les mammifères, le contrôle de l'homéostasie du fer au cours des interactions avec des pathogènes est décisif (Nairz *et al*, 2014). Chez les animaux, la diminution de la biodisponibilité du fer *via* la production au niveau du site d'infection de chélateurs de fer tels que la lactoferrine, ou de protéines se liant aux complexes fer-sidérophores empêchant l'assimilation de ces derniers par les pathogènes, sont des mécanismes connus. Les infections bactériennes conduisent également à la production d'hepcidine, une hormone hépatique qui promeut la dégradation des ferroportines impliquées dans le transport du fer alimentaire de la lumière de l'intestin aux vaisseaux sanguins. Ce processus diminue la sidéremie (Nairz *et al*, 2014). De plus, dans le cas d'infection par des bactéries intracellulaires, l'expression des ferroportines est induite, conduisant à une diminution de la teneur en fer intracellulaire. Ces différents mécanismes, désignés plus généralement « anémie infectieuse », créent un appauvrissement du fer disponible pour le pathogène limitant ainsi son développement et son pouvoir infectieux (Chu *et al*, 2010 ; Nairz *et al*, 2014). D'autres travaux illustrent le lien fonctionnel entre homéostasie du fer et immunité. Par exemple, l'application du sidérophore desferrioxamine (aussi appelé déféroxamine ou DFO) produit par des bactéries du genre *Actinomycètes* sur des cellules épithéliales intestinales conduit à la production d'interleukine 8 (IL-8), une cytokine impliquée dans l'immunité innée et de manière plus générale induisant l'augmentation de l'expression des gènes associés aux phénomènes pro-inflammatoires (Choi *et al*, 2004, 2007).

Chez les plantes, l'importance de l'homéostasie du fer dans les défenses a été soulignée dans plusieurs études. Dans ce sous-chapitre, nous présenterons le concept d'immunité des plantes puis décrirons l'importance de l'homéostasie du fer dans ce contexte.

4.1. Le concept d'immunité des plantes

Les plantes sont protégées contre l'essentiel des microorganismes par des barrières physiques constituées en particulier de la cuticule et de la paroi cellulaire. De plus, certaines plantes produisent constitutivement des molécules toxiques vis-à-vis de pathogènes potentiels. Lorsqu'un microorganisme arrive à s'affranchir de ces barrières

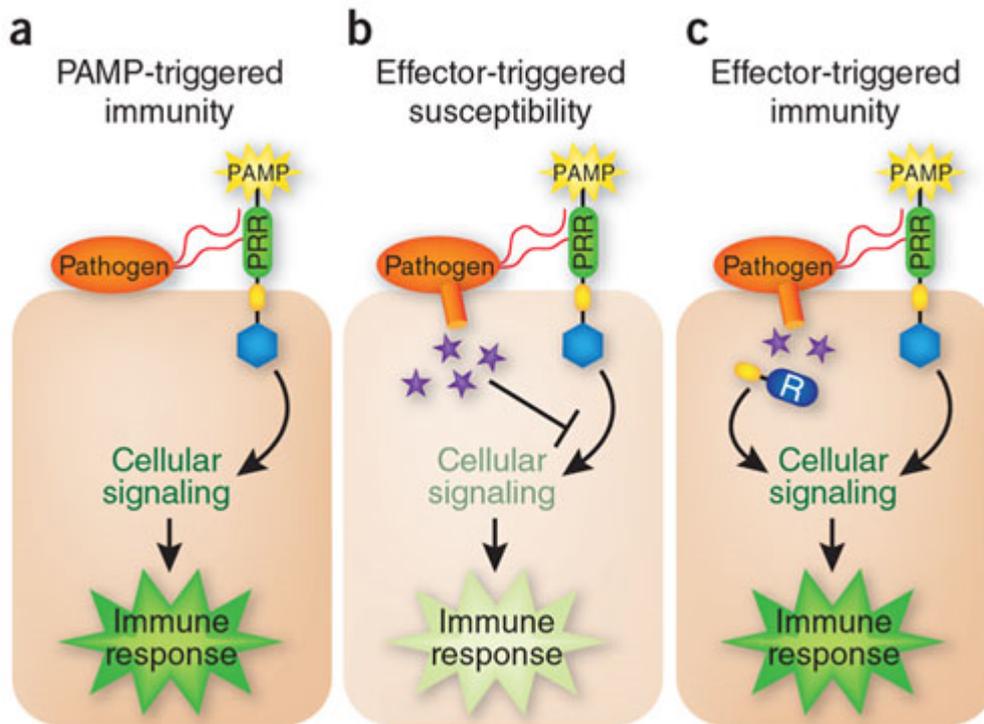


Figure I. 17 : Principes de l'immunité chez les plantes (d'après Pieterse *et al*, 2009)

a. Lors de l'attaque par un pathogène, des motifs moléculaires fortement conservés des microorganismes appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) sont détectés par la plante *via* des récepteurs membranaires (LRK-PRR). La fixation d'un PAMP active l'activité kinase cytosolique du récepteur (bleu clair), initiant ainsi une cascade de signalisation cellulaire aboutissant à la mise en place de la réponse immunitaire de type PTI (*PAMP-triggered immunity*).

b. Les pathogènes virulents produisent des effecteurs (étoiles violettes) qui sont injectés directement dans le cytoplasme de la cellule hôte et bloquent la PTI. On parle alors d'ETS (*effector triggered susceptibility*).

c. Les effecteurs sont reconnus à leur tour (directement ou indirectement, voir figure I.18) par des protéines de résistance (R, en bleu). Cette reconnaissance déclenche une cascade de signalisation cellulaire qui active les défenses de la plante (ETI : *effector triggered immunity*). L'ETI s'accompagne généralement d'une réponse hypersensible.

I. Introduction

via par exemple la production d'enzymes hydrolytiques ou via sa pénétration par des blessures ou des pores naturels tels que les stomates, la plante va s'opposer à l'infection en déclenchant des réponses de défense inductibles. Ces réponses de défense ont été le sujet de très nombreux travaux dont les résultats ont conduit au concept d'immunité des plantes. Ce concept est décrit ci-dessous.

4.1.1. La PAMP triggered immunity (PTI)

Le processus de PTI constitue un premier niveau de défense inductible (figure I.17.A)(Jones & Dangl, 2006 ; Spoel & Dong, 2012). Dans ce mécanisme, l'attaque par l'agent pathogène est détectée via la reconnaissance par les cellules végétales de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns* ou MAMP, *microbe-associated molecular patterns*). Les PAMP ou MAMP sont des molécules communes à une famille de microbes telles que des constituants structuraux ou la flagelline des flagelles des bactéries, et ne sont pas ou peu conservées chez les eucaryotes. La reconnaissance des MAMP/PAMP par les cellules végétales est assurée par des récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*). Les PRR sont des récepteurs exprimés à la membrane plasmique des cellules végétales et appartiennent à la famille des *receptor-like kinases* (RLK) ou *receptor-like proteins* (LRP) (Boller & Felix, 2009). Le premier PRR identifié, XA21 chez le riz, reconnaît un peptide sulfaté présent chez l'essentiel des *Xanthomonas* (Lee *et al*, 2009b). Le génome d'*A. thaliana* contient un grand nombre de gènes codant des RLK potentiels (≈ 615) dont FLS2 (*flagellin sensitive 2*), largement étudié, qui reconnaît un peptide conservé de 22 acides aminés de la partie N-terminale de la flagelline (flg22) de *Pseudomonas* (Gómez-Gómez & Boller, 2000). FLS2 est composé d'un domaine extracellulaire *leucine-rich repeat* (LRR) impliqué dans la fixation du ligand, d'un domaine trans-membranaire et d'un domaine cytoplasmique à activité sérine/thréonine kinase. La fixation de flg22 sur le récepteur conduit à l'activation du récepteur qui va ensuite interagir avec *BRI1-associated receptor kinase 1* (BAK1) pour initier la PTI. Les voies de signalisation cellulaire ainsi déclenchées sont complexes et impliquent de nombreux acteurs moléculaires et des processus de modifications post-traductionnelles. A titre d'exemple, nous pouvons citer une modification rapide de la perméabilité membranaire (flux de H^+ , Ca^{2+} , K^+) mobilisant des transporteurs et des canaux cationiques/anioniques, un burst oxydatif, une production de NO et l'activation de *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) conduisant à des événements de

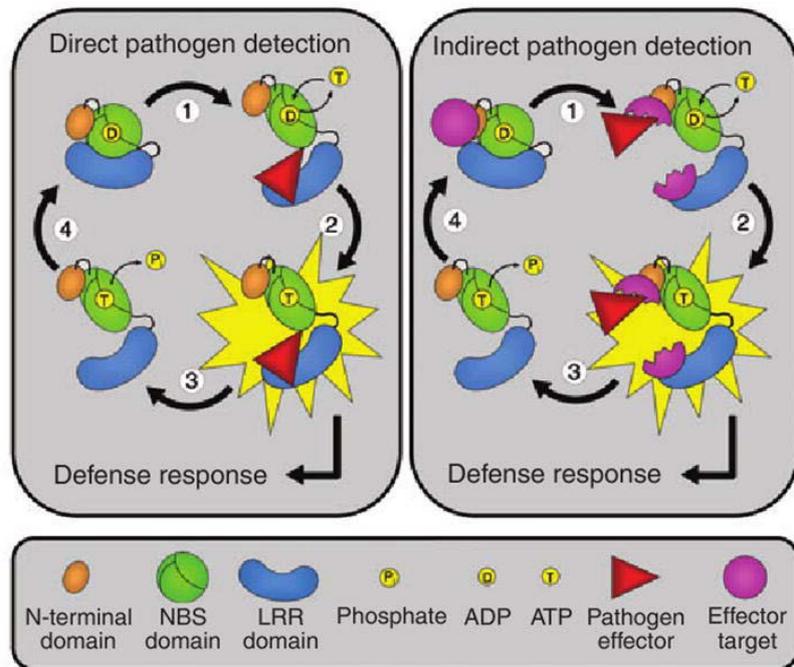


Figure I.18 : Modèle de détection directe et indirecte des effecteurs par les protéines NBS-LRR (d'après De Young & Innes, 2006)

Les protéines NBS-LRR sont activées et conduisent à la mise en place des réactions de défense (ETI) en présence d'un effecteur. On parle de détection directe (schéma de gauche) si l'effecteur pathogène est reconnu directement par les NBS-LRR. On parle de détection indirecte si la protéine NBS-LRR agit comme un gardien et reconnaît une protéine « à surveiller » (*effector target*). Dans ce cas, l'activation est induite si cette dernière est ciblée et modifiée par un effecteur (schéma de droite).

- 1- La présence de l'effecteur conduit à une modification de la structure du NBS-LRR, ce qui permet un échange de nucléotide ADP \Rightarrow ATP.
- 2- La fixation de l'ATP permet la transduction du signal *via* la création de sites de fixation permettant l'interaction avec des protéines de signalisation.
- 3- La dissociation de l'effecteur ou de la protéine cible et 4- l'hydrolyse de l'ATP permettent le retour de la protéine NBS-LRR à un état inactif.

I. Introduction

phosphorylation (Garcia-Brugger *et al*, 2006 ; Zipfel, 2009 ; Spoel & Dong, 2012 ; Jeandroz *et al*, 2013). Ces cascades signalétiques concourent à une reprogrammation rapide de l'expression génique. Les très nombreux gènes dont l'expression est ainsi modulée incluent des gènes codant des protéines à activité antimicrobienne (exemple des protéines PR pour *pathogenesis-related*) ou associées à la synthèse de métabolites possédant une telle activité (exemple des phytoalexines), des gènes codant des protéines du métabolisme primaire et secondaire, des protéines impliquées dans le renforcement pariétal et le stress oxydatif ou encore des protéines de signalisation cellulaire. L'ensemble de ces événements vont contribuer à stopper le développement du microorganisme et l'interaction entre la plante et le microorganisme est dite incompatible (Boller & Felix, 2009).

4.1.2. L'effector triggered immunity (ETI)

Des microorganismes pathogènes sont capables de contrecarrer la mise en place de la PTI. En effet, lors de l'infection, des pathogènes produisent et injectent des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ceux-ci sont à l'origine de mécanismes permettant de neutraliser ou de contourner la PTI et, en conséquence, favorisent le développement du microorganisme aux dépens de la plante. On parle d'interaction compatible (figure **I.17.B**). Généralement, les bactéries pathogènes injectent de 15 à 30 effecteurs dans les cellules hôtes *via* le système de sécrétion de type III (T3SS ; § 1.3 de l'introduction)(Jones & Dangl, 2006). Illustrant ces données, chez le pois, Jakobek *et al.* (1993) ont démontré que l'infection induite par une souche de *P. syringae* mutée dans son T3SS, et donc incapable d'injecter ses effecteurs, aboutit à une réponse transcriptionnelle des cellules hôtes plus rapide et plus intense limitant le développement de la bactérie (Jakobek *et al*, 1993 ; Jones & Dangl, 2006). Les effecteurs ont des fonctions variées. Par exemple, ils possèdent des activités protéase, phosphatase ou encore ubiquitine ligase leur permettant de bloquer l'activation des MAPK, la mise en place de la réponse hypersensible (HR : *hypersensitive response*) ou encore de déréguler les voies de signalisation induites par les phytohormones (Mudgett, 2005).

Au cours de leur co-évolution avec les agents pathogènes, les plantes ont exprimé à leur tour des protéines de résistance (protéines R) codées par des gènes de résistance (gènes R) capables de reconnaître directement ou indirectement ces effecteurs alors renommés facteurs d'avirulence. Le modèle de détection directe et indirecte des

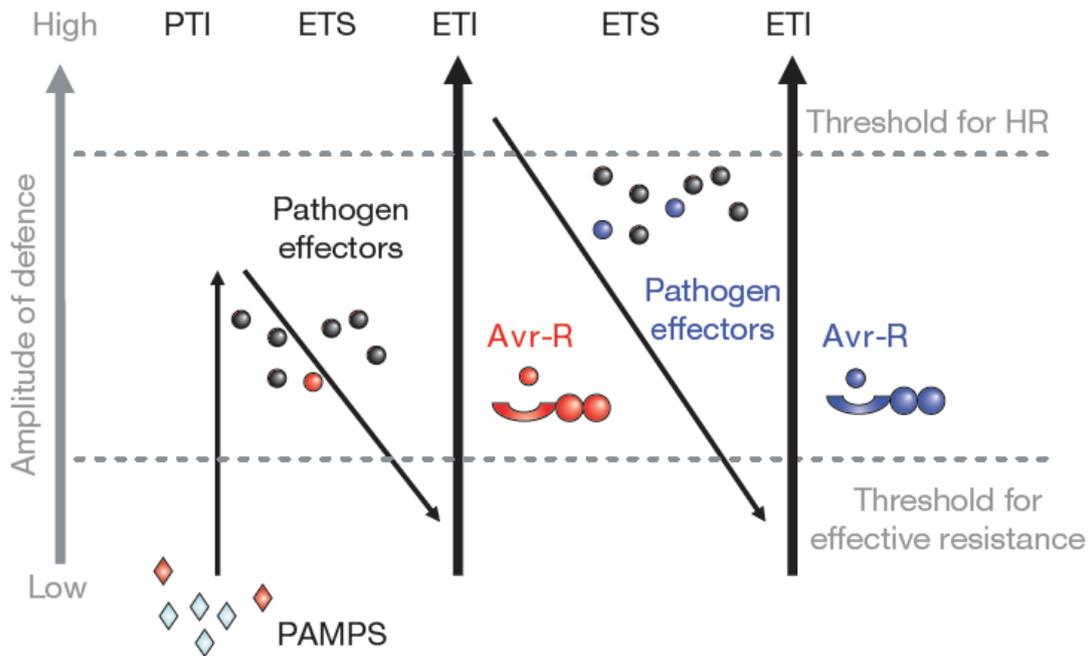


Figure I.19 : Modèle de l'immunité en zigzag (d'après Jones & Dangl, 2006)

Le principe d'immunité implique des dialogues moléculaires microorganismes/hôtes qui évoluent en faveur de l'un des deux protagonistes. La PTI n'est pas spécifique d'un couple plante hôte/microorganisme donné. Elle est déclenchée par la reconnaissance de motifs moléculaires associés à l'agent infectieux (PAMP), conduisant à la résistance. Afin de contrecarrer la PTI, les pathogènes développent/produisent des effecteurs qui inhibent/déroutent les voies signalétiques associées aux défenses et facilitent l'ETS. En retour, les cellules hôtes ont développé des systèmes de reconnaissance de l'effecteur (Avr) *via* les protéines de résistance (R), processus appelé ETI. Ce dernier est spécifique d'un couple plante hôte/microorganisme donné. L'ETI est très efficace à l'encontre du pathogène mais peut de nouveau être détournée par de nouveaux effecteurs. Ces derniers pourront à leur tour être reconnus par de nouvelles protéines R.

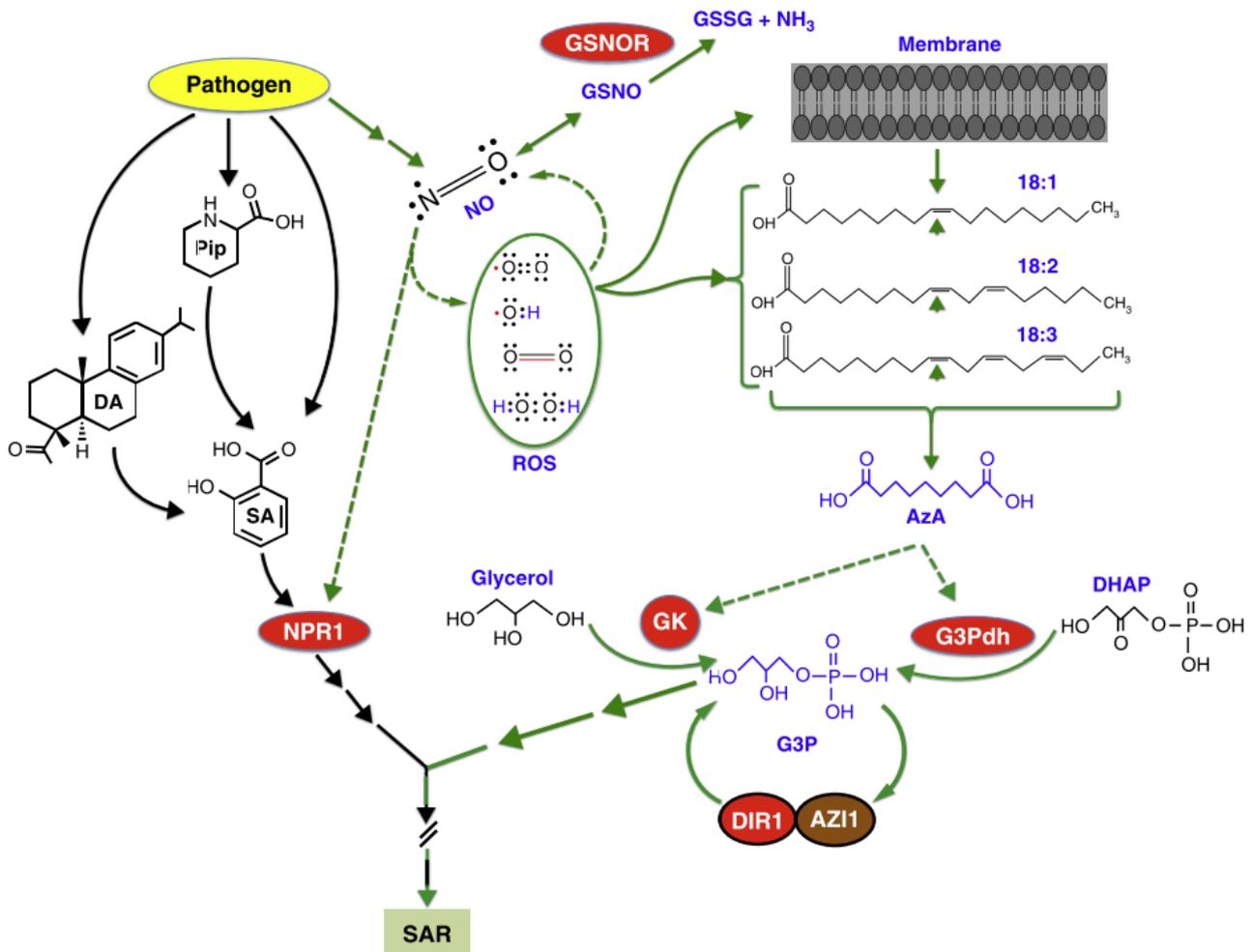
I. Introduction

effecteurs par les protéines NBS-LRR est présenté dans la figure **I.18** (DeYoung & Innes, 2006). Au niveau structural, la plupart des protéines R sont de type NBS-LRR (*nucleotide-binding site-leucine-rich repeat*). La neutralisation de l'activité des effecteurs initialise des voies de signalisation cellulaire chez les cellules hôtes favorisant de nouveau la mise en place des mécanismes de défense et à terme la résistance aux pathogènes. Ce mécanisme est appelé *effector-triggered immunity* (ETI ; figure **I.17.C**) (Spoel, & Dong, 2012). L'ETI est un processus plus intense et plus rapide que la PTI. En particulier, l'ETI se manifeste généralement par une HR caractérisée par des nécroses micro- ou macroscopiques au site de pénétration du pathogène. La HR présente des caractéristiques moléculaires et cytologiques de mort cellulaire programmée et permettrait de confiner l'agresseur à son site d'infection et d'éviter sa propagation (Jones & Dangl, 2006 ; Spoel & Dong, 2012). Enfin, contrairement à la PTI qui est activée par un large spectre de molécules fortement conservées à travers les différents groupes de microorganismes, l'ETI est induite suite à la reconnaissance spécifique entre un effecteur et une protéine R associée (Spoel & Dong, 2012).

Enfin, il est important de préciser qu'en réponse à l'ETI, la bactérie peut de nouveau s'adapter et produire de nouveaux effecteurs afin de contourner/neutraliser l'ETI. Ces adaptations évolutives de la plante et de la bactérie sont conceptualisées dans le modèle de l'immunité en zigzag (figure **I.19**) (Jones & Dangl, 2006). L'issue finale des interactions plantes-pathogènes va dépendre de la balance entre la capacité du pathogène à supprimer les défenses de la plante et la capacité de la plante à identifier et à répondre efficacement à l'attaque du pathogène (Pieterse *et al*, 2009).

4.1.3. La résistance systémique acquise

La résistance aux microorganismes pathogènes, en particulier nécrotrophes, ne se limite pas aux cellules/tissus infectés. En effet, l'activation de la PTI ou de l'ETI s'accompagne de la mise en place de mécanismes permettant une résistance s'exprimant dans l'ensemble de la plante. Cette résistance généralisée est appelée résistance systémique acquise (*systemic acquired resistance* : SAR) et peut durer plusieurs mois, voire être transmise à la génération suivante (Kachroo & Robin, 2013). La SAR est efficace non seulement contre l'agent infectieux initial mais également contre de nombreux autres, certains étant encore plus virulents.



Current Opinion in Plant Biology

Figure I.20 : Mécanismes associés à la résistance systémique acquise (SAR, d'après Wendehenne *et al*, 2014)

L'application d'un pathogène avirulent déclenche des événements cellulaires dans les tissus systémiques non infectés. Ce processus, nommé SAR, permet à la plante de résister efficacement à une nouvelle attaque par le même voire d'autres microorganismes, certains étant plus virulents. Au niveau local (site d'application du pathogène avirulent) comme systémique, les événements cellulaires associés à la SAR impliquent deux voies parallèles :

- une voie dépendante du SA et de NPR1,
- une voie dépendante d'une régulation croisée entre le NO et les ROS (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle). Ces interconnexions NO/ROS régulent la production d'acide azélaïque (AzA) formé par hydrolyse (flèche verte) des acides gras insaturés à 18 atomes de carbone (18:1, 18:2, 18:3). L'AzA promeut ensuite l'expression des gènes codant la glycérol kinase (GK) et la glycérol-3-phosphate deshydrogénase (G3Pdh) requises pour la synthèse de glycérol-3-phosphate (G3P). Une boucle de régulation s'opérant entre le G3P et les protéines DIR1 (*defective in induced resistance*) et AZI1 (*AzA insensitive*) assure la stabilité du G3P impliqué dans le développement de la SAR.

I. Introduction

De nombreuses équipes s'intéressent aux processus impliqués dans la SAR. En premier lieu, la mise en place de la SAR nécessite une cuticule intacte. En effet, des plantes déficientes dans la production de la cuticule ou dont la cuticule a été mécaniquement endommagée échouent dans la mise en place de la SAR (Xia *et al*, 2009). Deuxièmement, il est établi que lors de la PTI ou de l'ETI, un ou plusieurs signaux mobiles sont produits au site d'infection. Ce (ou ces) signau(x) circulant dans le phloème déclenche des événements de signalisation dans les tissus systémiques non infectés et place ceux-ci dans un état de veille défensive. Ces signaux, qui n'ont pas encore été identifiés avec certitude, doivent remplir plusieurs caractéristiques, (i) s'accumuler rapidement en réponse à un pathogène, (ii) être transportés du site d'infection jusqu'aux autres tissus de la plante et (iii) induire rapidement des processus conduisant à la résistance aux pathogènes. Parmi les molécules candidates, le salicylate de méthyle (MeSA) semble particulièrement intéressant. L'étude de Park *et al* (2007) a démontré que chez le tabac, dans les tissus infectés, l'induction de l'expression de la SA méthyltransférase qui convertit le SA en MeSA est nécessaire à la mise en place de la SAR. Au niveau des tissus systémiques, c'est ensuite la MeSA estérase, qui convertit le MeSA en SA, qui s'avère essentielle au développement de la SAR. De plus, cette même étude indique que le MeSA s'accumule dans le phloème et le traitement par le MeSA exogène induit la mise en place de la SAR. Alors que chez le tabac le MeSA semble être l'un des signaux mobiles majeurs impliqués dans la mise en place de la SAR, le mutant d'*A. thaliana bsmt1* invalidé dans l'expression de la SA méthyltransférase développe une SAR après l'inoculation par *P. syringae* malgré l'absence d'accumulation de MeSA (Attaran *et al*, 2009). Il semble donc que la nature du signal mobile pourrait différer suivant l'espèce végétale. D'autres acteurs de la SAR ont été identifiés. Le mutant d'*A. thaliana dir1-1* (*defective in induced resistance 1*), invalidé dans l'expression d'un gène codant une protéine de transfert de lipides, n'est plus capable d'induire la SAR suite à l'attaque d'un pathogène mais peut toujours induire l'ETI. De plus, le traitement de plantes *dir1* par l'exsudat vasculaire d'une plante sauvage infectée induit la mise en place de la SAR. La protéine DIR1 est donc potentiellement impliquée dans la production du signal mobile permettant l'induction de la SAR (Maldonado *et al*, 2002). Le JA est accumulé au cours de la SAR et semble également jouer un rôle dans la signalisation de la SAR (Truman *et al*, 2007). Ici encore, des constats contradictoires existent (Chaturvedi *et al*, 2008 ; Attaran *et al*, 2009), laissant supposer une variabilité du signal en fonction du couple plante/pathogène étudié. Enfin le glycérol-3-phosphate (G3P),

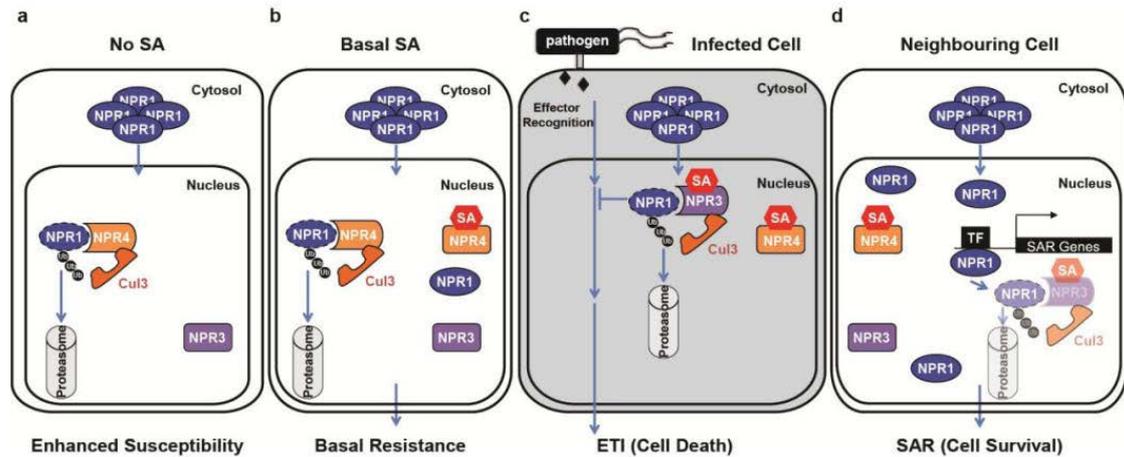


Figure I.21 : Régulation de NPR1 *via* les protéines NPR3 et NPR4 (d'après Fu *et al*, 2012)

a. Dans des mutants invalidés dans la production de SA, la protéine NPR1 ne peut pas s'accumuler sous forme monomérique dans le noyau, elle est dégradée *via* son adressage au protéasome par le complexe CUL3-NPR4. La sensibilité de la plante est accrue.

b. Dans des plantes sauvages, à son taux basal, le SA se fixe sur NPR4 et réduit son activité. Des monomères de NPR1 peuvent s'accumuler dans le noyau et promouvoir une résistance basale.

c et d. En réponse à un pathogène, le SA est accumulé au site d'infection et dans les tissus systémiques (nommés *neighbouring cell* dans le schéma). La forte accumulation de SA au site d'infection (c) permet l'activation du complexe CUL3-NPR3, ce qui induit la dégradation de NPR1 monomérique et permet la mise en place de l'ETI et la réponse hypersensible (HR). En effet, les mutant *npr3* et *npr4* qui accumulent NPR1 ne sont plus capables d'induire la HR en réponse au pathogène. Ce résultat laisse sous-entendre un effet négatif de NPR1 sur la HR. Au niveau systémique, le SA s'accumule en moindre quantité comparativement aux cellules infectées. L'activité des protéines CUL3-NPR3 est amoindrie, NPR1 s'accumule sous forme monomérique dans le noyau et contribue à la SAR *via* l'induction de l'expression de gènes associés à ce processus.

I. Introduction

l'abiétane diterpénoïde (*dehydroabietinal*, DA), l'acide azélaïque (AzA) et la lipide-transférase AZI1 induite par l'AzA semblent être associés à la mise en place de la SAR (Spoel & Dong, 2012 ; Fu & Dong, 2013 ; Kachroo & Robin, 2013). Une étude récente a également mis en lumière un rôle clé du NO et des ROS dans la SAR (Wang *et al*, 2014a ; Wendehenne *et al*, 2014). L'ensemble de ces résultats illustre la complexité de ce phénomène (Figure I.20).

Outre le MeSA, le rôle clé joué par le SA dans la SAR est unanimement admis. Des approches génétiques ont permis d'identifier des acteurs protéiques des effets du SA et ont notamment conduit à l'identification de NPR1 (*nonexpressor of PR gene 1*) (Cao *et al*, 1997 ; Dong, 2001). Lorsque NPR1 est inactive, elle forme des oligomères cytosoliques, les monomères étant associés par des ponts disulfures. Lors de la SAR ou en réponse au SA, les monomères se dissocient et sont transloqués au noyau (Mou *et al*, 2003). A ce niveau, ils interagissent ensuite avec des facteurs de transcription de la famille TGA, facilitant l'expression de gènes de défense dont *PR-1*. Plusieurs travaux se sont intéressés aux mécanismes d'association/dissociation des monomères de NPR-1. Chez *A. thaliana*, le rôle du NO dans la formation des oligomères et d'une thiorédoxine dans leur dissociation a été rapporté (Tada *et al*, 2008). Plus récemment, Wu *et al.* (2012) ont démontré que NPR1 est un récepteur du SA. La fixation du SA sur les oligomères de NPR1 permettrait sa dissociation en dimères. De plus, il a été proposé que la fixation du SA sur NPR1 conduirait à une modification conformationnelle supprimant l'interaction entre le domaine transactivateur et le domaine auto-inhibiteur BRB/POZ, permettant ainsi l'activation de l'expression du gène *PR-1*. Deux analogues de NPR1, NPR3 et NPR4 ont également été identifiés comme des récepteurs au SA mais ayant des affinités différentes pour celui-ci. NPR3 et NPR4 sont des adaptateurs de la protéine CULLIN 3, une ubiquitine ligase E3 impliquée dans la dégradation de NPR1 *via* le protéasome (Fu *et al*, 2012). Les auteurs ont développé un modèle selon lequel les variations du taux de SA dans la cellule permettent, *via* NPR3 et NPR4, de réguler l'activité et la stabilité de NPR1 (figure I.21). En plus de l'induction de l'expression des gènes de défense, NPR1 participe à la régulation positive de l'expression des MAPK MPK3 et MPK6. Dans les tissus systémiques, MPK3 et MPK6 restent sous forme inactive dans le cytoplasme jusqu'à une nouvelle attaque par un pathogène, permettant ainsi une réponse plus forte et plus rapide (Beckers *et al*, 2009) : on parle de « *priming* » ou d'état de veille défensive. Outre NPR1, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et dans les phénomènes de recombinaison homologue

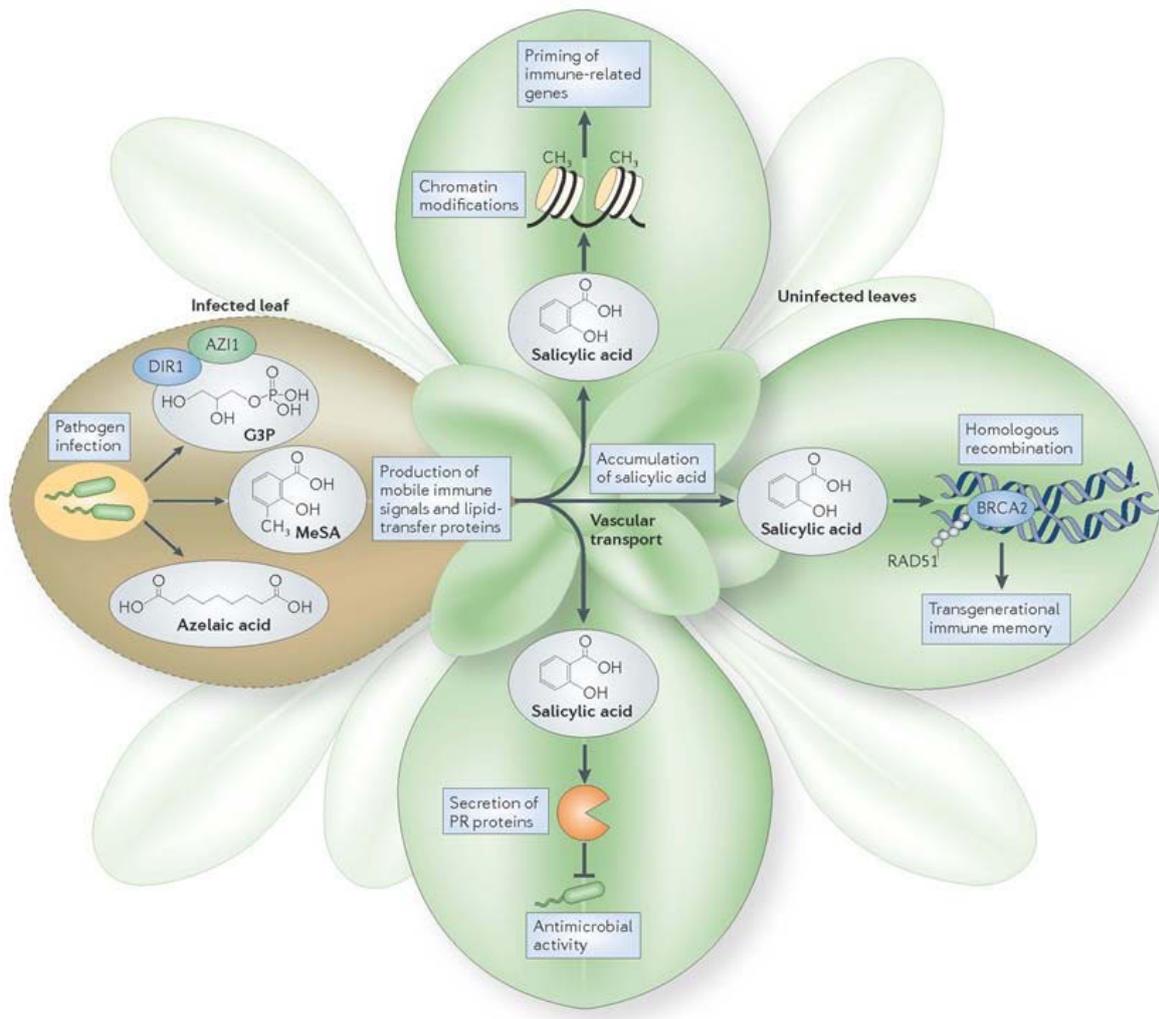


Figure I.22 : Mécanismes mis en place suite à l'infection par un pathogène permettant l'induction de la SAR (d'après Spoel & Dong, 2012)

L'infection par un pathogène induit localement la production de plusieurs molécules signalétiques dont le MeSA (*methylsalicylic acid*), le glycérol-3-phosphate et de l'acide azélaïque, ainsi que l'accumulation de protéines spécifiques (DIR1 et AZI1). Ces signaux mobiles vont circuler au sein de la plante entière et induisent une accumulation d'acide salicylique dans les tissus non infectés, concourant ainsi à la mise en place de la SAR. Les événements cellulaires associés à la SAR impliquent notamment la production de protéines de défense (exemple des protéines PR), des processus d'épigénétisme (remodelage de la chromatine) associés au mécanisme de potentialisation observé lors de la SAR. Enfin, les plantes disposent de séquences non-codantes dans leur génome permettant d'effectuer des recombinaisons homologues. Ces événements ont une occurrence plus importante en réponse à un pathogène et peuvent conduire à une amélioration de la résistance qui pourra être transmise à la génération suivante. L'action des protéines RAD51 et BRCA2 est impliquée dans ces événements de recombinaison homologue.

I. Introduction

(exemple de RAD51 et BRCA2) sont activées par le SA (Wang *et al*, 2010 ; Song *et al*, 2011). Des modifications épigénétiques (modification de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones) sont induites au cours de la SAR et permettent à ce processus de perdurer dans le temps. Ces modifications ciblent en particulier les zones promotrices de gènes impliqués dans la résistance (Jaskiewicz *et al*, 2011). Ces deux derniers mécanismes sont supposés être impliqués dans la transmission de l'état de *priming* de la SAR aux générations suivantes (Spoel & Dong, 2012). La figure **I.22** résume et illustre les événements présentés ci-dessus.

4.1.4. La résistance systémique induite

La résistance systémique induite (*induced systemic resistance* : ISR) est un autre processus de résistance induite qui implique cette fois des microorganismes bénéfiques.

Tout comme la SAR, l'ISR se définit comme un état de résistance permettant de protéger la plante entière face à une future attaque par des microorganismes pathogènes ou des herbivores (Pieterse *et al*, 2014). Les premières études décrivant l'ISR datent de 1991 et indiquent que des bactéries PGPR peuvent induire une réponse plus efficace du système immunitaire de la plante chez le pois, l'œillet et le concombre contre différents microorganismes pathogènes (Alström, 1991 ; van Peer, 1991 ; Wei *et al*, 1991). Des éléments différencient la SAR de l'ISR, (i) l'ISR se développe sans l'accumulation de protéines PR et (ii) l'induction de l'ISR est indépendante de la signalisation par le SA (Pieterse *et al*, 2014). À l'aide de mutants invalidés dans la réponse à l'Et ou au JA, Pieterse *et al* (1998) ont démontré l'implication de ces deux hormones dans la mise en place de l'ISR chez *A. thaliana* en réponse à la PGRP *P. fluorescens* WCS417r. Ce constat a également été réalisé pour de nombreuses autres PGPR, ainsi que chez d'autres espèces végétales (Pieterse *et al*, 2014). En plus de son implication dans la SAR, NPR1 est également nécessaire à la mise en place de l'ISR. La fonction de NPR1 dans l'ISR n'est pas connue aujourd'hui, mais à l'inverse de la SAR où NPR1 est active dans le noyau, il semble que l'activité de NPR1 au cours de l'ISR en réponse à l'Et et au JA soit cytosolique (Spoel *et al*, 2003). La figure **I.23** présente l'implication des différentes phytohormones dans la mise en place des défenses (Pieterse *et al*, 1998 ; Beneduzi *et al*, 2012).

Lors de la colonisation des racines par des PGPR induisant l'ISR, peu d'effets physiologiques ont pu être observés. En effet, ni la production des hormones JA et Et, ni

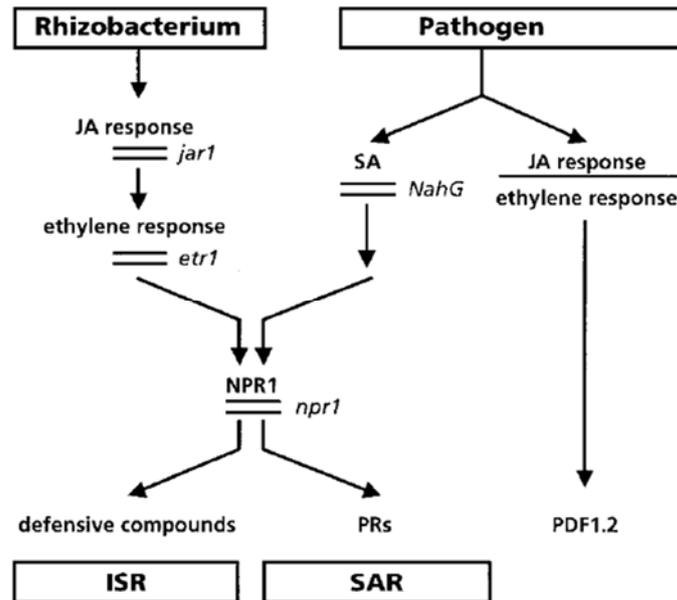


Figure I.23 : Comparaison des processus de signalisation déclenchés en réponse à un pathogène induisant une SAR ou en réponse à une bactérie PGPR permettant l'induction de l'ISR chez *A. thaliana* (d'après Pieterse *et al*, 1998 ; Beneduzi *et al*, 2012)

L'interaction entre *A. thaliana* et *P. fluorescens* WCS417r induit une cascade de signalisation dépendante du JA, de l'Et et de NPR1. Lors de l'attaque par un pathogène et suivant sa nature (nécrotrophe ou biotrophe), *A. thaliana* met en place une réponse dépendante des hormones JA/Et ou du SA. La voie dépendante du SA implique NPR1 et conduit à la production de protéines PR ; la voie JA conduit à la synthèse de la défensine PDF1.2.

I. Introduction

l'expression de protéines PR n'augmentent dans les tissus systémiques (Pieterse *et al*, 1996, 2014). Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle l'ISR repose majoritairement sur un *priming* et une augmentation de la sensibilité aux hormones et différents signaux, plutôt qu'à l'expression directe des gènes de résistance (van Wees *et al*, 1999). Ainsi, cet état de veille défensive est souvent non mesurable et ces effets ne sont observables que lorsque la plante est en contact avec un pathogène. En plus de la potentialisation des gènes de résistance, l'ISR agit sur les barrières physiques. Par exemple, *P. fluorescens* WCS417r augmente les dépôts de callose *via* une signalisation dépendante de l'ABA chez *A. thaliana* en réponse au pathogène *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Van der Ent *et al*, 2009). L'ISR induite par *Bacillus subtilis* FB17 déclenche chez *A. thaliana* une fermeture accélérée des stomates en réponse au pathogène *P. syringae*, ce qui ralentit la progression de l'infection (Kumar *et al*, 2012). Le *priming* visible au moment de la réponse à un pathogène *via* une expression rapide et élevée de nombreux gènes impliqués dans l'immunité laisse supposer que les plantes développant une ISR ont accumulé des facteurs de transcription qui resteraient inactifs jusqu'à l'attaque par un pathogène (Pieterse *et al*, 2014). En effet, l'accumulation des transcrits des facteurs de transcription est observée au cours de la mise en place de l'ISR chez *A. thaliana* (Van der Ent *et al*, 2009). On peut noter que, parmi ces facteurs de transcription, ceux de la famille AP2/ERF impliqués dans l'induction des défenses en réponse au JA et à l'Et sont particulièrement représentés. En effet, les gènes dont l'expression est inductible par le JA et l'Et sont fortement exprimés chez les plantes ayant induit l'ISR suite à l'attaque d'un pathogène (Verhagen *et al*, 2004). Un autre facteur de transcription, MYB72, est induit significativement dans les racines lors de la colonisation d'*A. thaliana* par *P. fluorescens* WCS417r (Verhagen *et al*, 2004). Les plantes d'*A. thaliana* déficientes dans l'expression de MYB72 ne sont plus capables d'induire l'ISR en réponse à plusieurs pathogènes. En revanche, le traitement de ces plantes par un précurseur de l'Et permet de retrouver un niveau de résistance similaire aux plantes sauvages (Van der Ent *et al*, 2008). Ces résultats indiquent donc que MYB72 agit en amont de l'Et et est un élément clef permettant la mise en place de l'ISR contre un large spectre de pathogènes.

De nombreux microorganismes (bactéries, champignons) peuvent induire l'ISR, le genre *Pseudomonas* étant le plus largement étudié. Pour ce genre, de nombreux déterminants de l'ISR ont été identifiés dont le flagelle, également responsable de la mise en place de la PTI (§ 4.2.1 de l'introduction). En effet, le flagelle purifié de *P. putida*

I. Introduction

WCS358 induit l'ISR chez *A. thaliana* contre *P. syringae* pv *tomato* (Meziane *et al*, 2005). Le flagelle n'est toutefois pas le seul déterminant de cette souche car une souche immobile parvient à induire l'ISR au même niveau que la souche sauvage et aucune induction d'ISR n'est observée chez le pois ou la tomate suite au traitement par le flagelle purifié de *P. putida* WCS358. Meziane *et al* (2005) ont également démontré que les LPS purifiés, tout comme le mutant de *P. putida* WCS358 dépourvus d'antigène-O, sont capables d'induire l'ISR. A l'inverse, chez le radis, l'ISR contre *Fusarium oxysporum* est induite par les LPS de *P. fluorescens* WCS374r et WCS417r mais pas par les souches mutées pour l'antigène-O (Leeman, 1995). D'autres éléments produits par les microorganismes sont capables d'induire l'ISR, comme les antibiotiques. Le rôle de ces molécules est bien connu dans le phénomène de biocontrôle (§1.3 de l'introduction). C'est pas exemple le cas du DAPG, un antibiotique produit par *P. fluorescens* CHA0 (Iavicoli *et al*, 2003). Des souches ne produisant plus de DAPG sont en effet incapables d'induire une ISR (Siddiqui & Shahid Shaukat, 2003). Ces différentes études indiquent donc qu'il existe plusieurs déterminants pouvant induire l'ISR, ces derniers peuvent être redondants ou non, et leur efficacité est dépendante du couple bactérie bénéfique/plante hôte.

4.2. L'implication des sidérophores dans l'immunité des plantes

4.2.1. Les sidérophores, des facteurs de virulence

Chez les plantes, plusieurs études ont démontré l'importance des sidérophores d'origine microbienne lors des processus infectieux. Ces travaux ont en particulier concerné l'achromobactine et la chrysobactine, deux sidérophores produits par la bactérie *Dickeya dadantii* 3937 (anciennement nommée *Erwinia chrysanthemi*). L'infection de plantes d'*A. thaliana* par *D. dadantii* ou un traitement par la chrysobactine conduisent à une induction de l'expression du gène *AtFER1*. Témoinant de l'importance d'*AtFER1* dans la réponse de la plante à l'infection, le mutant d'*A. thaliana* invalidé dans son expression présente une sensibilité accrue à l'infection (Dellagi *et al*, 2005). Outre *AtFER1*, l'expression des gènes codant les transporteurs de métaux vacuolaires *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* est également induite en réponse à l'infection (Dellagi *et al*, 2005 ; Segond *et al*, 2009). Ces résultats témoignent d'un mécanisme de remobilisation du fer lors de l'infection et illustrent la mise en place d'une compétition pour le fer entre l'hôte et le pathogène. De plus, les résultats de Franza *et al* (1999) indiquent que l'expression des gènes contrôlant la synthèse et l'import des sidérophores ainsi que celle

I. Introduction

des gènes codant pour des pectase-lyases, enzymes de digestion de la pectine impliquées dans la pathogénicité, sont régulées de manière coordonnée par *FUR*. L'analyse des simples et doubles mutants bactériens incapables de synthétiser ces sidérophores révèle que les deux sidérophores sont également nécessaires à l'infection de la violette africaine (*Saintpaulia ionantha*) (Franza *et al*, 2005). Les auteurs supposent que ces deux sidérophores, produits de manière séquentielle au cours de l'infection et présentant des affinités distinctes pour le fer, agissent de manière complémentaire pour aboutir à une infection efficace. Des données similaires ont été établies chez des bactéries pathogènes du genre *Pseudomonas*. Par exemple, l'étude de Taguchi *et al* (2010) démontre que la synthèse de pyoverdine est indispensable à l'infection efficace du tabac par *P. syringae* pv. *tabaci* 6605. En effet, des bactéries déficientes dans l'expression des gènes permettant la synthèse de la pyoverdine ($\Delta pvdJ$ et $\Delta PvdL$) sont moins virulentes et présentent une population bactérienne plus faible que des bactéries sauvages lors de l'infection de feuilles de tabac. Toutefois, ces données ne peuvent pas être généralisées. En effet, une étude similaire sur la souche *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 a démontré, à l'aide de simples et de doubles mutants invalidés dans la production de la pyoverdine et de la yersiniabactine, que ces sidérophores ne sont pas nécessaires à la pathogénèse chez la tomate (Jones & Wildermuth, 2011). Ces différences s'expliquent par la présence chez certains pathovars de plusieurs voies d'assimilation du fer. Jones & Wildermuth (2011) ont notamment démontré que *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 est capable d'assimiler le Fe(III)-dicitrate ainsi que les complexes Fe-NA. Ces voies secondaires d'assimilation du fer minimisent l'implication des sidérophores, soulignant l'incidence de la nature des systèmes d'assimilation du fer de la bactérie au cours de l'infection.

4.2.2 Effets des sidérophores de PGPR sur les défenses de la plante et l'ISR

Les sidérophores des bactéries bénéfiques peuvent présenter un impact sur les réactions de défense des plantes. En particulier, les bactéries dites de biocontrôle disposent de plusieurs mécanismes réduisant le développement de pathogènes (voir § 1.3 de l'introduction). En particulier, les sidérophores des PGPR sont connus pour leur capacité à agir directement sur les réactions de défense des plantes *via* l'induction de l'ISR. Par exemple, la pyoverdine purifiée de *P. putida* WCS358, de même que la bactérie sauvage, sont capables d'induire une ISR en réponse à *Ralstonia solanacearum* chez

I. Introduction

l'eucalyptus, alors que la souche ne synthétisant plus de pyoverdine perd cette aptitude (Ran *et al*, 2005). Des conclusions similaires ont été faites chez le riz en réponse à *Magnaporthe oryzae*, indiquant que dans ce cas la pyoverdine est un élément essentiel à l'induction de l'ISR (De Vleeschauwer *et al*, 2008). D'autre part, toujours chez l'eucalyptus et en réponse à *R. solanacearum*, la bactérie *P. fluorescens* WCS374r ne synthétisant plus la pyoverdine ou l'ajout de pyoverdine purifiée sont capables d'induire l'ISR dans la même mesure que la bactérie sauvage ce qui indique que la pyoverdine ainsi qu'un autre déterminant, actuellement inconnu, permettent l'induction de l'ISR (Ran *et al*, 2005). Il est toutefois important de noter que l'effet d'un même sidérophore peut varier suivant le modèle d'étude végétal. En guise d'exemple, la pyoverdine de *P. putida* WCS358 est clairement impliquée dans le mécanisme d'ISR chez la tomate alors qu'un tel rôle reste peu évident chez *A. thaliana* (Meziane *et al*, 2005).

Il est tout à fait envisageable que l'effet des sidérophores sur les réactions de défense de la plante soit lié à leur capacité à chélater le fer et ainsi à déréguler l'homéostasie des métaux *in planta* ou à induire une carence en fer, ce qui aboutirait à une induction des défenses. En effet, l'étude de Liu *et al* (2007) rapporte que chez le blé en réponse à *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* (Bgt), une accumulation de Fe(III) dans l'apoplaste des cellules attaquées est observée et induit un burst oxydatif local initiant la formation des dépôts de callose. La translocation du fer dans l'apoplaste conduit à une diminution du fer intracellulaire, accompagnée de l'induction de l'expression des gènes *PR*. Il est important de noter que cette induction est amplifiée en présence de deferrioxamine (DFO). D'autre part, Aznar *et al* (2014) ont observé qu'un traitement par la DFO ou par le ferrichrome chez *A. thaliana* s'accompagne d'un dépôt de callose vraisemblablement dû au stress oxydatif causé par une dérégulation de l'homéostasie du fer. Par ailleurs, les effets protecteurs de la carence en fer ont été observés contre les pathogènes *Botrytis cinerea* et *D. Dadantii* (Kieu *et al*, 2012 ; Koen *et al*, 2014). Comme présenté précédemment, en réponse au pathogène *D. Dadantii*, *A. thaliana* induit l'expression d'*AtFER1*, *AtNRAMP3* et *AtNRAMP4* (Dellagi *et al*, 2005 ; Segond *et al*, 2009). De manière intéressante, la chrysobactine de *D. Dadantii* seule induit une carence en fer locale suivie d'une augmentation de l'expression d'*AtFER1* et de l'activation des défenses dépendantes du SA. Il semble donc que le sidérophore induit la mise en place des défenses dépendantes du SA *via* une carence en fer (Dellagi *et al*, 2005, 2009). D'autre part, l'étude de Chen *et al* (2014) a montré que les transporteurs YSL1 et YSL3 impliqués dans la

I. Introduction

remobilisation du fer (§ 2.2 de l'introduction) sont induits en réponse au SA et sont impliqués dans la réponse aux pathogènes chez *A. thaliana*. De plus, cette même étude indique que l'induction de YSL3 est dépendante de NPR1, appuyant son implication potentielle dans les défenses. Enfin, un lien entre la carence en fer et l'induction de l'ISR par les PGPR ou leurs sidérophores a également été démontré. En effet, le facteur de transcription MYB72 induit en réponse à la PGPR *P. fluorescens* WCS417r est également induit en réponse à une carence en fer (Palmer *et al*, 2013). MYB72 est co-régulé avec les gènes *IRT1* et *FRO2* et induit l'expression des gènes *NAS2* et *NAS4*, des marqueurs de la carence en fer, au cours de la colonisation des racines par des PGPR induisant l'ISR (Palmer *et al*, 2013 ; Pieterse *et al*, 2014). De plus, l'analyse des cibles de MYB72 a permis d'identifier la β -glucosidase BGLU42. L'analyse de mutants (surexprimeurs ou déficients) pour BGLU42 a mis en évidence son implication importante dans la mise en place de l'ISR, ainsi que dans la réponse à la carence en fer *via* la sécrétion de composés phénoliques dans la rhizosphère (Zamioudis *et al*, 2014). L'ensemble de ces résultats met en évidence un lien étroit entre le statut en fer de la plante et sa susceptibilité/résistance à la maladie.

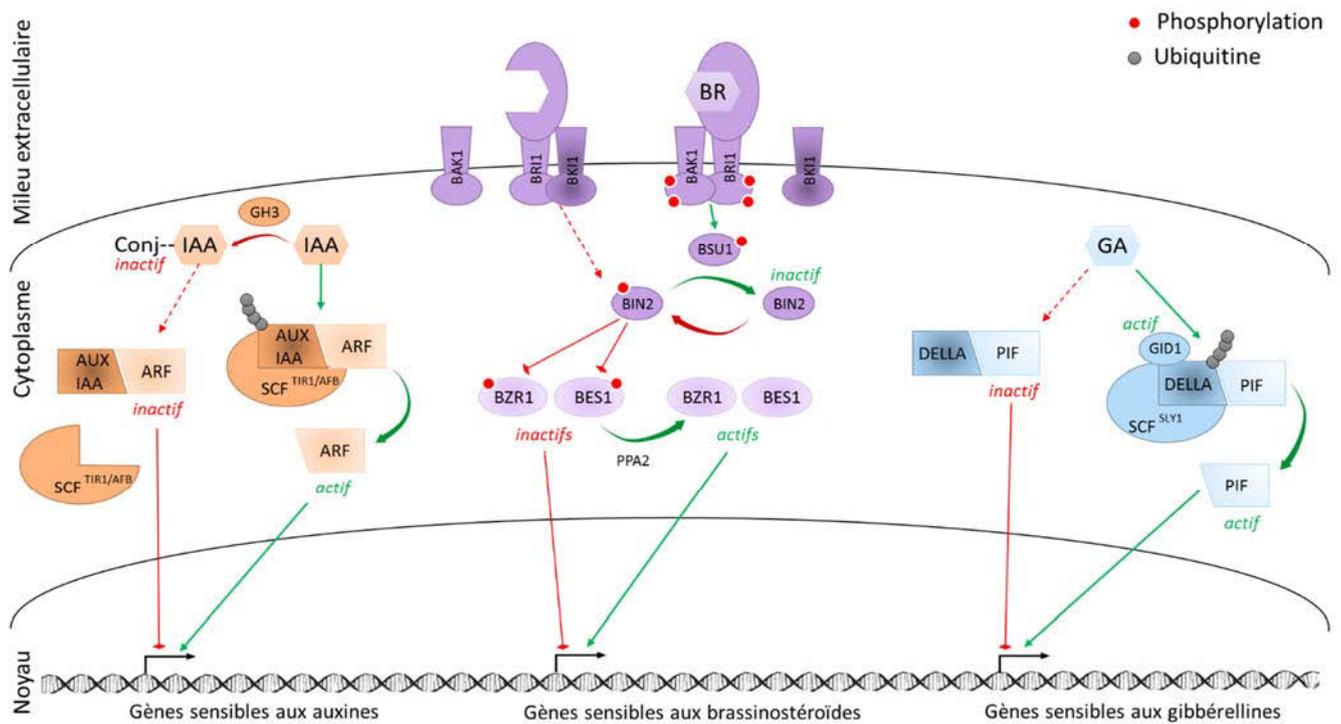


Figure I.24 : Principaux acteurs des voies de signalisation des auxines, des brassinostéroïdes et des gibbérellines (d'après Belkhadir *et al*, 2014 ; Huot *et al*, 2014)

Les flèches spécifiées en rouges, continues et en pointillés, indiquent l'état/la conformation des éléments de signalisation en absence de l'hormone. Les flèches vertes présentent les voies de signalisation déclenchées suite à la détection de l'hormone. Les points rouges désignent des événements de phosphorylation et de trans-phosphorylation ; les points gris représentent des processus de poly-ubiquitinylation et donc un adressage de protéines au protéasome 26S *via* des complexes SCF (Skp, Cullin, F-box, un complexe protéique à activité E3 ligase). Les protéines de couleur foncée agissent en tant que répresseurs des voies de signalisation, alors que les protéines de couleurs claires sont des facteurs de transcription activateurs/médiateurs des voies.

IAA, indole-3-acetic acid ; AFB, auxin signaling F-box ; ARF, auxin response factor ; AUX/IAA, auxin-inducible/indole-3-acetic acid inducible ; BAK1, BRI1-associated receptor kinase 1 ; BES1, BRI1-EMS-suppressor 1 ; BIN2, brassinosteroid insensitive 2 ; BK1, BRI1 kinase inhibitor 1 ; BR, brassinostéroïdes ; BRI1, brassinosteroid insensitive 1 ; BSU1, BRI1 suppressor 1 ; BZR1, brassinazole-resistant 1 ; DELLA, repressor protein ; GA, gibbérellines ; GH3, glycoside hydrolase family 3 ; GID1, GA insensitive dwarf 1 ; PIF, phytochrome interacting factor ; PPA2, phosphatase 2 ; SLY1, sleepy 1 ; TIR1, transport inhibitor response 1.

5. La balance croissance-défense

En réponse à l'attaque d'un microorganisme pathogène ou d'un insecte herbivore, les plantes diminuent temporairement l'investissement énergétique alloué à la croissance au profit de la défense (Vos *et al*, 2013). Ce changement dans le métabolisme est par exemple illustré par l'inhibition de croissance (*seedling growth inhibition* : SGI) observée chez des plantes traitées par flg22 induisant la mise en place de la PTI (§ 4.2.1 de l'introduction ; Chinchilla *et al*, 2007). On parle généralement de compromis ou de balance croissance-défense.

Les mécanismes régissant cet équilibre sont fortement dépendants des régulations croisées s'opérant entre les phytohormones (Huot *et al*, 2014). Comme évoqué précédemment, le JA, l'Et et le SA sont classiquement associés à la réponse à différents types de pathogènes et jouent un rôle important dans l'ISR et/ou la SAR. Les processus de croissance et de développement mobilisent d'autres hormones, en particulier (i) les auxines (dont l'acide indole 3-acétique ou IAA qui est la forme majoritaire) impliquées par exemple dans l'élongation de la tige et du pétiole ou l'architecture racinaire (Huot *et al*, 2014), (ii) les brassinostéroïdes (BR) jouant un rôle dans de nombreux processus de développement tels que la germination de la graines ou la sénescence (Gruszka, 2013) et (iii) les gibbérellines (*gibberellic acid* : GA) qui contrôlent la germination, le développement de la graine, la croissance, ainsi que l'initiation et le développement des fleurs (Sun, 2011). L'ABA est une autre hormone connue pour être impliquée dans la réponse aux pathogènes et à la carence en fer comme décrit précédemment mais aussi à d'autres stress abiotiques, comme les températures extrêmes, le stress hydrique ou encore la salinité. Les effets de l'ABA sur les stress biotiques sont très controversés et semblent dépendre du mode d'infection du pathogène, de la plante, mais également du stade de l'infection (Ton *et al*, 2009 ; Spence & Bais, 2015). L'ABA peut notamment conduire à une fermeture des stomates ou à un dépôt de callose au début de l'infection ce qui aboutira à une meilleure résistance de la plante. A l'inverse, à des stades d'infection plus avancés, la présence d'ABA interfère et est antagoniste à l'ISR et à la SAR, bloquant ainsi les réponses de défense et rendant la plante plus sensible (Ton *et al*, 2009 ; Spence & Bais, 2015). Cette hormone n'a pas été décrite comme prenant part à la balance croissance-défense, elle ne sera donc pas détaillée davantage dans cette partie. La figure I.24 présente les éléments principaux des voies de signalisation empruntées par l'IAA, les

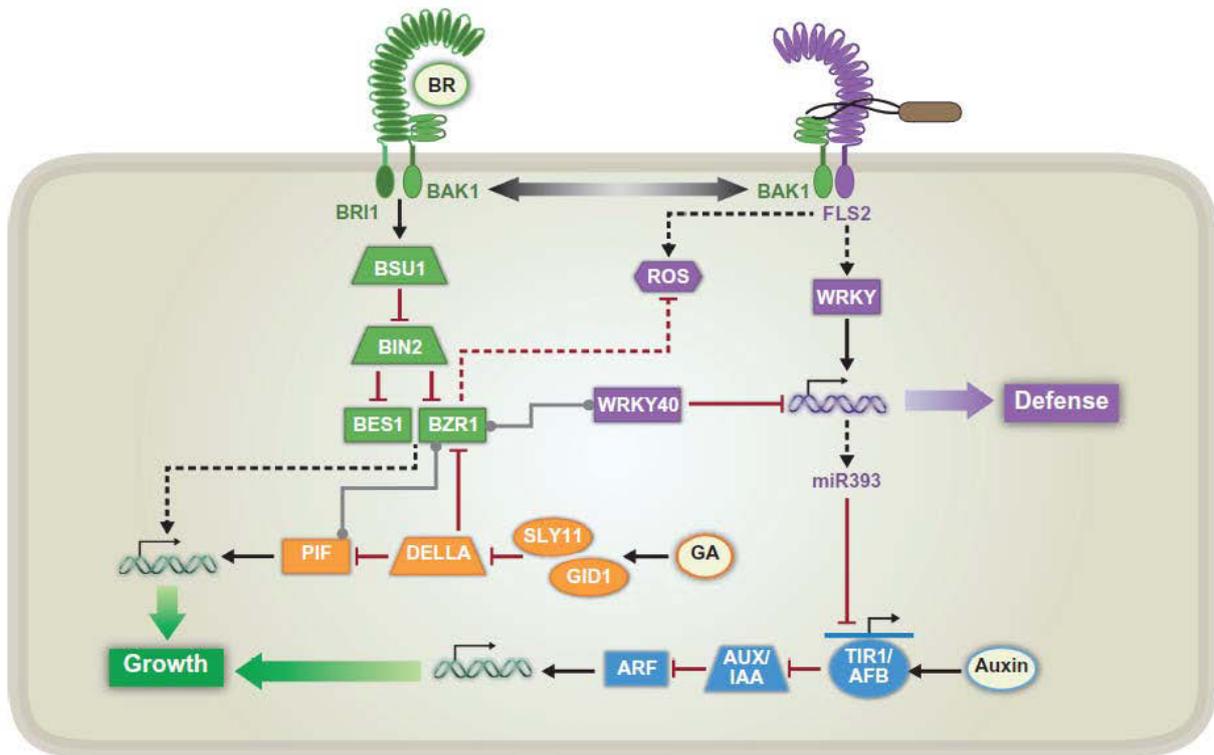


Figure I.25 : Interactions entre les BR, les GA et les auxines au cours de la PTI (d'après Huot *et al*, 2014)

Les flèches noires et rouges indiquent respectivement les interactions positives et négatives. Les traits pleins représentent des interactions directes et connues entre deux acteurs/événements cellulaires alors que les pointillées indiquent que la nature de l'interaction n'est pas élucidée ou reste à confirmer. Les doubles brins d'ADN indiquent des reprogrammations transcriptionnelles majeures. Les traits au-dessus ou en-dessous d'un élément font uniquement référence à l'induction ou à la répression de cet élément. Les mécanismes fins sont décrits dans le texte de l'introduction (§ I.5.1)

BR, brassinostéroïdes ; AFB, auxin signaling F-box ; ARF, auxin response factor ; AUX/IAA, auxin-inducible/indole-3-acetic acid inducible ; BAK1, BRI1-associated receptor kinase 1 ; BES1, BRI1-EMS-suppressor 1 ; BIN2, brassinosteroid insensitive 2 ; BRI1, brassinosteroid insensitive 1 ; BSU1, BRI1 suppressor 1 ; BZR1, brassinazole-resistant 1 ; DELLA, repressor protein ; FLS2, flagellin sensing 2 ; GA, gibbérélines ; GID1, GA insensitive dwarf 1 ; miR393, microRNA 393 ; PIF, phytochrome interacting factor ; ROS, reactive oxygen species ; SLY11, sleepy 11 ; TIR1, transport inhibitor response 1 ; WRKY, WRKY DNA-binding protein.

I. Introduction

BR et les GA (Belkhadir *et al*, 2014 ; Huot *et al*, 2014). Ces différentes hormones sont impliquées dans des voies de signalisation qui peuvent s'inter-réguler lors de l'activation des réponses de défense.

5.1. Dialogues moléculaires entre les différentes hormones

5.1.1. Les auxines

Les effets antagonistes de certaines hormones de croissance sur les défenses sont parfois utilisés par les organismes pathogènes afin de bloquer la mise en place des défenses. C'est par exemple le cas de *P. syringae* et d'*Agrobacterium tumefaciens* qui peuvent synthétiser des auxines ou manipuler leur synthèse par la plante hôte (Huot *et al*, 2014). De façon similaire, *Fusarium oxysporum* induit chez *A. thaliana* l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'auxines. L'importance de ce processus dans la pathogénicité de *F. oxysporum* est illustrée par l'observation que des mutants d'*A. thaliana* invalidés dans la signalisation par les auxines sont plus résistants (Kidd *et al*, 2011). De même, la surexpression du gène *YUCCA1* codant une flavine monooxygénase impliquée dans la biosynthèse des auxines s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité au pathogène *P. syringae* (Mutka *et al*, 2013). Les auxines activent l'induction des expansines chez le riz. Ces enzymes sont impliquées dans la croissance cellulaire et le relâchement de la paroi cellulaire ce qui peut faciliter l'entrée des pathogènes (Ding *et al*, 2008 ; Huot *et al*, 2014). Les plantes peuvent mettre en place des stratégies afin de s'opposer à cette manipulation de la synthèse d'auxines. Par exemple, en réponse à un traitement par flg22, *A. thaliana* induit l'expression du microARN miR393. MiR393 réprime la transcription des gènes codant les récepteurs de l'auxine TIR1, AFB2 et AFB3 (*transport inhibitor response 1 et auxin signaling F-box 1 and 2*), trois protéines faisant partie du complexe SCF-TIR1 permettant l'ubiquitinylation et la dégradation du complexe AUX/IAA – ARF (*auxin-inducible/indole-3-acetic acid inducible - auxin response factor*) qui réprime en absence d'auxines la transcription des gènes inductibles par les auxines. MiR393 induit le clivage des messagers correspondants et ainsi favorise la stabilisation du complexe AUX/IAA – ARF (figure I.25)(Navarro *et al*, 2006). De plus, l'accumulation de SA tout comme la signalisation induite par flg22 répriment les effets des auxines *via* deux autres mécanismes (figures I.26). Tout d'abord, le SA réprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans la voie des auxines dont TIR1 (Wang *et al*, 2007). Ensuite, l'expression de *GH3.5*, un gène de la famille des *GH3* dont les produits sont impliqués dans la dégradation

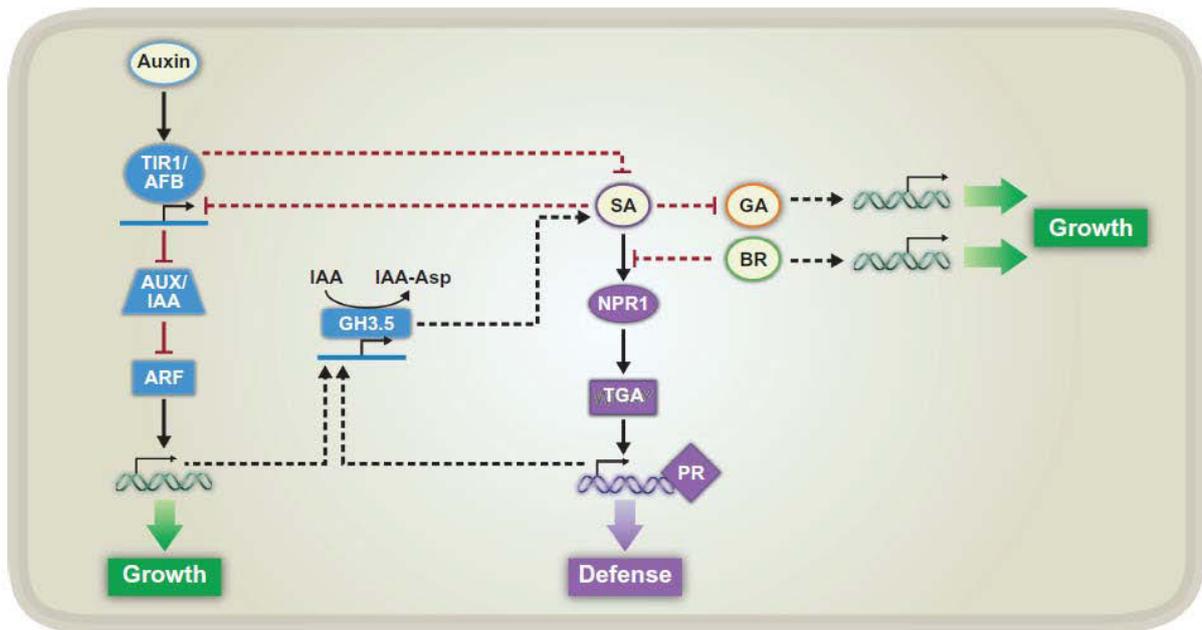


Figure I.26 : Régulations croisées de voies de signalisation impliquant le SA, les auxines, les GA et les BR et associées à la balance croissance-défense (d'après Huot *et al*, 2014)

Les flèches noires et rouges indiquent respectivement les interactions positives et négatives. Les traits pleins représentent des interactions directes et connues entre deux acteurs/événements cellulaires alors que les pointillés indiquent que la nature de l'interaction n'est pas élucidée ou reste à confirmer. Les doubles brins d'ADN indiquent des reprogrammations transcriptionnelles majeures. Les traits au-dessus ou en-dessous d'un élément font uniquement référence à l'induction ou à la répression de cet élément. Les mécanismes fins sont décrits dans le texte de l'introduction (§ I.5.1.1 et I.5.1.3).

BR, brassinostéroïdes ; AFB, *auxin signaling F-box* ; ARF, *auxin response factor* ; AUX/IAA, *auxin-inducible/indole-3-acetic acid inducible* ; GA, gibbérellines ; GH3, hydrolase family 3 ; NPR1, *nonexpressor of PR genes 1* ; PR, *pathogenesis related* ; SA, *salicylic acid* ; TGA, *TGACG sequence-specific binding protein* ; TIR1, *transport inhibitor response 1*.

I. Introduction

de l'IAA, est induite en réponse à un pathogène ou au SA chez *A. thaliana* (Wang *et al*, 2006, 2007 ; Zhang *et al*, 2007). GH3-5 conjugue l'IAA avec un résidu d'acide aspartique, le rendant inactif. L'importance de GH3-5 est renforcée par l'analyse des mutants invalidés dans son expression. Ces derniers ne peuvent plus induire la SAR, alors qu'au contraire les surexprimeurs de GH3-5 présentent d'importants niveaux de SA, une expression élevée de NPR1 et une résistance accrue à *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Zhang *et al*, 2007 ; Huot *et al*, 2014). Ainsi GH3-5 serait un régulateur de la balance croissance-défense au profit de la défense (Huot *et al*, 2014).

Par ailleurs, l'interaction entre le JA et les auxines conduit également à l'induction de la SGI. En effet, le JA affecte la distribution subcellulaire du transporteur d'auxines PIN2 qui joue un rôle critique au cours du développement, perturbant ainsi la distribution des auxines dans la plante (Sun *et al*, 2011). De plus, Chen *et al* (2011) ont démontré que le facteur de transcription MYC2 activé suite à un traitement par le JA induit la répression de l'expression des deux gènes codant pour les facteurs de transcription PLT1 et PLT2. Or l'expression de ces deux gènes est induite en réponse aux auxines au cours de la formation et du développement des racines (figure I.27). Ces données montrent donc un effet antagoniste du JA et des auxines. Toutefois, ce constat n'est pas général. En effet, d'autres études ont montré que le JA peut activer l'expression des gènes *ASA1*, *YUC8* et *YUC9* dont les produits sont impliqués dans la synthèse d'auxines et qu'il contribue à la régulation fine de la concentration d'auxines dans les racines (Sun *et al*, 2009 ; Hentrich *et al*, 2013). De plus, Grunewald *et al* (2009) ont montré que la protéine JAZ1 (*jasmonate zim domain* 1), réprimant la voie de signalisation JA, est induite en réponse aux auxines (figure I.27). Ces résultats suggèrent qu'il existe également une régulation négative des auxines sur le JA. Ces quelques exemples témoignent de la complexité et des régulations fines existant entre les auxines et des hormones classiquement associées aux défenses.

5.1.2. Les brassinostéroïdes (BR)

Des interactions entre la signalisation des BR et celle associée à la PTI ont été récemment décrites et définies comme unidirectionnelles et négatives dans deux études chez *A. thaliana*. En effet, l'activation de la voie de signalisation des BR par surexpression du récepteur aux BR BRI1 (*brassinosteroid insensitive 1*) ou de l'enzyme de biosynthèse des BR DWF4 ou bien suite à un traitement exogène par des BR, supprime la résistance contre *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Albrecht *et al*, 2012 ; Belkhadir *et al*, 2012 ; Lozano-

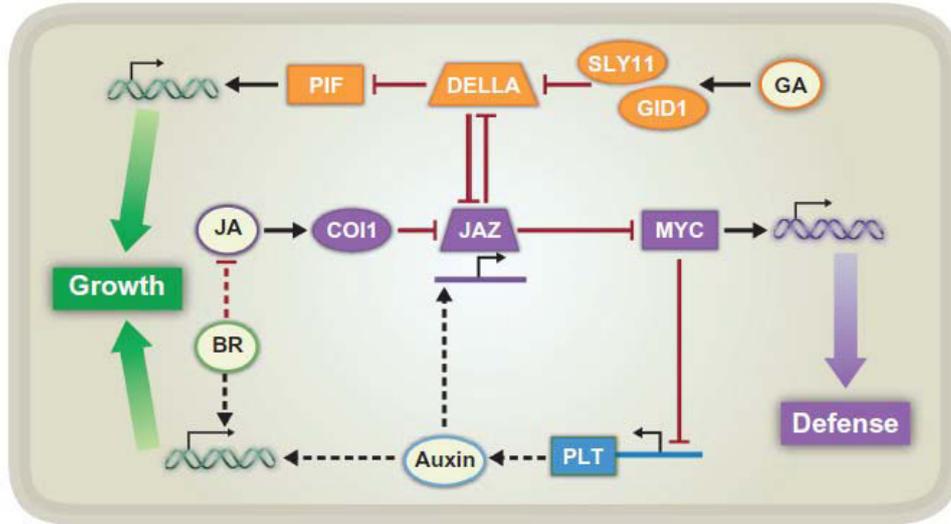


Figure I.27 : Régulations croisées des voies de signalisation impliquant le JA, les auxines, les GA et les BR et associées à la balance croissance-défense (d'après Huot *et al*, 2014)

Les flèches noires et rouges indiquent respectivement les interactions positives et négatives. Les traits pleins représentent des interactions directes et connues entre deux acteurs/événements cellulaires alors que les pointillées indiquent que la nature de l'interaction n'est pas élucidée ou reste à confirmer. Les doubles brins d'ADN indiquent des reprogrammations transcriptionnelles majeures. Les traits au-dessus ou en-dessous d'un élément font uniquement référence à l'induction ou à la répression de cet élément. Les mécanismes fins sont décrits dans le texte de l'introduction. (§ I.5.1.1 et I.5.1.3).

BR, brassinostéroïdes ; COI1, coronatine insensitive 1 ; DELLA, repressor protein ; GA, gibbérellines ; GID1, GA insensitive dwarf 1 ; JA, jasmonic acid ; JAZ, jasmonate zim domain ; MYC, MYC transcription factor ; PIF, phytochrome interacting factor ; PLT, PLETHORA transcription factor ; SLY11, sleepy 11.

I. Introduction

Durán & Zipfel, 2015). Le rôle potentiel de BAK1 dans ce processus a été examiné. BAK1 est un co-récepteur impliqué dans la signalisation de la PTI en association avec les récepteurs kinases FLS2 et EFR, reconnaissent respectivement les PAMPs flg22 et EF-Tu, et dans la signalisation des BR *via* son interaction avec le récepteur kinase BRI1 qui reconnaît le brassinolide, le premier BR identifié (figure I.25). Il a donc été initialement considéré comme un régulateur potentiel permettant la bascule de la défense vers la croissance. Toutefois, plusieurs études ont montré que le traitement par des BR inhibe la mise en place de la PTI en aval et indépendamment de BAK1, ceci sans affecter la quantité de complexe FLS2-BAK1 (Albrecht *et al*, 2012 ; Lozano-Durán *et al*, 2013). En revanche, l'inhibition de la PTI par les BR semble être dépendante de l'expression des gènes cibles du facteur de transcription BZR1 (*brassinazole-resistant 1*, figure I.25). L'activation de BZR1 nécessite en aval l'inactivation de la kinase BIN2 (*brassinosteroid insensitive 2*), l'activation de la phosphatase PPA2 (phosphatase 2) et la déstabilisation des protéines DELLA, réprimant la signalisation en réponse aux BR, aux GA et au JA (figure I.24 et 25)(Lozano-Durán & Zipfel, 2015). Les cibles de BZR1 incluent des facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes inductibles par les BR et bloquent les réactions de défense comme par exemple WRKY40 (Lozano-Durán *et al*, 2013). Sur la base d'expériences de co-immunoprécipitation, Lozano-Durán *et al* (2013) ont montré que BZR1 et WRKY40 pourraient interagir physiquement, réprimant ainsi la PTI. Parmi les facteurs de transcription activés au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par les BR figure HBI1 (*homolog of Bee2 interacting with IBH1*), un facteur de transcription de la famille des bHLH associé à l'élongation cellulaire *via* l'expression de gènes codant pour des expansines (Malinovsky *et al*, 2014). HBI1 fait partie d'un module de régulation contenant deux autres acteurs, PRE1 et IBH1 (*paclobutrazol-resistant 1* et *ILI1 binding bhlh protein 1*), des facteurs de transcription jouant un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux BR (Bai *et al*, 2012a). Ce module est à l'interface des voies de signalisation des BR et de la PTI (figure I.28)(Belkhadir *et al*, 2014) et l'expression de HBI1 est réprimée en réponse à plusieurs PAMP (Bai *et al*, 2012a ; Malinovsky *et al*, 2014). En accord avec ces données, des plantes d'*A. thaliana* présentant une expression constitutive de HBI1 présentent une PTI réduite (Fan *et al*, 2014 ; Malinovsky *et al*, 2014). Ainsi, ces résultats laissent supposer que le couple BZR1-HBI1 pourrait jouer un rôle clef dans la régulation de la balance croissance-défense (figure I.28).

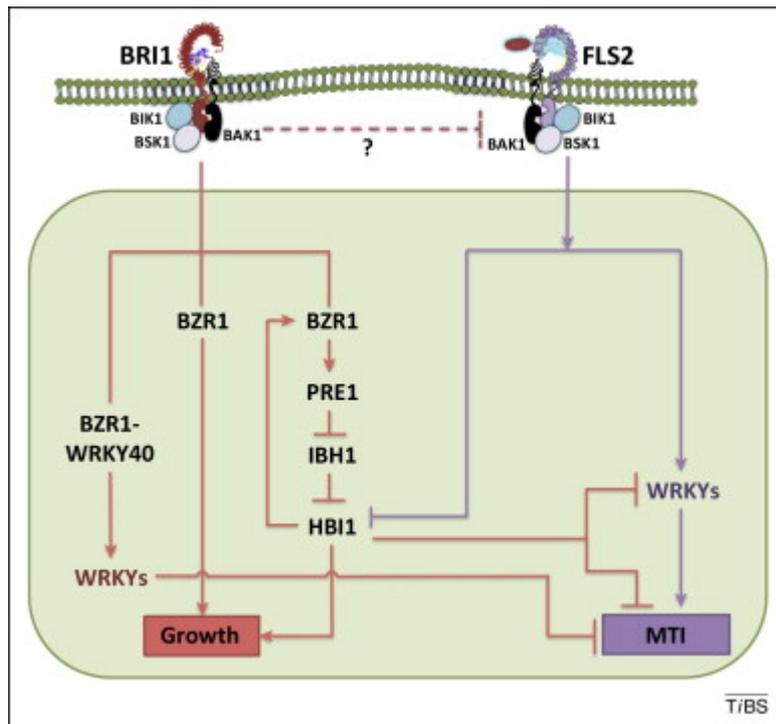


Figure I.28 : Réseau de signalisation entre les BR et la PTI induite par Flg22 (d'après Belkhadir *et al*, 2014).

Ce schéma illustre le rôle central du facteur de transcription BZR1 ainsi que la boucle d'autorégulation positive HBI1/BZR1. HBI1 est à l'interface entre les voies de signalisation des BR et de la PTI et constitue un nœud de signalisation clef dans régulation de la balance croissance-défense. Les mécanismes fins sont décrits dans le texte de l'introduction (§ I.5.1.2).

BAK1, *BRI1-associated receptor kinase 1* ; BIK1, *botrytis induced kinase 1* ; BKI1, *BRI1 kinase inhibitor 1* ; BRI1, *brassinosteroid insensitive 1* ; BSK1, *BR signaling kinase 1* ; BZR1, *brassinazole-resistant 1* ; FLS2, *flagellin sensing 2* ; HBI1, *homolog of Bee2 interacting with IBH1* ; IBH1, *IL1 binding bhlh protein1* ; MTI, *MAMP triggered immunity* ; WRKY, *WRKY DNA-binding protein*.

I. Introduction

Les BR sont également impliqués dans l'inhibition de la SAR chez le riz. En effet, le traitement par des BR bloque la mise en place de la SAR induite par le BTH (benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester), un analogue du SA (De Vleeschauwer *et al*, 2012). Dans ce processus, les BR agissent en aval de la biosynthèse du SA et en amont de NPR1 (De Vleeschauwer *et al*, 2012). De plus, les BR inhibent la SGI induite par le JA (Ren *et al*, 2009 ; Huot *et al*, 2014). Là encore, ces données ne sont pas aisées à interpréter, une autre étude (Peng *et al*, 2011) ayant mis en évidence un effet positif des BR sur l'accumulation d'anthocyanes induite par le JA (Peng *et al*, 2011).

5.2.3. Les gibbérellines (GA)

Le rôle des GA dans l'inhibition de la SGI lors d'une attaque pathogène est associé à leur capacité à induire la voie de signalisation des BR (Huot *et al*, 2014). En effet, plusieurs interactions entre ces voies de signalisation ont été décrites (Jaillais & Vert, 2012). Tout d'abord, les facteurs de transcription BZR1 et PIF4 (*phytochrome interacting factor 4*, figure I.24), respectivement impliqués dans les voies de signalisation des BR et des GA, forment un hétérodimère impliqué dans l'activation transcriptionnelle de l'expression d'environ 2000 gènes dont les protéines correspondantes jouent un rôle dans la croissance (figure I.25)(Oh *et al*, 2012). L'activité de ces deux facteurs de transcription est régulée négativement *via* la formation de complexes avec des protéines DELLA présentant une stabilisation accrue lors de la PTI induite par flg22 (Navarro *et al*, 2008). En accord avec un rôle négatif des GA sur la SGI, il a été rapporté que les GA concourent à la déstabilisation et à la dégradation des protéines DELLA, libérant ainsi de manière coordonnée des éléments de signalisation des GA et des BR (figure I.24 et 27)(Bai *et al*, 2012b ; Gallego-Bartolomé *et al*, 2012). Il est à noter que le traitement par des GA seuls ne modifie pas fondamentalement la SGI alors qu'un traitement par des GA et des BR induit une inhibition de la SGI plus intense, indiquant un effet additif et coordonné des deux hormones (Lozano-Durán *et al*, 2013). En revanche, l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse de GA abolit l'effet négatif des BR sur la SGI (Lozano-Durán *et al*, 2013). Ces résultats mettent en évidence l'existence de connexions entre ces deux voies de signalisation et l'implication des protéines DELLA dans ce dialogue moléculaire.

Des liens fonctionnels entre les hormones GA et SA ont également été soulignés. Par exemple, les plantes d'*A. thaliana* mutées pour le gène codant l'hydroxycinnamoyl CoA : shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) impliquée dans la synthèse de la lignine

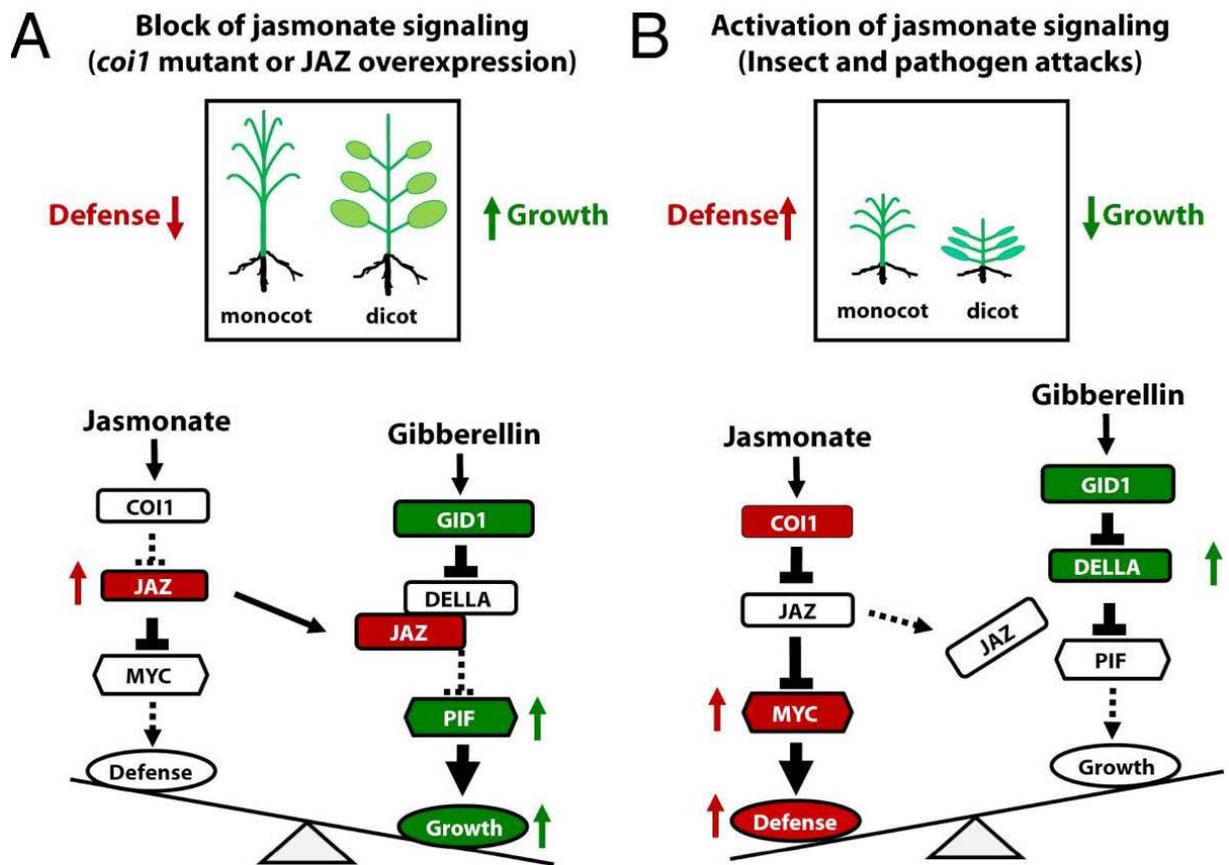


Figure I.29 : Implication des protéines JAZ et DELLA dans la balance croissance-défense (d'après Yang *et al*, 2012).

A. Lorsque la voie du jasmonate est bloquée par mutation/inactivation du récepteur *COI1* ou par surexpression des répresseurs JAZ, ces derniers sont stabilisés et s'accumulent pour (i) se fixer et réprimer MYC (voie du JA) et (ii) se fixer aux protéines DELLA, inhibant ainsi leur fixation avec PIF, un activateur de la croissance induite par les GA. La croissance est ainsi favorisée.

B. Quand la voie du JA est activée suite à l'attaque d'un pathogène ou d'un herbivore, *COI1* est activé et entraîne la dégradation des protéines JAZ et donc favorise (i) la libération de MYC qui contribue à l'activation des défenses et (ii) la libération des protéines DELLA qui vont se fixer aux facteurs de transcription PIF et réprimer la croissance.

I. Introduction

présentent un phénotype nain, un niveau de SA élevé ainsi qu'une diminution des niveaux et de la perception des GA (Gallego-Giraldo *et al*, 2011). Ce phénotype a été corrélé à un effet négatif du SA vis-à-vis de la signalisation et de la perception des GA (figure I.26)(Gallego-Giraldo *et al*, 2011). Il est probable que cet effet négatif du SA soit dû à la stabilisation des protéines DELLA, ce qui soulève la possibilité que le SA puisse réprimer la voie des BR (Huot *et al*, 2014).

Enfin, plusieurs études récentes se sont intéressées à l'interaction JA-GA. Chez *Nicotiana attenuata*, l'analyse de mutants sur-accumulant le JA a mis en évidence l'effet antagoniste de celui-ci sur la biosynthèse des GA (Heinrich *et al*, 2013). Une étude chez *A. thaliana* a démontré l'interaction physique *in vivo* entre les répresseurs des voies JA et GA, JAZ1 et DELLA. En absence de GA, les protéines DELLA s'associent avec JAZ1, libérant ainsi MYC2 et activant la voie de signalisation du JA (figure I.27 et 29). A l'inverse, en présence de GA, les protéines DELLA sont déstabilisées, JAZ1 s'associe et inactive MYC2 et la voie du JA (Hou *et al*, 2010). De plus, parmi les gènes cibles de MYC2 figure celui codant la protéine RGL3 appartenant aux protéines de la famille DELLA. Le mutant *rgl3* invalidé dans l'expression de la protéine correspondante est moins résistant à *B. cinerea* et à *P. syringae* (Wild *et al*, 2012). Ces résultats mettent en lumière le rôle des protéines DELLA dans l'activation des défenses induites par le JA. D'autre part, l'association des protéines JAZ-DELLA bloque l'association PIF-DELLA favorisant l'activation de la croissance induite par les GA. Ces éléments ont été mis en évidence à l'aide de différents mutants chez *A. thaliana* et chez le riz par Yang *et al* (2012)(figure I.29).

5.2. Les autres éléments pouvant influencer la balance croissance-défense

Les hormones sont décrites comme étant les acteurs clefs de la régulation de la balance croissance-défense. D'autres facteurs semblent avoir également une importance dans ce processus. Citons par exemple la température. A température dite ambiante favorable, la plante présentera une croissance normale et sera apte à développer des réactions de défense suite à l'attaque d'un pathogène. A plus forte température, la capacité de la plante à se défendre est réduite (Alcázar & Parker, 2011). La protéine SCN1 de la famille des récepteurs NB-LRR agirait comme un senseur de la température et semble impliquée dans la modulation de la résistance et de la défense. En effet, le mutant d'*A. thaliana* *scn1-1* présente une mutation rendant la protéine constitutivement active, ce qui

I. Introduction

aboutit à une expression constitutive de gènes *PR*, à la résistance contre plusieurs pathogènes à température ambiante (*P. syringae*, *P. maculicola*, *P. parasitica*) et à une réduction de la croissance (Zhang *et al*, 2003). Cette réduction de croissance et l'augmentation des défenses sont observées à 22°C mais la plante *scn1-1* retrouve un phénotype similaire à la plante sauvage à plus haute température (28°C), ce qui souligne l'inhibition de l'activité de SCN1 par les hautes températures (Yang & Hua, 2004 ; Zhu *et al*, 2010 ; Alcázar & Parker, 2011).

6. Projet de thèse

6.1 Contexte général de l'étude

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mes recherches étudie les processus cellulaires et moléculaires associés à l'immunité chez les plantes. Ces dernières années, un accent particulier a été porté sur l'identification et l'analyse fonctionnel de protéines régulées au niveau post-traductionnel par phosphorylation et par le NO *via* le processus de S-nitrosylation (pour revue voir Astier *et al*, 2012b ; Koen *et al*, 2013b). C'est ainsi que de nouveaux acteurs de l'immunité ont été caractérisés, en particulier les histones désacetylases de type II (Bourque *et al*, 2011 ; Grandperret *et al*, 2014) et la chaperonne CDC48 (Astier *et al*, 2012a ; Rosnoblet *et al.*, soumis). Outre l'étude du processus de S-nitrosylation, mon équipe s'intéresse au rôle du NO dans la régulation de la signalisation calcique (Jeandroz *et al*, 2013), à ses régulations croisées avec les ROS (Kulik *et al*, 2014) et à son implication dans la SAR (Wang *et al*, 2014a ; Wendehenne *et al*, 2014).

Dans le cadre du programme transversal Toxicologie Nucléaire Environnementale (2004-2007 ; initiative du Commissariat à l'Energie Atomique élargie aux autres organismes de recherche français), puis du projet ANR blanc PIANO (2008-2012 ; coordinateur D. Wendehenne), mon équipe s'est focalisée sur le rôle du NO dans la réponse d'*A. thaliana* au métal toxique cadmium (Cd). Ce dernier est assimilé au niveau des racines, en particulier *via* le transporteur IRT1, et en conséquence altère l'import de fer. Mon équipe d'accueil a ainsi démontré que le NO produit dans les racines de plantes d'*A. thaliana* soumises à un traitement par le Cd agit comme un signal de carence en fer et régule positivement l'expression de gènes associés à l'import et au transport de fer *in planta* (Besson-Bard *et al*, 2009). Parmi ces gènes figure le gène *AtNAS4* dont la caractérisation fonctionnelle a ensuite été entreprise (Koen *et al*, 2012, 2013a).

Sur la base de ces résultats, l'équipe a récemment débuté des travaux visant à mieux comprendre les liens fonctionnels entre homéostasie du fer et immunité. C'est dans ce contexte qu'une collaboration a été initiée avec une seconde équipe de l'UMR Agroécologie spécialisée dans l'étude de bactéries bénéfiques de la rhizosphère dont *P. fluorescens*. Plus précisément, cette équipe, dirigée par le Dr. P. Lemanceau, étudie différentes fonctions bactériennes connues pour leur implication dans la pathogénicité dans le contexte des interactions bénéfiques plantes-rhizobactéries. En effet, comme

I. Introduction

évoqué dans cette introduction, le genre *Pseudomonas* comprend des pathogènes de végétaux mais aussi un grand nombre de PGPR. De façon remarquable, certains des traits bactériens connus pour leur importance dans la virulence des bactéries pathogènes d'eucaryotes animaux ou végétaux sont aussi associés aux interactions bénéfiques entre les plantes et les *Pseudomonas* de la rhizosphère (Viollet *et al*, 2011). C'est notamment le cas des sidérophores (Vansuyt *et al*, 2007). En effet, ceux-ci réduisent la croissance saprophyte de champignons phytopathogènes et ainsi la fréquence des infections racinaires. Cette compétition ne s'exerce pas à l'encontre de la plante-hôte mais, au contraire, la plante semble avoir développé des stratégies d'acquisition du fer à partir des complexes fer-sidérophore (Shirley *et al*, 2011). En particulier, un effet bénéfique sur la nutrition en fer de la plante est observé chez des plantes d'*A. thaliana* cultivées en présence de pyoverdine chélatée au fer extraite de la souche modèle *P. fluorescens* C7R12. Cette augmentation de la teneur en fer dans les tissus végétaux a été associée à l'incorporation de pyoverdine par la plante (Vansuyt *et al*, 2007). Renforçant l'hypothèse d'un rôle bénéfique de la pyoverdine, une étude menée sur des suspensions cellulaires de tabac a révélé la capacité de certaines pyoverdines issues de différentes souches de *Pseudomonas* à induire des événements de signalisation précoces caractéristiques de la mise en place de la PTI (van Loon *et al*, 2008). Dans cette même étude, les auteurs ont montré, sur des plants de tabac, que le traitement par ces mêmes pyoverdines conduit à une diminution des symptômes et de la gravité de la maladie causée par *E. carotovora*. L'ensemble de ces résultats laisse donc supposer que la pyoverdine, en plus de ces effets antagonistes *via* la compétition pour le fer vis-à-vis des pathogènes du sol, pourrait également déclencher *in planta* des processus physiologiques associés à l'immunité, l'homéostasie du fer et à la croissance.

6.3. Objectifs de la thèse

Mon projet de thèse s'est inscrit dans la compréhension des régulations croisées s'opérant entre l'immunité et l'homéostasie du fer chez *A. thaliana*. Il s'est principalement focalisé sur l'analyse de l'incidence de la pyoverdine sur la physiologie de la plante et, de façon secondaire, a porté sur l'étude de l'impact de l'acide β -amino-butyrique, un inducteur de résistance, sur l'homéostasie du fer. De façon intéressante, les résultats de cette étude ont également permis d'appréhender les processus associés à la régulation de la balance défense-croissance.

MATERIELS ET METHODES

Gène muté	Nom du mutant	Code SALK ou SAIL	N° ATG	Commentaires
<i>BHLH 100</i>	<i>bHLH 100</i>	SALK_074568C	<i>AT2G41240</i>	
<i>CER 4</i>	<i>cer 4</i>	SALK_000575C	<i>AT4G33790</i>	
<i>FAD</i>	<i>fad</i>	SALK_083228	<i>AT1G26390</i>	
<i>FER1</i>	OvFer 1		<i>AT5G01600</i>	Graines fournies par L. Avoscan (INRA, Dijon, France)
<i>FRO 2</i>	<i>fro 2</i>		<i>AT1G015800</i>	
<i>GLUTAREDOXIN</i>	<i>glutaredoxin</i>	SALK_001139C	<i>AT3G59320</i>	
<i>IRT1</i>	<i>irt1</i>		<i>AT4G19690</i>	Graines fournies par F. Gaymard (INRA, Montpellier, France)
<i>LTP</i>	<i>ltp</i>	SALK_06856	<i>AT5G59330</i>	
<i>LTP 3</i>	<i>ltp 3</i>	SALK_095248C	<i>AT5G59320</i>	
<i>NAS 4</i>	<i>nas 4</i>	SALK_135507	<i>AT1G56430</i>	Graines produites au laboratoire (Koen <i>et al</i> , 2013)
	Ov Nas 4			
<i>ORG 3</i>	<i>org 3</i>	SALK_02676C	<i>AT3G56980</i>	
<i>HBI1</i>	HBI1 Ov		<i>AT2G18300</i>	Graines fournies par C. Zipfel (The Sainsbury Laboratory, Royaume-Uni)
	<i>hbi1 L → E</i>			
<i>PDR9</i>	<i>prd9.2</i>	SALK_050885	<i>AT3G53480</i>	Graines fournies par F. Gaymard (INRA, Montpellier, France)
	<i>prd9.3</i>	SALK_078574		

Tableau II.1 : Liste des mutants utilisés

II. Matériels et méthodes

1. Matériels biologiques

1.1. Matériel végétal

Les travaux ont été menés sur l'écotype sauvage Columbia-0 (Col-0) d'*A. thaliana* ainsi que sur plusieurs mutants d'insertion ADN-T obtenus auprès du « *Nottingham arabidopsis stock center* » (NASC, Nottingham, Royaume-Uni) ou déjà disponibles au laboratoire (tableau I.1).

La présence de l'insert ADN-T a été vérifiée par PCR dans toutes les plantes issues des graines commandées au NASC (§ 4.9.2 de la partie matériels et méthodes). Des stocks de graines ont été générés à partir des mutants identifiés comme étant homozygotes.

1.2. Suspensions cellulaires d'*A. thaliana*

Les suspensions cellulaires d'*A. thaliana* Col0 sauvage, initiées au laboratoire à partir de cals provenant de graines, ont été cultivées dans le milieu Linsmaier & Skoog (Linsmaier & Skoog, 1965 ; § 1.1 de la partie annexes) additionné de saccharose (30 g.L⁻¹), d'acide naphthalène acétique (2,7 µM) et de kinétine (0,23 µM). Elles ont été maintenues sous agitation permanente (120 rpm) en salle climatisée (24°C) et en lumière continue (25 µE.m⁻².s⁻¹). En fin de phase exponentielle de croissance, les suspensions cellulaires ont été repiquées par ajout de 25 mL dans 100 mL de milieu de culture. Pour les mesures d'activités biologiques, à saturation, elles ont été diluées au demi par addition de milieu de culture 24 heures avant l'expérimentation.

1.3. Matériel bactérien

La souche de *P. fluorescens* C7R12 a été utilisée pour la purification de la pyoverdine. *P. fluorescens* C7R12 est un mutant spontané résistant à la rifampicine de la souche sauvage C7 (Eparvier *et al*, 1991), qui a été précédemment isolée de la rhizosphère de lin cultivé dans le sol de Châteaurenard (Bouches-du-Rhône, France), sol connu pour sa capacité à limiter la fusariose vasculaire (Lemanceau *et al*, 1988). *P. fluorescens* C7R12 a été cultivée sur un milieu King's B solide (King *et al*, 1954 ; § 1.2 de la partie annexes) à 25°C, puis dans un milieu succinate carencé en fer (SM, Meyer & Abdallah, 1978 ; § 1.3 de

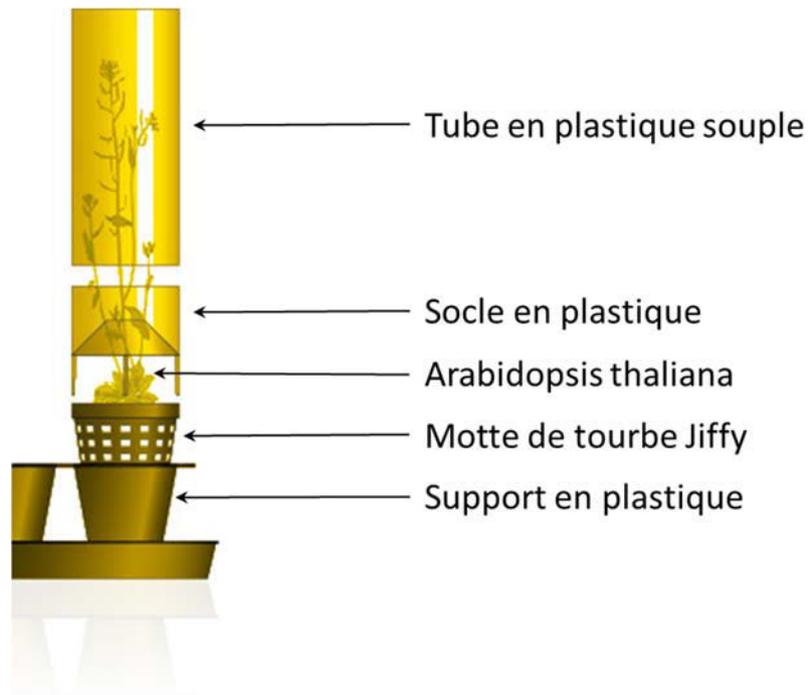


Figure II.1 : Présentation de l'Arasystème (arasystem.com) destiné à récolter facilement les graines d'*A. thaliana*

II. Matériels et méthodes

la partie annexes) sous agitation (180 rpm) à 25°C et à l'abri de la lumière pour la production des sidérophores.

La souche de *P. syringae* pv *tomato* DC 3000 est un don du Professeur Jean-Pierre Métraux (Université du Fribourg, Suisse ; Whalen *et al*, 1991). Les bactéries ont été cultivées sur milieu King's B additionné de rifampicine (50 µg.mL⁻¹) pendant deux jours à 28°C.

1.4. Matériel fongique

La souche de *B. cinerea* BBM est un don du Professeur Brigitte Mauch-Mani (Université de Neuchâtel, Suisse ; Zimmerli *et al*, 2001). *B. cinerea* a été cultivé pendant 10 jours sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar ; BD (Becton, Dickinson and Company,)), § 1.4 de la partie annexes) à 39 g.L⁻¹ dans une enceinte thermostatée à 23°C et à l'obscurité. Les spores ont été extraites dans de l'eau ultrapure (mQ) et ont été conservées jusqu'à deux semaines à 4°C à une concentration d'au moins 1.10⁸ spores/mL.

2. Conditions de culture des plantes

2.1. Préparation des graines

Afin de limiter le développement de germes et de bactéries, les graines ont été stérilisées en surface avant leur utilisation. Pour ceci, elles ont été plongées dans une solution composée d'hypochlorite de calcium (2,5 %) et d'éthanol (75 %) puis agitées pendant une minute à température ambiante. La solution de stérilisation a été retirée et les graines ont été rincées trois fois à l'éthanol absolu puis séchées sous hotte à flux laminaire. Les graines ont été conservées à 4°C et à l'abri de la lumière.

Avant d'être semées, les graines ont été stratifiées. Une période de 4 jours à l'obscurité et à 4°C a été nécessaire pour lever la dormance des graines. La méthode de stratification a différé en fonction du mode de culture utilisé.

2.2. Culture en terre

Les plantes cultivées en terre ont été semées sur des mottes de sol commerciales (Jiffy ; Puteaux SA : 33 x 33 mm après réhydratation). L'utilisation de ces petites pastilles de substrat propre et drainant contenant des fibres de noix de coco compressée permet de standardiser les conditions de culture. Après réhydratation de la motte, 3 à 5 graines

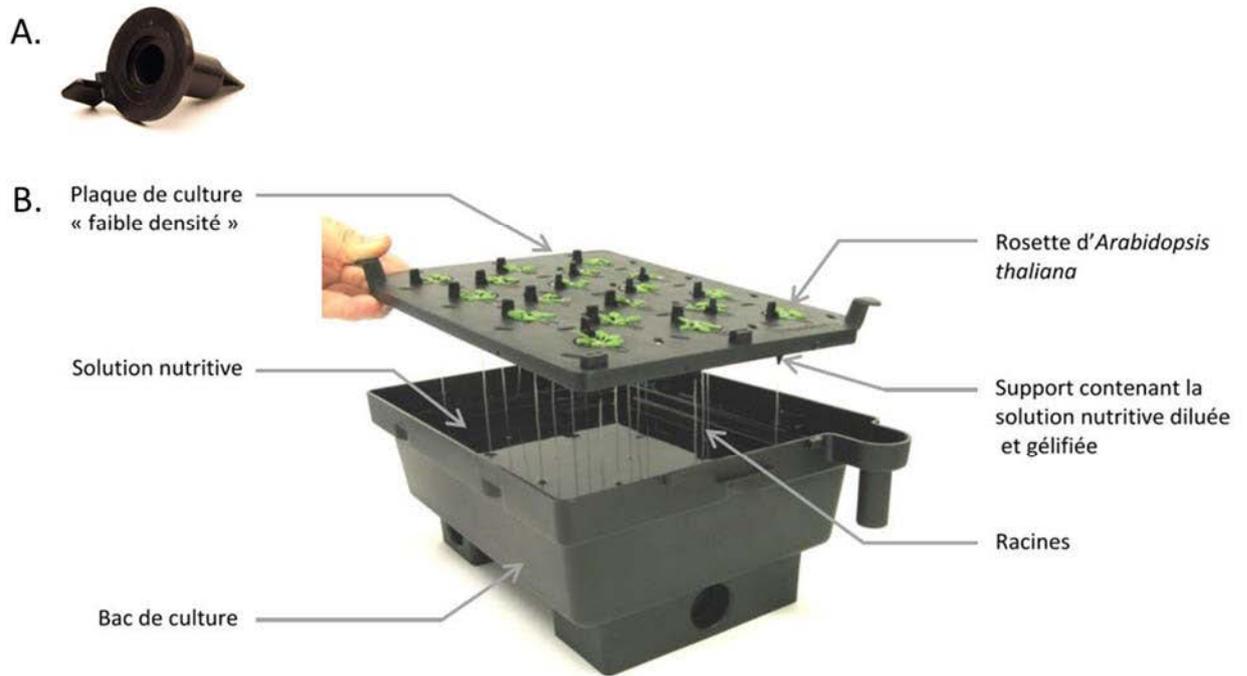


Figure II.2 : Présentation du système de culture en hydroponie pour *A. thaliana* (d'après Thèse E. Koen, 2012)

A. Support plastique où sont déposées les graines. Le support comporte une solution nutritive au 1/2 gélifiée par ajout d'agar 0,75% (m/v).

B. Boîte de culture hydroponique « Araponics system ».

II. Matériels et méthodes

ont été semées par motte. L'ensemble a ensuite été placé 4 jours à 4°C et à l'obscurité pour la stratification. Les mottes ont ensuite été installées en chambre de culture climatisée à raison d'un cycle de 10 heures de jour (20°C, 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 70 % d'humidité relative) et 14 heures de nuit (18°C, 90 % d'humidité relative). Une importante humidité a été maintenue durant 5 jours en couvrant les mottes avec du film étirable Saran. Les plantes ont ensuite été arrosées deux fois par semaine jusqu'à leur utilisation pour les expériences biologiques.

Les plantes en terre ont également été utilisées pour générer des stocks de graines de plantes sauvages (Col 0) ou mutantes. Après environ 5 semaines de culture dans les conditions de culture présentées ci-dessus, les plantes ont été transférées en motte Jiffy de taille supérieure (50 x 95 mm après réhydratation) et ont été placées en condition de culture dite de « jour long » à raison d'un cycle de 16 heures de jour (23°C) et 8 heures de nuit (20°C). Quand les hampes florales sont apparues, des systèmes spécifiques (Arasystem, Gent, Belgique) ont été installés sur les plantes afin d'éviter les croisements entre les différents génotypes cultivés et ont permis une récolte optimisée des graines (figure II.1). Une fois les siliques formées, les plantes ont été séchées, les graines récoltées et mises à 4°C pour leur conservation.

2.3. Culture hydroponique

Afin de contrôler finement les apports nutritionnels et la composition en fer du milieu, les plantes d'*A. thaliana* ont été cultivées en hydroponie. Pour ceci, les graines stérilisées ont été stratifiées 4 jours à 4°C à l'obscurité dans une solution nutritive complète (cf. ci-dessous) diluée au demi et contenant 0,2 % (m/v) d'agar. Les graines ont ensuite été semées sur des petits supports en plastiques (figure II.2 A) remplis de solution nutritive diluée au 10^{ème} et contenant 0,75 % (m/v) d'agar. Les supports ont été installés sur une plaque opaque placée à la surface de 1,4 L de solution nutritive (§ 1.5 de la partie annexes) (figure II.2 B). La solution nutritive, appelée Fe 25 en référence à la concentration en Fe-Na-EDTA, a été renouvelée deux fois par semaine. Suite à la germination, les racines traversent les petits supports et baignent dans la solution nutritive (figure II.2 B). Les bacs d'hydroponie ainsi préparés ont été maintenus dans une chambre de culture climatisée à raison d'un cycle de 10 heures de jour (20°C, 180 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 70 % d'humidité relative) et 14 heures de nuit (18°C, 90 % d'humidité relative). Pour maintenir une humidité importante durant les 3 premières semaines, un couvercle en

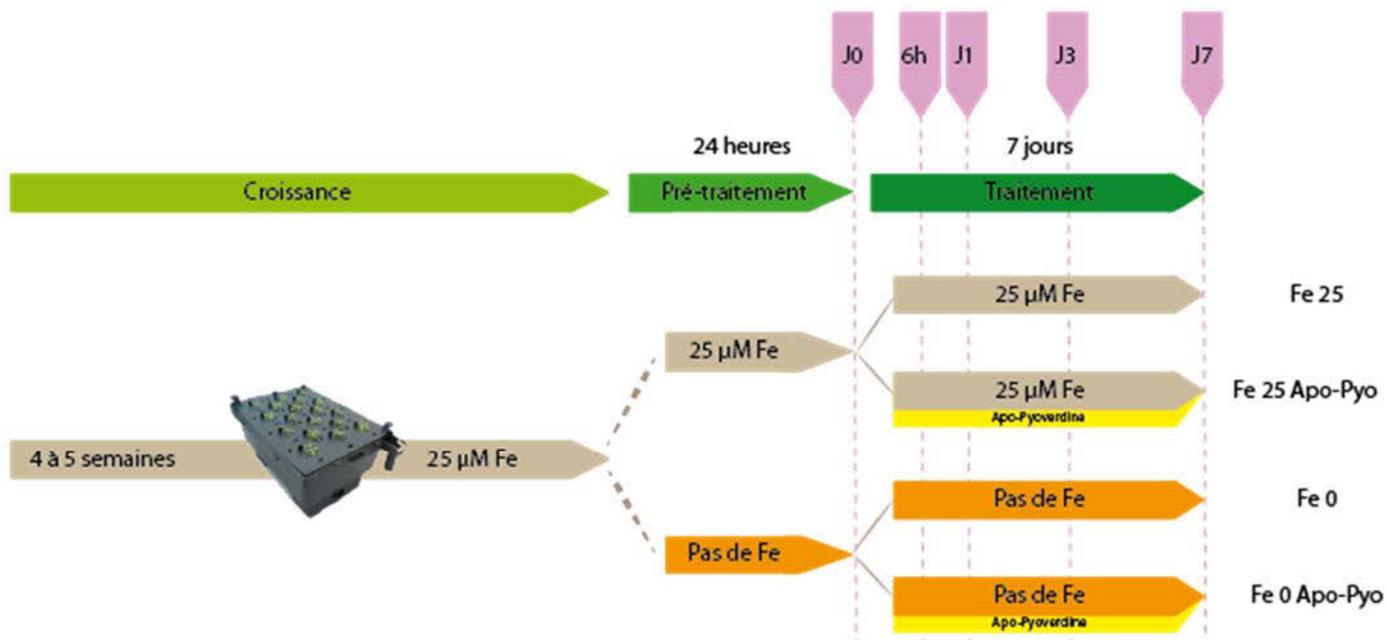


Figure II.3 : Schéma du protocole expérimental

Après 4 ou 5 semaines de croissance dans un milieu de culture complet, les plantes sont divisées en deux groupes pour un prétraitement de 24 heures en solution Fe 25 ou Fe 0.

Après le prétraitement, les plantes sont à nouveau divisées en deux groupes, le milieu est renouvelé et complété ou non de 25 µM d'apo-pyoverdine. Quatre groupes de traitements sont ainsi obtenus :

- Fe 25
- Fe 25 apo-pyo
- Fe 0
- Fe 0 apo-pyo

Les plantes sont récoltées et analysées aux différents temps : J0 (après 24h de prétraitement), 6 heures (6 h), un (J 1), trois (J 3), ou 7 jours (J 7) après traitement.

polyéthylène transparent a été placé sur les bacs de culture. Durant 25 jours, les plantes ont été cultivées sur des plaques dites « haute densité » (35 plantes/bac de culture). Le 25^{ème} jour, elles ont été transférées dans des plaques « basse densité » (18 plantes/bac de culture) dans lesquelles elles sont plus espacées pour favoriser leur développement. Quatre ou cinq semaines de culture ont été nécessaires pour que les plantes atteignent un stade phénotypique adéquat pour les différentes expériences.

3. Protocole expérimental

Après quatre semaines de culture, ou cinq pour les tests pathologiques, les plantes ont été utilisées pour les expérimentations afin d'appréhender l'incidence physiologique de l'apo-pyoverdine (apo-pyo). Ces expérimentations se divisent en deux étapes : une première phase dite de prétraitement de 24 heures permettant aux plantes de s'adapter aux différentes conditions nutritives en fer, suivie d'une seconde phase de traitement par l'apo-pyo d'une semaine (figure II.3).

De façon plus détaillée, concernant l'étape de prétraitement, les racines des plantes cultivées en hydroponie (§ 2.3 de la partie matériels et méthodes) ont été rincées quelques minutes dans une solution nutritive ne contenant pas de fer (solution Fe 0). Les plantes ont ensuite été réparties en deux groupes : un groupe a été placé dans la solution nutritive complète contenant du fer (Fe 25), le second a été placé dans la solution nutritive ne contenant pas de fer (Fe 0). Les 2 groupes de plantes ont été maintenus dans ces solutions nutritives pendant 24 h. Concernant l'étape de traitement, les plantes des deux groupes ainsi prétraitées 24 heures en milieu Fe 25 ou Fe 0 ont ensuite été divisées en deux groupes et placées dans une solution nutritive fraîche, identique à celle du prétraitement, complétée ou non avec 25 μ M de pyoverdine purifiée non chélatée au fer (apo-pyo, figure II.3). Quatre groupes de traitement ont ainsi été obtenus et désignés : Fe 25, Fe 25 apo-pyo, Fe 0, Fe 0 apo-pyo.

Lors de la phase de traitement, les plantes ont été prélevées à différents temps et leur phénotype a été analysé après une semaine. On appelle J0 les plantes ayant subi les 24 heures de prétraitement et J1, J3 et J7 les plantes ayant respectivement subi un, trois ou sept jours de traitement.

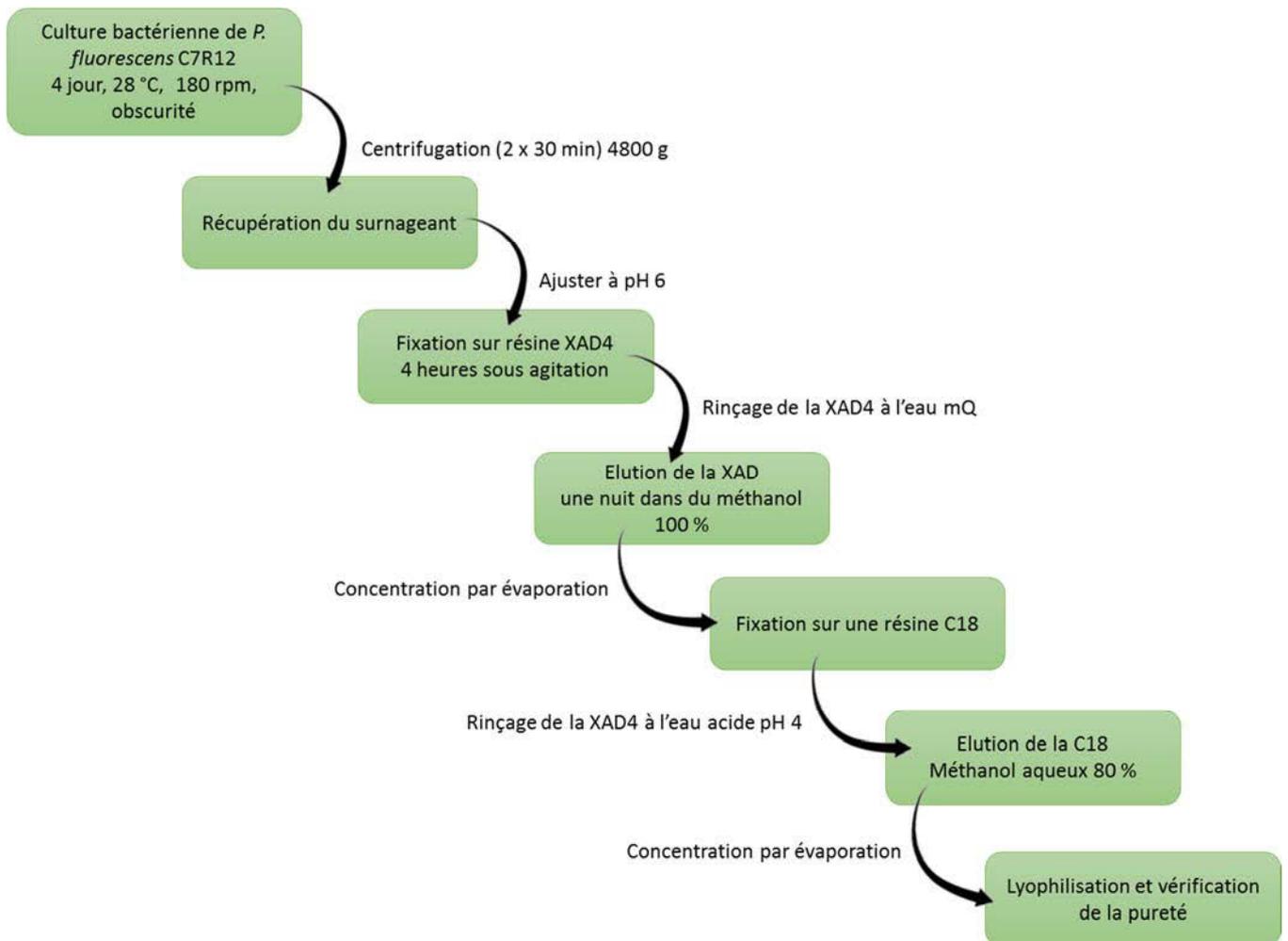


Figure II.4 : Résumé schématique de la méthode de purification de l'apo-pyoverdine

4. Méthodes

4.1. Purification de l'apo-pyoverdine

La pyoverdine utilisée pour le traitement a été purifiée au laboratoire sous forme d'apo-pyo, c'est-à-dire non chélatée au fer. Le protocole utilisé pour la purification des sidérophores a été mis au point par Gérard Vansuyt et Eric Bernaud (Shirley *et al*, 2011) sur la base de plusieurs protocoles (Meyer & Abdallah, 1978 ; Carson *et al*, 2000 ; Jacques *et al*, 2003 ; Nagata *et al*, 2013). Afin d'éliminer toute contamination par du fer, le matériel utilisé a été préalablement lavé avec une solution de HCl 0,1 M pendant 30 minutes, puis au moins 15 minutes avec de l'EDTA 5 mM. Trois rinçages avec de l'eau osmosée et un dernier rinçage à l'eau mQ ont ensuite été réalisés.

Les bactéries *P. fluorescens* C7R12 ont été cultivées sur le milieu King's B solide à 25°C pendant 48 heures puis ont ensuite été mises en pré-culture liquide dans un milieu succinate (SM) sous agitation (180 rpm) et à l'abri de la lumière pendant 24 heures à la même température. Deux millilitres de la pré-culture ont alors été utilisés pour l'inoculation de la culture (650 mL au total par Erlenmeyer de 3 L) permettant la production de l'apo-pyo. Quatre jours à 25°C sous agitation (180 rpm) et à l'abri de la lumière sont nécessaires à la production de l'apo-pyo.

Lors de la culture, l'apo-pyo est excrétée sous forme soluble dans le milieu. La première étape de purification consiste donc à clarifier le milieu de culture pour éliminer les bactéries. Deux centrifugations (4800 *g* pendant 30 minutes à 4°C) ont permis de séparer les bactéries du milieu de culture. Le surnageant a ensuite été amené à pH 6 avec du HCl 6 N. Une première séparation a alors été réalisée à l'aide d'une résine AMBERLITE™ XAD4 qui adsorbe l'apo-pyo présente dans le surnageant (Carson *et al*, 2000). La résine XAD4 est une résine absorbante de faible polarité dotée d'une structure de type styrène-divinyl-benzène. Elle présente des affinités de rétention pour les composés de faible masse moléculaire à caractère polaire, comme la pyoverdine. En pratique, la résine et le surnageant (300 mL de résine pour 3,9 L de surnageant) ont été mis en contact pendant 4 heures sous agitation. Après le rinçage de la résine à l'eau mQ, les molécules adsorbées ont été éluées avec du méthanol 100 % pendant une nuit à 4°C. Afin de concentrer ces dernières, le méthanol a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif afin d'atteindre un volume final de 2 à 3 mL.

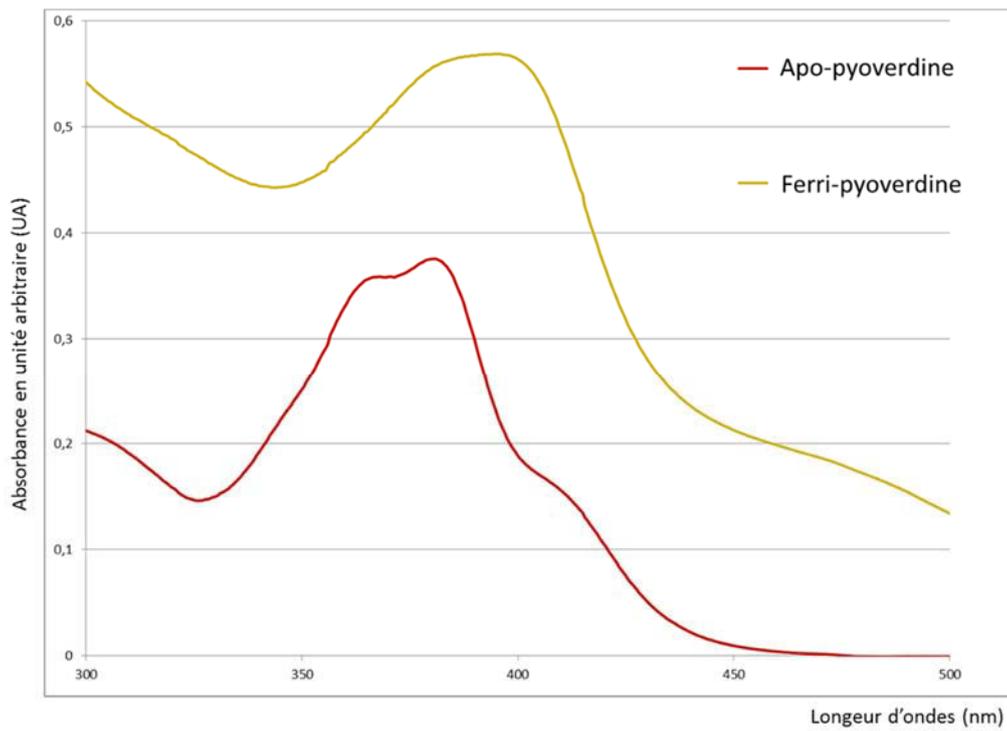


Figure II.5 : Spectres d'absorbance de l'apo-pyoverdine (rouge) et de la ferri-pyoverdine (vert-jaune)

II. Matériels et méthodes

L'apo-pyo de l'éluât ainsi obtenu a ensuite été purifiée à l'aide d'une colonne C18 préalablement rincée avec une solution d'EDTA 0,1 M (Nagata *et al*, 2013). Une fois l'apo-pyo retenue sur la colonne, celle-ci a été lavée à l'aide d'une solution aqueuse d'acide formique 1 % (v/v ; pH 4). L'apo-pyo a ensuite été éluée avec du méthanol aqueux 80 % (v/v). La fraction contenant l'apo-pyo étant colorée en jaune, elle a été récupérée en sortie de colonne dès que la coloration est apparue. L'apo-pyo a alors été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif pour atteindre un volume final d'eau/apo-pyo de 2 à 3 mL. La solution obtenue a finalement été lyophilisée afin d'obtenir l'apo-pyo sous forme de poudre. Le stock d'apo-pyo a été conservé à -20°C à l'abri de la lumière. La figure II.4 résume l'ensemble de la procédure de purification.

Le rendement de purification est de 80 à 100 mg d'apo-pyo pour 1 L de culture. La pureté, ainsi que l'absence de fer de l'apo-pyo ont été vérifiées par spectrophotométrie. L'apo-pyo est caractérisée par une coloration jaune et une fluorescence sous UV. Le spectre d'absorption de l'apo-pyo en solution à pH 4,5 présente un pic d'absorbance à 385 nm. En présence de fer, on observe une coloration marron de la solution et l'extinction de fluorescence. Le spectre d'absorption de la Fe-pyoverdine en solution à pH 4,5 présente un décalage du pic à 400 nm et une modification du spectre d'absorbance (figure II.5).

4.2. Analyse phénotypique des effets de la pyoverdine

4.2.1. Mesure de la croissance et analyse macroscopique

Les plantes ont été prélevées à différents temps, de J0 à J7 à raison de 4 plantes par condition (Fe 25, Fe 25 apo-pyo, Fe 0, Fe 0 apo-pyo ; § 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3). Pour l'analyse phénotypique, au temps J7, une plante représentative par condition a été sélectionnée et un scan de sa face inférieure et de sa face supérieure a été réalisé. A l'issue de l'expérience, les parties racinaires et aériennes ont été séparées et pesées à l'aide d'une balance de précision. Les plantes prélevées aux différents temps ont été congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

4.2.2. Dosage des chlorophylles et des anthocyanes

Les dosages ont été réalisés à partir des tissus foliaires de trois plantes cultivées et traitées dans les conditions décrites § 3 de la partie matériels et méthodes. Après prélèvement des plantes, les tissus foliaires ont immédiatement été séparés des racines, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les tissus ont ensuite été finement

II. Matériels et méthodes

broyés dans l'azote. Pour chaque condition, trois réplicats techniques ont été réalisés. Un millilitre d'acétone aqueux 80 % (v/v) pour l'extraction des chlorophylles (Arnon, 1949) ou un millilitre de méthanol HCl pour l'extraction des anthocyanes (99/1 ; v/v) (Mita *et al*, 1997 ; Teng *et al*, 2005) a été ajoutés à 20 mg de broyat puis passés au vortex avant d'être incubés 24 heures à 4°C à l'abri de la lumière. A l'issue des 24 heures, les tubes ont été centrifugés 1 minute à 2000 *g* puis l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 663 nm et 645 nm pour le dosage des chlorophylles et à 530 nm et 657 nm pour celui des anthocyanes.

Les concentrations de chlorophylles a, b et totales dans les extraits ont été déterminées à l'aide des formules déterminées par Mac-Kinney (Arnon, 1949) :

$$[C_a] = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}$$

$$[C_b] = 22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}$$

$$[C_{tot}] = 20,2 * A_{645} + 8,02 * A_{663}.$$

Ces concentrations ont ensuite été rapportées à la quantité en mg de matière fraîche initiale afin d'obtenir une concentration en $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de tissu frais.

La quantité relative d'anthocyanes par mL de solution d'extraction a été déterminée à l'aide des formules décrites par Mita *et al* (1997) et Teng *et al* (2005) :

$$[C_{antho}] = A_{530} - (0,25 * A_{657}).$$

Ces concentrations ont également été rapportées à la quantité en mg de matière fraîche initiale afin d'obtenir une concentration en unité relative. mg^{-1} de tissu frais.

4.3. Détermination de la concentration en métaux par ICP-AES (*inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*)

Le dosage du fer a été réalisé par la plateforme Welience® - Pôle Chimie Moléculaire (certifié ISO 9001v2008) de l'Université de Bourgogne (Dijon).

4.3.1. Prélèvements et préparation des échantillons

Le dosage de la teneur en fer dans les tissus a été réalisé sur les plantes cultivées et traitées comme indiqué précédemment (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3) à raison de 3 plantes par condition. Les prélèvements ont été programmés après les

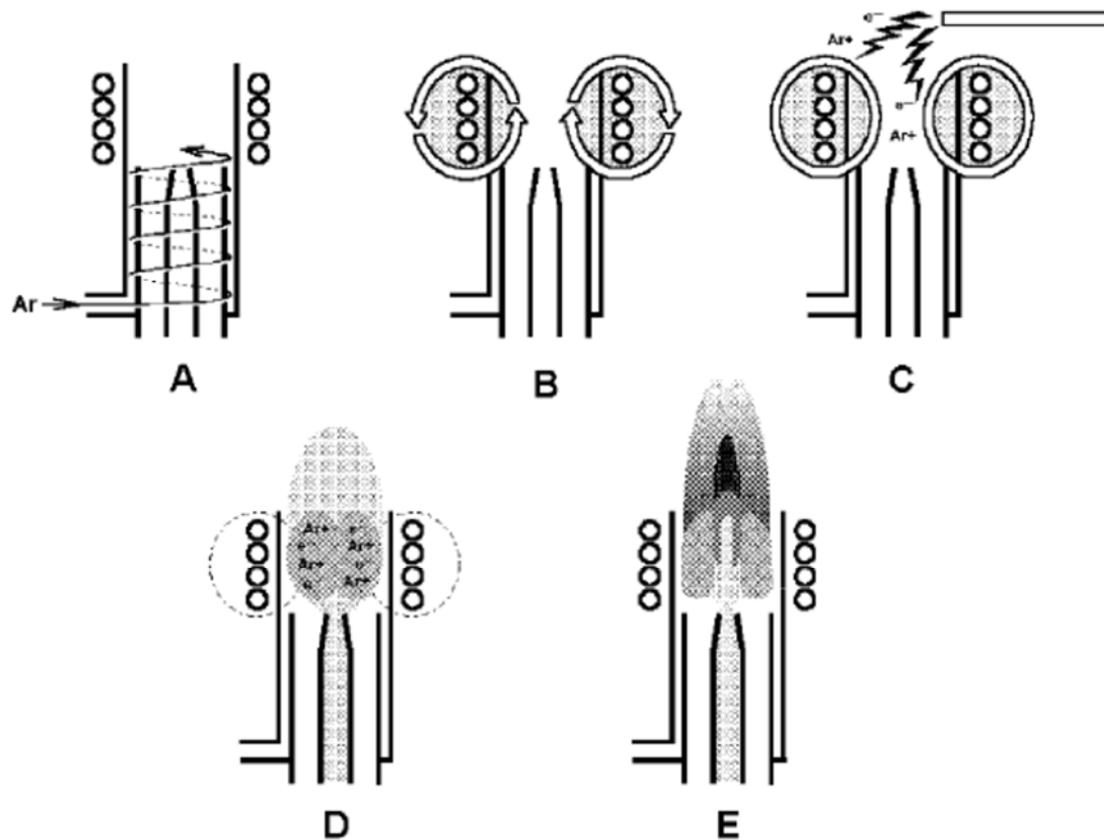


Figure II.6 : Schéma de présentation des mécanismes permettant la création du plasma d'argon dans la torche d'un ICP-AES

La création du plasma, par couplage inductif, est réalisée dans un flux d'argon dans la torche de l'ICP composé d'une série de tubes concentriques en quartz. Un flux d'argon est injecté dans les tubes les plus à l'extérieur (A). A l'extrémité de la torche une bobine d'induction est reliée à un générateur. Le passage d'un courant alternatif dans la bobine conduit à la création d'un champ électromagnétique (B). La production d'une étincelle va permettre l'excitation du gaz d'argon (C). Les électrons produits sont ensuite accélérés par le champ magnétique de la bobine, entraînant des collisions entre les atomes d'argon ainsi que leur ionisation (D). On obtient donc une production en cascade d'un grand nombre d'électrons et d'ions d'argon jusqu'à ce que le gaz soit fortement ionisé. Les collisions vont conduire à la formation d'un plasma d'argon (10 000 K) sur le haut de la torche (E).

II. Matériels et méthodes

24 heures de prétraitement (J0) et après 6 heures et 3 jours (J3) de traitement. Au moment de la récolte, les parties aériennes et racinaires ont été séparées. Les racines des plantes ont été lavées 10 minutes à l'eau mQ, deux fois 10 minutes à l'aide d'une solution de rinçage (EDTA 5 mM ; KCl 1 mM ; dithionite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 5 mM ; CaSO_4 0,5 mM ; ajustée à pH 6) et une dernière fois 10 minutes à l'eau mQ afin d'éliminer le fer et les autres éléments du milieu de culture adsorbés sur celles-ci. Les racines et les feuilles ont ensuite été séchées dans une étuve à 70°C pendant 48 heures.

4.3.2. Minéralisation des échantillons

La minéralisation des échantillons a été réalisée dans des tubes en pyrex préalablement nettoyés 3 heures dans de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M, 1 heure dans de l'EDTA 5 mM puis rincés plusieurs fois à l'eau mQ. Les échantillons biologiques séchés ont été broyés puis pesés dans les tubes en pyrex. Trois cent μL d'acide nitrique ultra-pur (67 % Normaton *for trace analysis*, VWR BDH Prolabo) ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été chauffés dans un bain de sable 1 heure à 80°C puis 1 heure à 100°C. Si la minéralisation n'était pas complète, cette première étape a été répétée. Les échantillons minéralisés ont été solubilisés dans 100 μL d'acide nitrique ultra-pur et 200 μL de H_2O_2 puis dilués dans de l'eau mQ afin d'obtenir un volume final de 10 mL.

4.3.3. Dosage par ICP-AES

L'analyse de la teneur en fer dans les échantillons foliaires et racinaires dilués dans 10 mL d'eau mQ a été réalisée par ICP-AES (Vista Pro, Varian). Cette technique est adaptée à la détection des métaux sous forme de traces avec une limite de détection variant d'un élément à l'autre du ppb à une dizaine de ppb. La technologie ICP-AES est composée de deux parties : une torche à plasma à couplage inductif (ICP) pour créer un plasma couplé à un système de détection des éléments, le spectromètre d'émission atomique ou optique (AES ou OES). Le plasma est un état atteint par la matière lors d'un chauffage à très haute température (par exemple 9726°C) ou suite à l'application d'un champ magnétique de forte intensité. Le gaz devient alors un gaz atomique chargé, c'est-à-dire un mélange d'ions et d'électrons. L'utilisation du plasma permet d'ioniser et d'exciter des molécules très efficacement. La figure II.6 résume le principe permettant la création d'un plasma d'argon dans la torche d'un appareillage ICP-AES. A la sortie du plasma, les atomes et ions retournent à leur état fondamental en émettant des photons dont la longueur d'onde leur

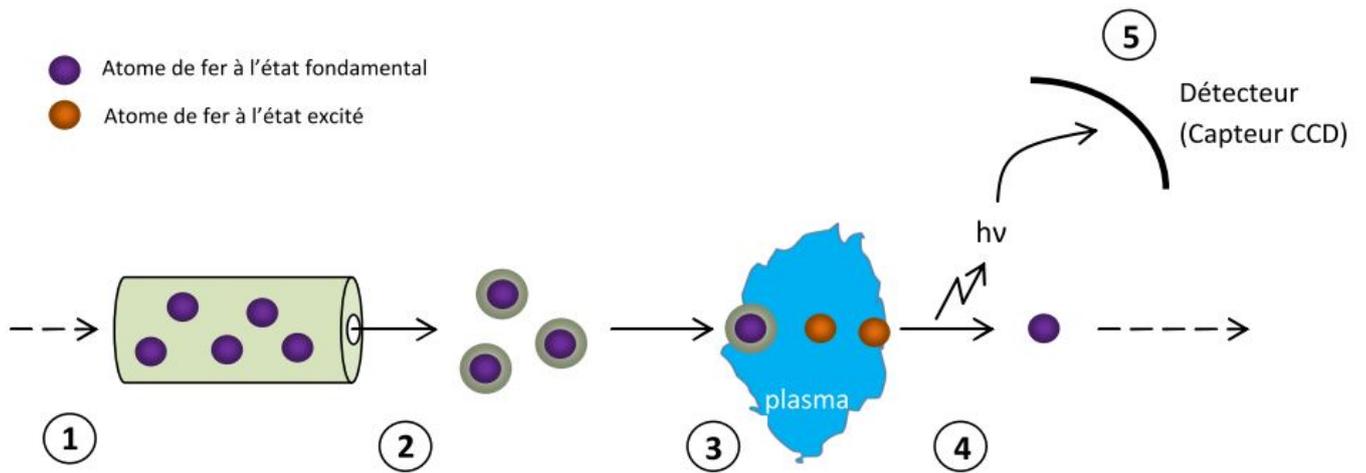


Figure II.7 : Présentation du mode de fonctionnement de l'ICP-AES (d'après thèse E. Koen, 2012)

L'échantillon à analyser est injecté sous forme liquide (1) puis est nébulisé en très fines gouttelettes (2) qui traversent un plasma. Le fer contenu dans les gouttelettes entre alors dans un état excité (3). A la sortie du plasma, les atomes de fer retournent à leur état fondamental en émettant des photons de longueurs d'ondes caractéristiques (4). Ces photons sont captés par une caméra CCD (5) puis les données transmises à un ordinateur. La quantité de lumière émise est proportionnelle à la concentration en fer de la solution. Pour plus de clarté, le schéma est simplifié et ne présente qu'un élément chimique des échantillons à doser mais la méthode permet de doser simultanément plusieurs éléments chimiques.

est caractéristique. La lumière est décomposée et transmise à un détecteur qui permet leur identification. L'intensité d'émission étant proportionnelle à la concentration de l'élément, il est possible de doser simultanément chaque élément de la solution à l'aide d'une gamme étalon. La figure II.7 décrit le principe de fonctionnement du dosage du fer par ICP-AES.

4.4. Détermination de la teneur en hormones par UPLC/MS-MS

4.4.1. Prélèvements et préparation des échantillons

La quantification des hormones a été réalisée sur des plantes cultivées et traitées comme indiqué précédemment (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3) à raison de 5 plantes par condition. Les prélèvements ont été programmés après les 24 heures de prétraitement (J0) et après 6 heures et 3 jours (J3) de traitement. Au moment de la récolte, les parties aériennes et racinaires ont été séparées puis immédiatement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

4.4.2. Extraction des hormones

Les tissus congelés ont été finement broyés dans l'azote liquide avant d'être lyophilisés. Une masse finale de 9 à 11 mg de tissus lyophilisés a été nécessaire pour l'extraction des hormones. Celle-ci a été réalisée dans un tube Eppendorf de 2 mL où les tissus lyophilisés ont été mélangés à une solution d'extraction composée d'acétone pour HPLC 80 % (v/v), d'acide acétique 1 % (v/v) et d'eau mQ 19 % (v/v). Pour chaque échantillon, 800 µL de la solution d'extraction ont été ajoutés, ainsi que 10 µL d'un mélange de standards internes ([4-²H] acide salicylique à 10 ng/µL (Olchemlm, Olomouc, Czech Republic), [5-²H] acide jasmonique à 10 ng/µL (CDN Isotopes CIL Cluzeau) Sainte Foy la Grande, France ; [4-²H] acide abscissique à 1 ng/µL (NRC-CNRC Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Canada) et [¹³C] acide indole-3-acétique à 1 ng/µL) (Cambridge Isotope Laboratory, Andover, MA). Après une minute d'agitation à l'aide d'un vortex suivie d'une minute de sonication, les tubes ont été incubés 10 minutes dans un bain agité à sec (ThermoMixer®, Eppendorf) à 10 000 rpm et à 4°C avant d'être centrifugés 10 minutes à 4°C et à 14 800 g. Le surnageant a été récupéré et 400 µL de solution d'extraction ont été à nouveau ajoutés sur le culot pour réaliser une seconde extraction en suivant le même protocole. Les deux surnageants ont alors été réunis et le solvant a été complètement évaporé à l'aide d'un évaporateur concentrateur par centrifugation sous-vide

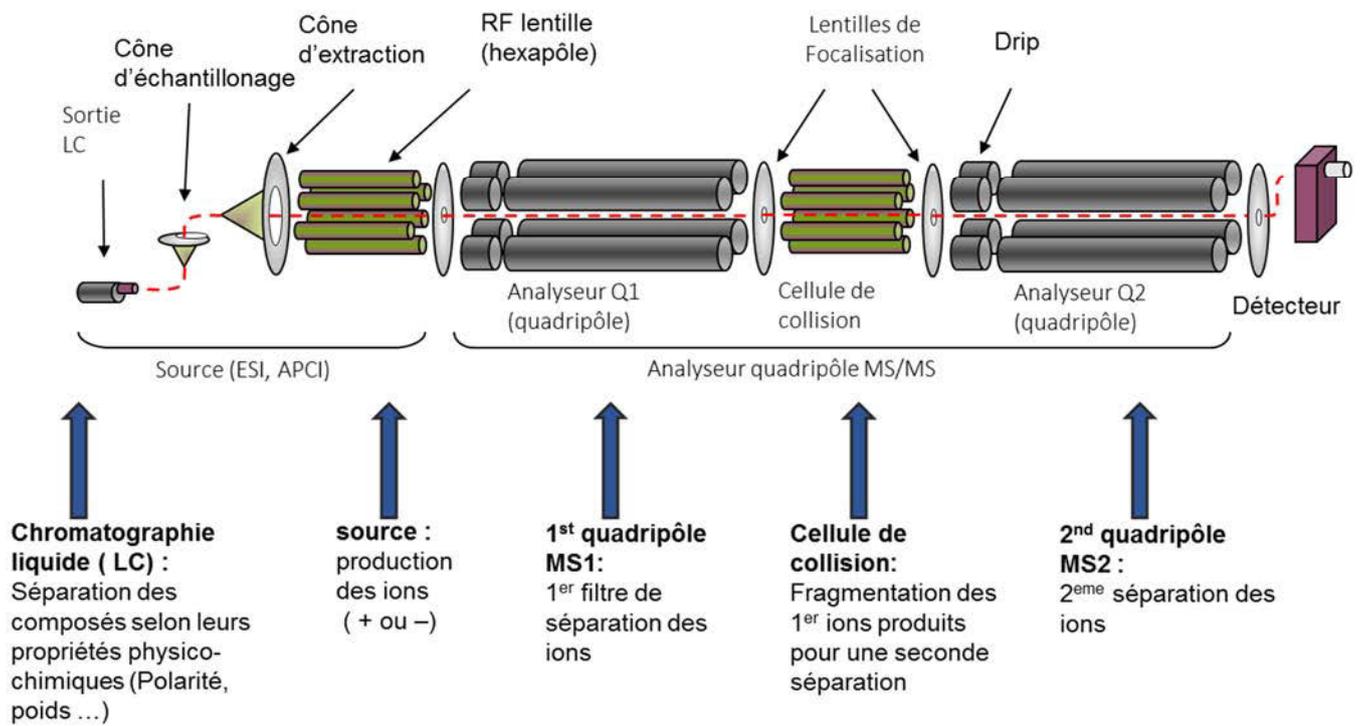


Figure II.8 : Schéma du spectromètre de masse utilisé pour le dosage des phytohormones

UPLC-MS/MS Triple quadripôle waters : Acquity-TQS (d'après une communication de Stéphanie BOUTET-MERCEY de l'IJPB)

II. Matériels et méthodes

(SpeedVac™). Les culots ont ensuite été repris dans 140 µL d'acétonitrile/eau mQ (50/50), mélangés pendant une minute, soniqués pendant une minute puis mélangés de nouveau une minute. Les solutions extraites ont été filtrées sur du papier Whatman® positionné dans une pipette pasteur sous un flux d'azote gazeux pour accélérer la filtration et récupérer l'intégralité de l'échantillon. Les échantillons ainsi obtenus ont été conservés à -20°C.

4.4.3. Analyse des échantillons par UPLC/MS-MS

Les échantillons ont ensuite été analysés par UPLC-MS/MS (UPLC-MS/MS Triple quadripôle waters : Acquity-TQS) à la Plateforme de Chimie du Végétal de l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) de Versailles. La quantification des hormones a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, les composés à analyser ont été séparés par UPLC (ultra performance liquid chromatography) en fonction de leur polarité à l'aide d'une colonne C18 fortement apolaire. La seconde étape a consisté en l'identification des masses des ions issus des hormones endogènes et des hormones du standard interne. Les hormones présentes dans le standard interne sont marquées au deutérium, leur masse est donc légèrement plus importante que les mêmes hormones non marquées. En effet l'ABAD₄ ([4-²H] acide abscissique) présente un delta de masse avec l'ABA endogène de 4 (268 g/mol au lieu de 264 g/mol). En sortie de colonne, les hormones ont été ensuite ionisées puis fragmentées (figure II.8). Les ions fragmentés ont été détectés par le spectromètre, et l'intensité de chaque pic a été enregistrée. La quantification a été réalisée par rapport au standard interne de concentration connue.

4.5. Détection de l'assimilation de la pyoverdine par la plante

4.5.1. Immunodétection de la pyoverdine par dot-Blot

Les anticorps primaires polyclonaux de lapins dirigés contre la pyoverdine de la souche C7R12 ont été produits par la société Eurogentec (Seraing, Liège, Belgique) avant mon arrivée au laboratoire (Vansuyt *et al*, 2007). Pour cela, six injections de pyoverdine purifiée couplée à une molécule de masse moléculaire élevée (*keyhole-limpet hemocyanin peptide LH*) afin d'accroître les réactions immunitaires ont été réalisées à 3 semaines d'intervalle. Les anticorps ont ensuite été purifiés au laboratoire à partir du sérum et conservés à -20°C. Afin de vérifier leur efficacité et d'optimiser leur concentration d'utilisation, des dot-blots ont été réalisés. Pour cela, des dépôts de 1 µL contenant de 0 à

II. Matériels et méthodes

2000 ng de pyoverdine purifiée ont été réalisés sur une membrane de nitrocellulose. Une fois les dépôts secs, la membrane a été saturée dans une solution de TBS (Tris-Buffer-Saline : Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 150 mM) comportant du Tween 20 0,1 % (v/v) et de la poudre de lait écrémé 5 % (m/v) pendant une heure à température ambiante et sous agitation ou pendant une nuit à 4°C également sous agitation. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire anti-pyoverdine dilué dans du TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) - lait (5 % (m/v)) à des dilutions allant de 1/5000 à 1/100. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 10 minutes avec du TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) puis incubée 1 heure à température ambiante et sous agitation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué à 1/10 000 dans du TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) - lait (5 % (m/v)). Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)), la pyoverdine a été détectée par chimioluminescence sur un film autoradiographique à l'aide du kit de détection ECL LumiGLO®.

4.5.2. Immuno-détection de la pyoverdine dans les tissus par test ELISA

Le test ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) a été réalisé sur des plantes de 4 semaines cultivées en hydroponie et traitées comme décrit précédemment (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3). Un prélèvement de 3 plantes par condition a été réalisé après 7 jours de traitement (J7). Au moment de la récolte, les parties aériennes et racinaires des plantes ont été séparées. Les racines des plantes ont été lavées comme décrit précédemment (§ 4.3.1 de la partie matériels et méthodes). Les tissus ont été congelés immédiatement dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

Les protéines totales ont été extraites à partir d'environ 30 mg de tissus à l'aide de 150 µL de la solution d'extraction suivante : Tris HCl pH 7,5 15 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, glycérol 10 % (v/v), EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM. Au moment de l'utilisation, 1 mM de PMSF ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (UltraCruz™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet) ont été ajoutés au tampon d'extraction. L'ensemble a été mélangé puis centrifugé à 14 000 *g* et à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant a été transféré dans un tube propre et centrifugé de nouveau comme précédemment pour éliminer tous les débris. La quantité de protéines extraites a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

II. Matériels et méthodes

Les protéines extraites ont ensuite été utilisées pour réaliser un test ELISA. Pour cela, ont été déposés dans une plaque 96 puits Nunc MaxiSorp® (San Diego, CA, U.S.A.) à fond plat les échantillons suivants :

- une gamme de pyoverdine purifiée allant de 10 à 100 ng,
- 10 µg de protéines racinaires,
- 10 ou 100 µg de protéines foliaires,
- deux dépôts de 100 ng de pyoverdine purifiée servant de contrôles négatifs de l'immuno-réactivité de l'anticorps primaire (- Ac I^R) et secondaire (- Ac II^R).

Des triplicats techniques ont été réalisés pour chaque dépôt. Les dépôts ont été complétés avec du TBS à raison de 100 µL final par puits et incubés pendant une nuit à 4°C sous agitation. La plaque a ensuite été lavée trois fois 5 minutes avec 200 µL de TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) puis l'étape de saturation a été réalisée avec 100 µL de TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) - lait (5 % (m/v)) pendant une heure sous agitation à température ambiante. La plaque a été vidée et 100 µL d'Ac I^R au 1/100 fraîchement préparés dans un tampon TBS-Tween 20 (0,1 % (v/v)) - lait (5 % (m/v)) ont été ajoutés et incubés une heure sous agitation à température ambiante. La plaque a ensuite été lavée 3 fois comme précédemment. L'Ac II^R anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline utilisé à 1/30 000 a été fraîchement préparé dans un tampon carbonate de sodium (Na₂CO₃ 50 mM) à pH 9,6 et 100 µL ont été ajoutés dans chaque puits et incubés une heure sous agitation à température ambiante. Trois lavages de 5 minutes avec 200 µL de TBS ont été réalisés avant l'ajout de 100 µL de substrat, à savoir le para-nitrophénylphosphate (pNPP) utilisé à 1 mg.mL⁻¹ dans un tampon de diéthanolamine à 10 %, pH 9,8, MgCl₂ 0,5 mM. L'absorbance à 405 nm a été mesurée toutes les demi-heures pendant 18 heures dans un lecteur de plaques (Molecular Devices ThermoMax Microplate Reader).

4.5.3. Détection de la pyoverdine dans les tissus par analyse de l'abondance en azote 15 (¹⁵N)

La présence de pyoverdine dans la plante a également été vérifiée par une analyse de l'enrichissement de la plante en ¹⁵N suite à un traitement par de la pyoverdine ¹⁵N. La purification de pyoverdine marquée a été réalisée comme décrit précédemment (§ 4.1 de la partie matériels et méthodes) à la différence que l'ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) a été

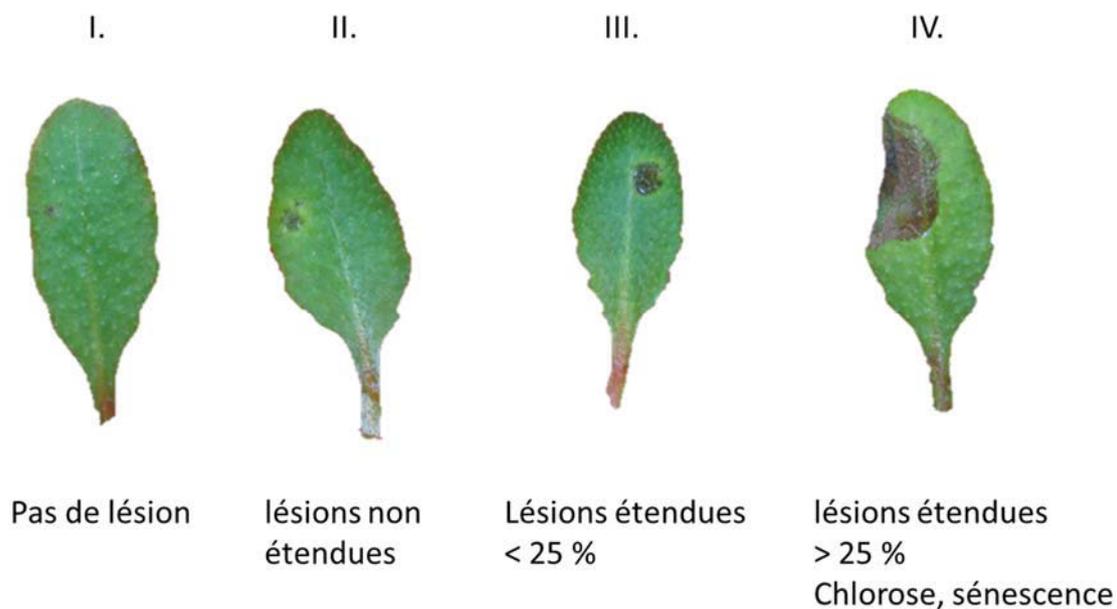


Figure II.9 : Analyse par classes des lésions causées par *Botrytis cinerea*

- I. L'infection n'a pas causé de lésion.
- II. L'infection a induit une zone de nécrose réduite qui ne peut s'étendre davantage.
- III. L'infection a induit une zone de nécrose toujours en cours d'expansion dont la surface est inférieure à 25 % de la surface de la feuille.
- IV. L'infection a induit une zone de nécrose toujours en cours d'expansion dont la surface est supérieure à 25 % de la surface de la feuille.
D'autres symptômes tels que le flétrissement de la feuille ou l'apparition d'une chlorose peuvent également être visibles.

II. Matériels et méthodes

apporté sous forme enrichie en ^{15}N à 98 % dans le milieu liquide SM. Le ^{15}N étant un isotope froid, aucune précaution supplémentaire n'est nécessaire pour les manipulations. Des plantes cultivées et traitées comme indiqué précédemment ont été utilisées (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3). Un prélèvement de 4 plantes par condition a été réalisé après 7 jours de traitement (J7). Au moment de la récolte, les parties aériennes et racinaires des plantes ont été séparées et les racines ont été rincées comme précisé ci-dessus (§ 4.3.1 de la partie matériels et méthodes). Les racines et les feuilles ont ensuite été séchées dans une étuve à 70°C pendant 48 heures puis broyées à sec à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Pour chaque échantillon, un minimum de 2 mg a été envoyé pour analyse par l'Atelier des Isotopes Stables du Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes de Montpellier.

4.6. Analyse de la résistance des plantes traitées par la pyoverdine aux microorganismes pathogènes

*4.6.1. Infection par *B. cinerea**

Pour déterminer l'impact de la pyoverdine sur la réponse d'*A. thaliana* au champignon pathogène *B. cinerea*, des plantes de 5 semaines ont été traitées ou non par la pyoverdine en condition nutritive complète ou en condition de carence en fer avant l'inoculation du pathogène (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3). Après 3 jours de traitement (J3), 5 feuilles par plante ont été infectées par *B. cinerea* via l'application sur les feuilles de 5 μL de solution de PDB $\frac{1}{4}$ (Potato Dextrose Broth 6 g/L, § 1.6 de la partie annexes) contenant $5 \cdot 10^4$ ou $2,5 \cdot 10^5$ spores/mL. Les plantes, toujours maintenues en hydroponie, ont ensuite été placées dans des mini-serres avec une humidité relative de 100 %, le couvercle transparent des mini-serres étant recouvert d'une feuille d'aluminium pour limiter la pénétration de la lumière. Les mini-serres ont été maintenues dans une chambre de culture avec un cycle de 16 heures de jour à 23°C et 8 heures de nuit à 20°C sur une étagère non allumée. Quatre jours plus tard (J7 correspondant à 4 jours post-inoculation), les feuilles infectées ont été détachées individuellement de la plante et photographiées, le calcul de l'aire des lésions a été effectué à l'aide du logiciel OPTIMAS. Le développement des lésions a été évalué soit par analyse de classes (figure II.9), soit par analyse d'images.



Figure II.10 : Echelle de scores pour l'analyse des lésions causées par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000

II. Matériels et méthodes

4.6.2. Infection par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000

Les plantes de 5 semaines utilisées pour évaluer l'incidence de la pyoverdine sur l'infection causée par *P. fluorescens syringae* pv *tomato* DC 3000 ont été cultivées et traitées par la pyoverdine comme indiqué § 4.6.1 de la partie matériels et méthodes.

La souche bactérienne est conservée sous forme de glycéro-stocks à -80°C. Une partie du glycéro-stock a été étalée sur milieu King's B agar contenant de la rifampicine (50 µg.mL⁻¹, milieu King's B-Rif) et cultivée 48 heures à 25°C. Une colonie isolée a ensuite été utilisée pour inoculer 10 mL de culture liquide King's B-Rif et l'ensemble a été incubé une nuit à 28°C sous agitation à 180 rpm. Après atteinte d'une densité optique de 0,6 (mesurée à 600 nm) par la culture bactérienne, les bactéries ont été centrifugées 10 minutes à 2 500 *g*. Le surnageant a été retiré et le culot a été rincé deux fois avec 10 mL d'eau mQ. Après la dernière centrifugation de 10 minutes à 2 500 *g*, le surnageant a été retiré et le culot repris dans une solution de MgCl₂ 10 mM de façon à obtenir une concentration de 5.10⁵ ou de 10⁶ CFU (Colony-Forming Unit)/mL.

Pour l'infection proprement dite, trois feuilles de quatre plantes par condition ont été infectées après 3 jours de traitement (J3 correspondant au jour initial de l'infection). La solution bactérienne a été infiltrée dans l'intégralité de la feuille à l'aide d'une seringue d'un mL. L'importance de l'infection a pu être évaluée par analyse de scores à différents temps déterminés à l'aide d'une échelle de sévérité des symptômes pour les infections à 10⁶ CFU/mL (figure II.10) ou par comptage bactérien pour les infections à 5.10⁵ CFU/mL. Pour le comptage, douze disques foliaires de 5 mm de diamètre découpés à l'emporte-pièce ont été broyés à sec dans un mortier. Le broyat a été récupéré et solubilisé dans 5 mL de MgCl₂ 10 mM. Des dilutions en cascade allant du broyat pur à 1.10⁻⁵ ont été réalisées et 3 dépôts de 10 µL par concentration et par condition ont été déposés sur des boîtes de pétri carrées quadrillées comportant un milieu King's B-Rif solide. Les boîtes ont été incubées pendant 3 jours à 28°C et les colonies ont été comptées.

4.7. Etude de la production de NO et de ROS en réponse à la pyoverdine

4.7.1. Mesure de la production de NO

La mesure de la production de NO en réponse à la pyoverdine a été réalisée sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana*. La détection du NO extracellulaire repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, le DAF-2 (4,5-diaminofluorescéine), selon une

II. Matériels et méthodes

méthode mise au point au laboratoire (Besson-Bard *et al*, 2008a) avec quelques modifications. Le DAF-2 réagit avec le trioxide de diazote (N_2O_3) dérivé de l'oxydation de NO pour former un dérivé triazole fluorescent, le DAF-2T (longueur d'onde d'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, longueur d'onde d'émission $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$, Kojima *et al*, 1998).

En pratique, les suspensions cellulaires maintenues dans leur milieu de culture ont été transférées dans une plaque 24 puits (Costar) à raison de 1 mL par puits. La plaque a été mise sous agitation pendant 30 minutes à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été incubées 10 min, toujours à l'obscurité, avec 5 μM finaux de DAF. Dans les puits servant de contrôle négatif, 500 μM finaux de carboxy-PTIO (cPTIO, Sigma-Aldrich), un piègeur de NO, ont également été ajoutés. Les cellules ont ensuite été traitées par 25 μM d'apo-pyo. En guise de contrôle positif, un traitement par 1 μM de flagelline 22 (peptide issu de la flagelline de *P. aeruginosa* : Pa Flg 22, ProteoGenix) a été réalisé. La production de NO a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre lecteur de plaques (Mithras, Berthold, Allemagne) avec un filtre d'excitation à 485 nm et un filtre d'émission à 535 nm. La fluorescence est exprimée en unité relative de fluorescence (URF).

4.7.2. Mesure de la production de ROS

Comme précédemment (§ 4.7.1 de la partie matériels et méthodes), la mesure de la production de ROS (*reactive oxygen species*) a été réalisée sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* directement dans le milieu de culture. La mesure des ROS a été réalisée par chimioluminescence du luminol (5-amino-2,3-dihydrophatazine-1,4-dione) en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'un catalyseur (peroxydase) selon le protocole décrit par Pugin *et al* (1997). Pour chaque traitement, 10 mL de suspensions cellulaires ont été prélevés, placés dans des erlenmeyers et équilibrés sous agitation pendant 30 minutes à 25°C. Les cellules ont ensuite été traitées par 25 μM d'apo-pyo ou 1 μM de Pa Flg 22. Aux temps 10, 20, 30, 45, 60 et 90 min, 250 μL de cellules ont été prélevés par condition et additionnés de 50 μL de luminol et de 350 μL de tampon H50 (HEPES 50 mM, D-mannitol 175 mM, K_2SO_4 0,5 mM, CaCl_2 6,6 mM, pH 8,5). La luminescence a été mesurée à l'aide d'un luminomètre (Lumat, LB9507, Berthold) et est exprimée en unité relative de luminescence (URL). L'utilisation d'une gamme étalon, réalisée à partir de 250 μL de cellules et de concentrations croissantes de H_2O_2 a permis de convertir les URL en concentrations de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de poids frais.

4.8. Analyse de l'expression des gènes en réponse à la pyoverdine

Pour déterminer l'effet de la pyoverdine sur l'expression des gènes d'*A. thaliana*, des plantes ayant été cultivées et traitées par l'apo-pyo (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3) ont été utilisées. Quatre plantes par condition ont été prélevées après les 24 heures de prétraitement (J0), 1 jour (J1), 3 jours (J3) et 7 jours (J7) de traitement. Les parties racinaires et foliaires ont été séparées et immédiatement congelées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C.

4.8.1. Extraction des ARN

Les ARN des racines et des feuilles de chaque plante ont été extraits individuellement à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System (Promega) en suivant les instructions du fournisseur. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les extractions ont été réalisées sur environ 30 mg de tissus congelés repris dans 175 µL du tampon de lyse (RNA Lysis Buffer, Promega) et broyés immédiatement avec un TissueRuptor (Qiagen). La suite du protocole a été réalisée comme précisé dans le manuel du kit. Les ARN ont finalement été repris dans un volume final de 100 µL, dosés au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) et conservés à -20°C.

4.8.2. Préparation des ARN pour l'analyse transcriptomique

Pour la réalisation de l'analyse transcriptomique et pour des contraintes de coûts, seuls les échantillons prélevés à J3 ont été analysés. Pour chaque condition et chaque expérience indépendante, les ARN issus de quatre plantes ont été mélangés, ce pool contenant *in fine* 20 µL d'ARN à 220 ng.µL⁻¹. Pour les pools d'ARN trop faiblement concentrés, une évaporation à l'aide d'un Univapo 100 h (Uniequip) a été effectuée. La qualité des ARN a été vérifiée à l'aide d'un bioanalyseur (Agilent 2100 bioanalyzer). Les RIN (*RNA integrity number*) des ARN de racines compris entre 8,5 et 9,8 et de feuilles compris entre 7 et 7,8 ont été considérés de qualité suffisante pour l'analyse transcriptomique.

4.8.3. Réalisation et analyse des données de l'étude transcriptomique

La réalisation de l'analyse transcriptomique a été effectuée à la plateforme de transcriptomique de l'équipe de Génomique Fonctionnelle d'*Arabidopsis* de l'URGV (Unité de Recherche en Génomique Végétale, INRA d'Evry).

II. Matériels et méthodes

Pour chaque condition de culture (Fe 25 ou Fe 0), les ADNc de racines et de feuilles correspondants aux traitements par l'apo-pyo ont été marqués à la Cy5 (cyanine 5 ; rouge), ceux relatifs aux contrôles correspondants (pas de traitement par l'apo-pyo) ont été marqués à la Cy3 (cyanine 3 ; vert). Pour une même condition et un même tissu, les ADNc correspondant au traitement apo-pyo et au contrôle correspondant ont ensuite été mélangés. Chaque pool d'ADNc a alors été hybridé sur une lame CATMA (*complete arabidopsis transcriptome microarray*) v6.2 (Agilent array) contenant près de 40 000 GST (*gene specific tags*) correspondant aux séquences annotées du génome nucléaire, mitochondrial et chloroplastique d'*A. thaliana*. La lame a ensuite été scannée pour enregistrer la fluorescence émise au niveau de chaque zone d'hybridation (spots). La qualité et l'intensité de la fluorescence émise permettent de déterminer et de comparer l'abondance relative des transcrits des deux échantillons d'intérêt (traitement apo-pyo *versus* contrôle pour chaque condition et chaque tissu). Pour chaque comparaison, des expériences d'inversion des fluorophores (*dye-swap*) ont été réalisées afin d'éliminer un possible biais dû aux marqueurs (Martin-Magniette *et al*, 2005).

L'analyse des résultats obtenus a également été réalisée par la plateforme de transcriptomique de l'URGV. Elle s'appuie sur le logarithme (log) en base 2 des intensités moyennes des différents pixels aux longueurs d'ondes 635 nm (rouge) et 532 nm (vert). Le ratio entre les logs obtenus aux deux longueurs d'onde correspond à l'expression différentielle entre la condition traitement par l'apo-pyo et le contrôle correspondant. Pour éliminer les biais non contrôlables, plusieurs analyses ont été réalisées. Une première correction par la normalisation de Loess a permis de corriger les biais induits par les fluorochromes (Yang *et al*, 2002). L'intensité du signal pour chaque condition a également été corrigée comme décrit par Yang & Thorne (2003). Enfin, pour identifier les gènes différentiellement exprimés, un test de Student apparié a été réalisé. Le résultat obtenu par ce premier test a ensuite été ajusté par la méthode de Bonferroni qui contrôle le FWER (*family wise error rate*), à savoir la probabilité d'avoir au moins un faux positif. Les *P*-values obtenues suite à ces différents tests ont permis d'établir une liste de gènes différentiellement exprimés suite au traitement par l'apo-pyo comparativement aux contrôles correspondants. Un FWER par la méthode de Bonferroni inférieur à 5 % est nécessaire pour qu'un gène soit considéré comme différentiellement exprimé.

Gène		Amorce sens 5'→3'	Amorce antisens 5'→3'
Gènes de référence	<i>YLS8</i>	GTCATTTATCTGGTGGACATCACT	CCGAAACAGTAAGCAAAAAC
	<i>OLI</i>	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC	GGTCCGACATACCCATGATCC
Gènes utilisés pour la validation des résultats transcriptomiques	<i>IRT1</i>	GCTTCTTTTTCGCGGTAACA	AGTTGATAGAGCGATCCCTAACG
	<i>FRO2</i>	CGATCGTTCCTTCGGTTTC	AATCCGAGCAGCGAGCAA
	<i>ORG3</i>	TGCCTCTGGCCAATCGAAGAAG	TGTA CTTCAAGCTTCGAGAAACCG
	<i>OXRED</i>	GGACACGTACGAGGGATATGGAAG	TCTGATCTTAGGAGGCTGAGATGG

Tableau II.2 : Liste des amorces utilisées pour la quantification de l'accumulation des transcrits par PCR quantitative en temps réel. La création des amorces a été réalisée sur le site : <http://www.quantprime.de/main.php?page=home>

II. Matériels et méthodes

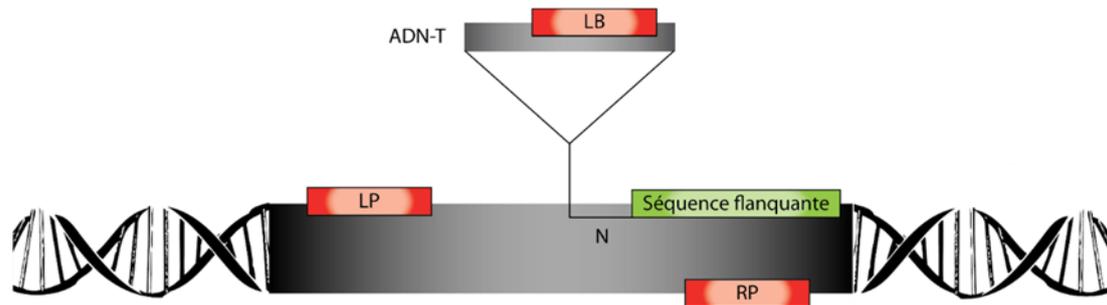
4.8.4. Synthèse d'ADNc

La quantité d'ARN utilisée pour la synthèse d'ADNc a été ajustée en fonction des tissus et de la quantité d'ARN totale obtenue suite à l'extraction. En moyenne, 50 ng d'ARN de racines et 150 ng d'ARN de feuilles ont été utilisés. La synthèse des ADNc a été réalisée à l'aide de l'enzyme ImProm II (*reverse transcriptase*, Promega) et d'un mélange d'amorces OligodT (17)-hexamères (Promega), en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADNc ont été conservés à 4°C.

4.8.5. Réaction de PCR en temps réel et quantification relative pour la validation de l'analyse transcriptomique

A partir d'une dilution au 5^{ème} des ADNc synthétisés, un mélange des différents ADNc appelé pool d'ADNc pur a été produit. Ce dernier a ensuite été dilué en cascade de 1/3 à 1/81 pour permettre la réalisation de la gamme. Les expériences de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées sur les ADNc synthétisés dilués au 20^{ème}. Le principe de la PCR quantitative en temps réel est de suivre la quantité d'ADN, ou d'amplicons, présente au cours de la réaction. Le kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) et une machine ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fischer) ont été utilisés pour réaliser ces expériences. Ce mix contient un composé (SYBRgreen) qui devient fluorescent quand il se lie à un ADN double brin. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est dépendante de la quantité d'ADNc, qui elle-même dépend de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon. L'expression des gènes d'intérêt a été évaluée par quantification relative, cette méthode nécessitant l'utilisation d'un ou de plusieurs gènes de ménage/référence qui servent de normalisateur. *YLS8 (AT5G08290)* et le gène *AT4G26410* codant une protéine conservée non caractérisée et que l'on appellera par la suite *OLI* sont deux gènes de référence dont les taux de transcrits sont particulièrement stables (Czechowski *et al*, 2005 ; Wang *et al*, 2014b). Leur stabilité dans nos conditions a été vérifiée au cours d'une expérience préliminaire. La quantification relative a été réalisée par la méthode des droites standards. Cette méthode se base sur l'utilisation de droites standards étalons obtenues à partir de dilutions successives du pool d'ADNc pour chacun des gènes testés. Le calcul de la quantité d'ADN prend en compte l'efficacité de la PCR. Le taux d'expression relative est déterminé par le rapport entre la quantité d'ADN obtenue pour le gène d'intérêt et celle obtenue pour le gène de référence.

A.



B.

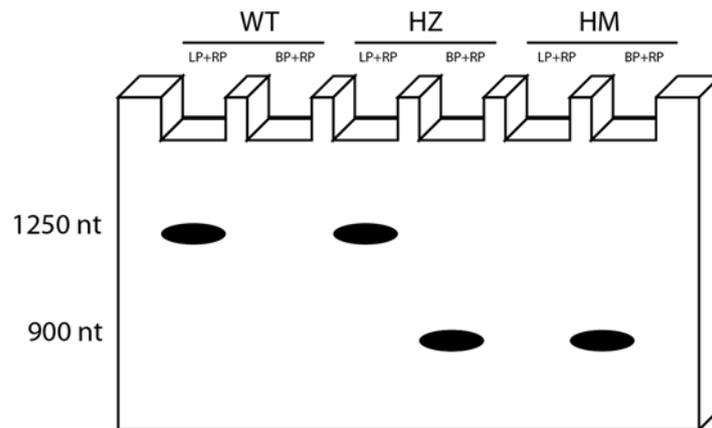


Figure II.11 : Protocole utilisé pour le criblage des mutants ADN-T et la création des amorces (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

A. Schéma présentant l'insertion de l'ADN-T dans le génome ainsi que les amorces utilisées lors du criblage.

N : Longueur en paires de bases (pb) entre le site d'insertion de l'ADN-T sur le gène et la séquence flanquante du gène (entre 0 et 300 pb)

LP : Amorce génomique gauche

RP : Amorce génomique droite

LB : Amorce flanquante gauche de l'ADN-T

B. Résultats attendus après PCR en utilisant les amorces LB, LP et RP.

WT : individu sauvage sur le gène criblé (pas d'insertion de l'ADN-T)

HZ : individu hétérozygote sur le gène criblé (insertion de l'ADN-T sur 1 des 2 chromosomes)

HM : individu homozygote mutant sur le gène criblé (insertion de l'ADN-T sur la paire de chromosomes).

II. Matériels et méthodes

Les amorces utilisées pour les gènes de références, ainsi que celles utilisées pour les gènes analysés, sont présentées dans le tableau II.2. Elles ont été dessinées à l'aide du logiciel en ligne QuantPrime (<http://www.quantprime.de/main.php?page=home>). Des expériences préliminaires pour tester leur spécificité et leur efficacité ont été réalisées.

4.9. Analyse des mutants

Différents mutants présentant une insertion ADN-T dans des gènes d'intérêt ont été commandés au NASC. Leur génotype a été vérifié.

4.9.1. Extraction rapide d'ADN génomique

Cinq à huit plantes par mutant ADN-T ont été analysées pour identifier des homozygotes. Dans ce but, une feuille par plante a été broyée directement dans un tube à l'aide d'un pilon en plastique. Le broyat a été repris dans 400 μ L de tampon d'extraction (Tris HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5 %), mélangé 5 secondes, puis centrifugé 5 minutes à 14 000 g à température ambiante. Trois cents μ L de surnageant ont ensuite été transférés dans un nouveau tube auxquels ont été ajoutés 300 μ L d'isopropanol afin de précipiter l'ADN (2 minutes à température ambiante). L'ensemble a ensuite été centrifugé 10 minutes à 14 000 g à température ambiante, le surnageant a été éliminé et le culot lavé à l'éthanol 70 %. Après 5 minutes de centrifugation à 14 000 g à température ambiante, l'éthanol 70 % a été éliminé et le culot séché avant d'être repris dans 50 μ L d'eau mQ stérile avant stockage à 4°C.

4.9.2. Criblage des mutants par PCR

Une PCR avec des amorces génomiques spécifiques du gène d'intérêt (« *Right primer* » RP et « *Left primer* » LP) permettant d'amplifier l'ADN sauvage a été réalisée. Pour les lignées sauvages ne comportant pas d'insertion d'ADN-T, cette PCR permet l'amplification d'un fragment de 1000 à 1250 nucléotides (nt). Il en est de même pour les lignées hétérozygotes (HZ, insertion de l'ADN-T dans un seul des deux allèles). Si l'insertion d'ADN-T a bien eu lieu, le fragment à amplifier par ces amorces est de taille trop importante et aucune amplification n'est possible pour les lignées homozygotes mutantes (HM, figure II.11 A). Une PCR avec l'amorce génomique RP spécifique du gène d'intérêt et une amorce spécifique de l'ADN-T (« *Left Border Primer* » LB) permet quant à elle l'amplification d'un fragment de 450 à 900 nt pour les lignées HZ et HM mais pas pour les lignées sauvages (figure II.11 B).

Gène	Nom	Nom de la lignée	Amorces	Séquences des amorces (5'→ 3')
<i>AT3G56980</i>	<i>ORG3</i>	SALK_025676C	LP	CAATCCGCATGATAAATCACC
			RP	TTGGTGGCTGCTTAACGTAAC
<i>AT2G41240</i>	<i>bHLH100 (A)</i>	SALK_074568C	LP	TCTCAATAGTCCACGTCCACC
			RP	AATGCTTGTGAAACTGTTGCC
	<i>bHLH100 (B)</i>	SALK_150637C	LP	TTGGTCGGTGTAACGAGATC
			RP	TTGTGGTAGAAAAATGTGATTGC
<i>AT5G59320</i>	<i>LTP3</i>	SALK_095248C	LP	TCGATGCATAATCAAATCGTG
			RP	GTTCAAACACAATGGCTTTCG
<i>AT3G21460</i>	<i>GLUTAREDOXINE</i>	SALK_001139C	LP	ATTTTCGAACCTCACAGTGTGG
			RP	GTGGTAGCAAGATTAGCGTCG
<i>AT5G59330</i>	<i>LTP</i>	SALK_063856	LP	AGTGGAGTTGGGTGGGTTATC
			RP	GCAAAACATTCTTTCTCGTTAGTG
<i>AT4G33790</i>	<i>CER4 (A)</i>	SALK_139557C	LP	TGCTGTTTCTGATGTGGTACG
			RP	GAGCTGGTGCTGGAAGTAGTG
	<i>CER4 (B)</i>	SALK_000575C	LP	ACGACCTTCCTTCTTTGTTG
			RP	GGACACCGATATAAATCAGCC
<i>AT1G26390</i>	<i>FAD-binding Berberine family protein</i>	SALK_083228	LP	TGTGACTTAATATAAACCGTCCC
			RP	CCCAAAGAAGGATTGGAGAAG
	<i>Lb1.3</i>		LB	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Tableau II.3 : Liste des amorces utilisées pour le criblage des mutants (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)

II. Matériels et méthodes

En pratique, les PCR ont été réalisées sur l'ADN extrait comme indiqué ci-dessus (§ 4.9.1 de la partie matériels et méthodes) et dilué au quart. Le mélange réactionnel de 15 µL est composé de : 1 µl d'ADN dilué au quart, de tampon de réaction diluée 5 fois (5X Green GoTaq® Reaction Buffer, Promega), de 200 µM de dNTP, de 333 nM de chaque amorce (LP + RP ou LB + RP) et de 0,02 U de GoTaq® DNA polymérase. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur BioRad MyCycler™ pendant 35 cycles. Cinq µL des produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose à 1 %, et analysés à l'aide d'un Gel Doc™ XR+ (BioRad) après coloration dans un bain de bromure d'éthidium (BET).

Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes (tableau II.3) ont été dessinées en utilisant le programme en ligne T-DNA Primer Design développé par SIGnAL (*SALK institute genomic analysis laboratory*, <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

4.9.3. Phénotypage des mutants

Pour étudier l'impact des mutations sélectionnées sur la réponse des plantes d'*A. thaliana* au traitement par l'apo-pyo, des plantes mutées et sauvages de 4 semaines traitées dans les conditions précédemment décrites (§ 3 de la partie matériels et méthodes, figure II.3) ont été utilisées pour réaliser une analyse phénotypique. Les plantes ont été prélevées à 7 jours de traitement (J7) afin de comparer leur développement en fonction du génotype et des différents traitements selon le protocole décrit précédemment (§ 4.2.1 de la partie matériels et méthodes).

4.10. Analyse statistique des données

Des tests ANOVA (analyse de la variance) à une variable suivis d'une comparaison multiple par la méthode de Fischer ont été réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, New York, U.S.A.). Des lettres différentes ont été attribuées aux groupes comparés si les groupes ont été identifiés comme significativement différents (P au moins inférieur à 0,05). Pour certaines expériences, des test ANOVA à deux variables (*two-way*) ont été réalisés à l'aide du logiciel en ligne VassarStats (<http://vassarstats.net/>) suivis d'une comparaison multiple par la méthode de Tukey (P au moins inférieur à 0,05).

CHAPITRE 1

Analyse de l'incidence de l'apo-pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 sur le statut en fer, l'immunité et la croissance de plantes d'*A. thaliana*

III. Analyse de l'incidence de l'apo-pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* C7R12 sur le statut en fer, l'immunité et la croissance de plantes d'*A. thaliana*

1. Contexte et principaux résultats

1.1. Contexte et objectifs de l'étude

Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'UMR Agroécologie se sont intéressés à l'incidence sur la physiologie de la plante de la pyoverdine chélatée au fer (ferri-pyo) produite par *P. fluorescens* C7R12, une bactérie PGPR (Vansuyt *et al*, 2007; Shirley *et al*, 2011). Plus précisément et comme résumé dans l'introduction (§ 6 de l'introduction), les auteurs de ces études ont rapporté que comparativement au complexe fer-EDTA, le fer chélaté à la pyoverdine est plus efficacement assimilé par des plantes d'*A. thaliana* cultivées *in vitro* dans un milieu carencé en fer. Cette meilleure assimilation s'accompagne d'une plus forte croissance des plantes et est indépendante du système d'import IRT1/FRO2 caractéristique des plantes de stratégie I. Renforçant ces données, il a en effet été démontré que la ferri-pyo est importée par les racines où elle s'accumule. La possibilité qu'elle puisse être mobile *in planta* (sous forme intègre ou non) a été confirmée par sa détection dans les tissus foliaires. En parallèle, les travaux d'autres équipes ont apporté des arguments expérimentaux suggérant que la pyoverdine de diverses souches bactériennes incluant par exemple *P. putida* WCS358 et *P. fluorescens* WCS417 déclenche une ISR chez diverses plantes hôtes et induit des événements cellulaires associés aux défenses dans des suspensions cellulaires de tabac (van Loon *et al*, 2008).

Ces travaux pionniers sont une illustration des connexions fines susceptibles de s'établir entre la régulation de l'homéostasie du fer et l'immunité des plantes. Ils suggèrent également que des pyoverdines sont capables de moduler les régulations croisées s'opérant entre ces deux processus. Un des objectifs de mon travail de thèse a été d'appréhender de façon détaillée l'incidence de la pyoverdine produite par *P. fluorescens* C7R12 sur la physiologie d'*A. thaliana* et d'étudier les mécanismes sous-jacents à ses effets. Ces travaux s'inscrivent plus généralement dans la compréhension des dialogues moléculaires s'établissant entre les bactéries bénéfiques du sol et les plantes.

III. Chapitre 1

Dans la mesure où pr pyoverdine est produite par les bactéries dans la rhizosphère sous forme non chélatée au fer (apo-pyo), il nous est apparu plus judicieux d'étudier ses effets sur *A. thaliana* sous cette forme apo-pyo. De plus, l'impact physiologique de l'apo-pyo a été analysé dans deux conditions nutritionnelles : chez des plantes cultivées dans un milieu enrichi en fer (25 μM Fe-EDTA) ou dépourvu de fer (0 μM Fe-EDTA). L'apo-pyo étant libérée dans la rhizosphère par la bactérie dans des situations de carence en fer, cette seconde condition nutritionnelle nous semblait pertinente. Enfin, précisons que les plantes ont été cultivées en hydroponie afin d'assurer un meilleur contrôle des apports nutritifs et d'assurer une plus grande efficacité des traitements par l'apo-pyo utilisée à 25 μM .

1.2. Résultats principaux

Dans un premier temps, nous avons focalisé le projet sur l'étude du phénotype de croissance des plantes d'*A. thaliana* carencées ou non en fer et exposées à un traitement par 25 μM d'apo-pyo. La pureté de cette dernière, en particulier l'absence de contamination par du fer, a été vérifiée de même que son assimilation dans la plante dans nos conditions nutritionnelles. Alors que la croissance des plantes cultivées en absence de fer s'est avérée très ralentie, l'apport d'apo-pyo dans ce même milieu a remarquablement restauré leur croissance et fortement minimisé le phénotype de carence. En revanche, l'apo-pyo n'a pas impacté la croissance des plantes cultivées dans le milieu nutritionnel enrichi en fer. Dans un deuxième temps, une approche transcriptomique a été entreprise afin de mieux cerner les processus sous-jacents aux effets de l'apo-pyo, en particulier chez les plantes carencées. Chez ces dernières, l'analyse a révélé que le traitement par l'apo-pyo s'accompagne d'une modulation de l'expression d'environ 2000 gènes, pour la plupart à expression racinaires. Plus précisément, une forte induction de l'expression des gènes codant des protéines associées à la croissance et à l'import/transport *in planta* de fer a été observée. A l'inverse, une répression de l'expression des gènes dont les protéines sont impliquées dans les défenses a été relevée. Dans un troisième temps, sur la base des données de transcriptomique, nous avons exploré l'incidence de l'apo-pyo sur le statut en fer de la plante et sur ses défenses. Pour ceci, nous avons entrepris, i) un dosage de fer dans le milieu nutritionnel, les racines et les parties aériennes des plantes, ii) une quantification du taux de certaines hormones au niveau foliaire (SA, ABA, auxine), iii) une étude de la sensibilité des plantes à *B. cinerea*,

III. Chapitre 1

iv) une étude fonctionnelle de l'impact des gènes d'intérêt identifiés dans l'approche transcriptomique. Les principaux résultats issus de ces données indiquent que la promotion de croissance induite par l'apo-pyo sur les plantes carencées en fer est strictement dépendante de l'expression d'*IRT1* et *FRO2*, suggérant que ce système d'import du fer est un acteur clé de la médiation des effets de l'apo-pyo. De plus, ils démontrent que chez ces mêmes plantes, l'apo-pyo module la balance croissance-défense en faveur de la croissance probablement *via* la modulation de l'expression des gènes *PRE1*, *IBH1* et *HBI1*.

En conclusion, nos travaux apportent un éclairage nouveau sur l'incidence de la pyoverdine chez *A. thaliana*. En particulier, ils démontrent qu'en réponse à l'apo-pyo, des régulations croisées fines s'opèrent entre les processus cellulaires associées à la croissance, l'immunité et l'homéostasie du fer.

2. Article scientifique^o1 :

***The Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens
Arabidopsis thaliana defense in favour of growth in iron deficient
conditions**

(Données complémentaires sur CD-ROM joint au manuscrit :
Figures S1 à S6 et tableaux S1 à S11)

1 **The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis***
2 ***thaliana* defense in favour of growth in iron deficient conditions**

3

4 Pauline Trapet^{1,2}, Laure Avoscan³, Agnès Klinguer^{2,3}, Stéphanie Pateyron⁴, Sylvie Citerne⁵,
5 Sylvie Mazurier³, Philippe Lemanceau³, David Wendehenne^{1,2} and Angélique Besson-
6 Bard^{1,2,*}

7

8 ¹ Univ. de Bourgogne Franche-Comté, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon,
9 France

10 ² ERL CNRS 6300, BP 86510, 21000 Dijon, France

11 ³ INRA, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

12 ⁴ POPS-Transcriptomic Platform, Institut of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR
13 9213/UMR1403, CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-
14 Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Bâtiment 630, 91405 Orsay, France

15 ⁵ INRA-AgroParisTech, UMR1318, Institut J.-P. Bourgin, Centre de Versailles-Grignon,
16 Versailles, France

17

18 **Summary of the most important findings:**

19 Pyoverdine, a high-affinity ferric iron chelator synthesized by *Pseudomonas fluorescens*,
20 impacts the growth/defense trade-off of *Arabidopsis thaliana* in iron deficiency conditions

21 **Running head:** Pyoverdine impact on plant growth/defense balance

22

23 **Corresponding author:**

24 Dr. Angélique BESSON-BARD

25 Univ. De Bourgogne Franche-Comté, UMR 1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510,
26 F-21000 Dijon, France

27 Tel: +33 (0)3 80 69 31 78

28 Email: angelique.besson-bard@dijon.inra.fr

29

30 **Research area:** Signaling and Response

31 **ABSTRACT**

32

33 Pyoverdines are siderophores synthesized by fluorescent *pseudomonas* spp. Under iron-
34 limiting conditions, these high-affinity ferric iron chelators are excreted by bacteria in the soil
35 in order to acquire iron. Previous investigations reported that pyoverdines produced by
36 beneficial *Pseudomonas* strains ameliorate plant growth. However, the underlying
37 mechanisms are poorly understood. In the present study, we investigate the physiological
38 incidence and mode of action of pyoverdine from *P. fluorescens* C7R12 on *A. thaliana* plants
39 grown under iron sufficient or iron deficient conditions. Pyoverdine was provided to the
40 culture medium in its iron free structure (apo-pyoverdine), thus mimicking a situation in
41 which it is produced by the bacterial strain. Remarkably, apo-pyoverdine abolished the iron
42 deficiency phenotype and restored the growth of plants maintained in the iron-deprived
43 medium. A microarray analysis showed that under this condition, apo-pyoverdine modulated
44 the expression of around 2000 genes. Notably, apo-pyoverdine positively regulated the
45 expression of genes related to development and iron acquisition/redistribution while it
46 repressed the expression of defense-related genes. Accordingly, the growth promoting effect
47 of apo-pyoverdine in plants grown under iron-deficient conditions was impaired in *irt1* and
48 *fro2* knock-out mutants and was prioritized over immunity as highlighted by an increased
49 susceptibility to the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. This process was accompanied by an
50 over-expression of the transcription factor *HBII*, a key node for the cross-talk between growth
51 and immunity. Collectively, this study reveals an unprecedented mode of action of pyoverdine
52 in *A. thaliana* and demonstrates that its incidence on physiological traits depends on the plant
53 iron status.

54

55 **FOOTNOTES**

56 **Financial source**

57 This work was supported by the University of Burgundy (BQR project), the Burgundy State
58 (PARI AGRALE 8 project) and the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de
59 la Technologie.

60 * Corresponding author: Angélique Besson-Bard (angelique.besson-bard@dijon.inra.fr)

61 INTRODUCTION

62

63 Iron, the fourth most abundant element in the Earth crust, is an essential micro-nutrient for
64 plant growth and development, notably through its involvement in major metabolic processes
65 such as respiration and photosynthesis (Guerinot & Yi, 1994; Robin et al., 2008). Despite its
66 abundance, iron is weakly bioavailable for organisms due to its poor solubility in soils under
67 aerobic conditions. Therefore, plants and other organisms had to evolve mechanisms to
68 efficiently assimilate iron from the soil. Bacteria, but also other microbes including fungi,
69 produce iron chelators known as siderophores (Ahmed and Holmström, 2014). Siderophores
70 are low molecular weight molecules that exhibit a high affinity for ferric iron (Fe^{3+}) and are
71 synthesized in iron-limiting conditions. For instance, fluorescent *pseudomonas* spp. produce
72 yellow-green fluorescent siderophores termed pyoverdines having a high affinity for Fe^{3+} with
73 a stability constant of ferric-pyoverdine complex showing around 10^{32} M^{-1} (Meyer &
74 Abdallah, 1978; Albrecht-Gary et al., 1994). Once excreted, siderophores chelate ferric iron
75 and are transported back as ferric-siderophore complexes inside the bacterial cell where ferric
76 iron is released from the siderophore and further reduced to ferrous iron (Fe^{2+}) (Chu et al.,
77 2010).

78 Higher plants evolved two main strategies to incorporate iron (Curie and Briat, 2003). Grasses
79 plants use a strategy similar to the bacterial one, based on the release of phytosiderophores
80 (PS, strategy II). Non grass plants, like *Arabidopsis thaliana*, use the strategy I based on soil
81 acidification through proton excretion by H^+ -ATPases, solubilisation of Fe^{3+} and reduction of
82 the Fe^{3+} -chelate mainly by the ferric chelate reductase FRO2. Fe^{2+} ions, which are more
83 soluble than Fe^{3+} , are subsequently taken up by root transporters including IRT1 (Iron-
84 Regulated Transporter 1). Once in the plants, iron has to be transported, utilized or
85 sequestered because of its high reactivity and toxicity through the Fenton reaction. *IRT1* and
86 *FRO2* expression is induced under iron limiting conditions and the transcription factor FIT1 is
87 required for a proper regulation of the iron uptake system in *A. thaliana* (Colangelo &
88 Guerinot, 2004). FIT1 does not act alone to orchestrate the iron deficiency response. Indeed,
89 several studies highlighted the role of other bHLH transcription factors on the expression of
90 genes involved in the adaption to iron deficiency stress. These transcription factors were
91 shown to act together with FIT1 such as bHLH38 and bHLH39 (Yuan et al., 2008), or alone
92 as reported for POPEYE (PYE), bHLH100 and bHLH101 (Long et al., 2010; Sivitz et al.,
93 2012). Besides the FRO2/IRT1 system, Fe-efficient plants also respond to Fe deficiency by

94 enhancing the root secretion of coumarin compounds improving plant iron nutrition (Fourcroy
95 et al., 2014).

96 Because iron is central for many metabolic processes and not easily available, it is the focus
97 of serious competition between organisms. In mammals, there are several examples in which
98 the virulence of infectious bacteria has been correlated to their ability to assimilate host iron
99 through their siderophores (Saha et al., 2013). In turn, the host fights back and develops
100 strategies to avoid iron capture by bacteria, highlighting cross-regulatory interactions between
101 iron homeostasis and immune responses (Ong et al., 2006; Nairz et al., 2014). Similar
102 processes seem to operate in plants. For example, the production of siderophores by the
103 pathogenic enterobacteria *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*
104 pv. *tabaci* was shown to facilitate infection in their hosts, pointing out their role as virulence
105 factors (reviewed in Franza & Expert, 2013). Consecutively, plants establish a strategy for
106 keeping iron which consists in lowering iron availability by overexpressing iron-chelating
107 proteins, notably ferritins, and in improving iron acquisition through IRT1 (Dellagi et al.,
108 2005 and 2009). As highlighted in animals, this iron retention strategy used by plants to
109 combat infections could be a key component of their immune responses. Supporting this
110 concept, treatment of plant tissues or cell suspensions by bacterial siderophores was reported
111 to trigger defense responses in tobacco and *A. thaliana* (van Loon et al., 2008; Aznar et al.,
112 2014).

113 On the other hand, siderophores secretion by bacteria is not always associated to
114 pathogenicity and, in contrary, is even beneficial for plant health. In particular, different soil
115 pseudomonad strains, commonly called Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), were
116 shown to suppress soilborne diseases (Haas et al., 2005; Weller et al., 2007). Their biocontrol
117 activities have been correlated to their capacity to release siderophores which act as
118 competitors reducing the iron availability for plant pathogens including for instance *Fusarium*
119 *oxysporum* and *Pythium ultimum* (Lemanceau et al., 1992, 1993; Duijff et al., 1999; Bakker et
120 al., 2007; Van Wees et al., 2008; Ahmed and Holmström, 2014). Importantly, siderophores
121 produced by other bacterial species such as *Bacillus subtilis* also display biocontrol activities
122 (See for instance Yu et al., 2011). Beside their ability to compete with soil pathogens for iron,
123 siderophores produced by plant beneficial rhizobacteria were also shown to protect plants by
124 eliciting induced systemic resistance (ISR). Investigations on tobacco cell suspensions
125 indicated that the pyoverdine siderophores from the *P. putida* WCS358 and *P. fluorescens*
126 WCS417 strains, which elicit ISR in different plant species, are perceived by cells and
127 mediate defense-related early signaling events (Van Loon et al., 2008). However, these

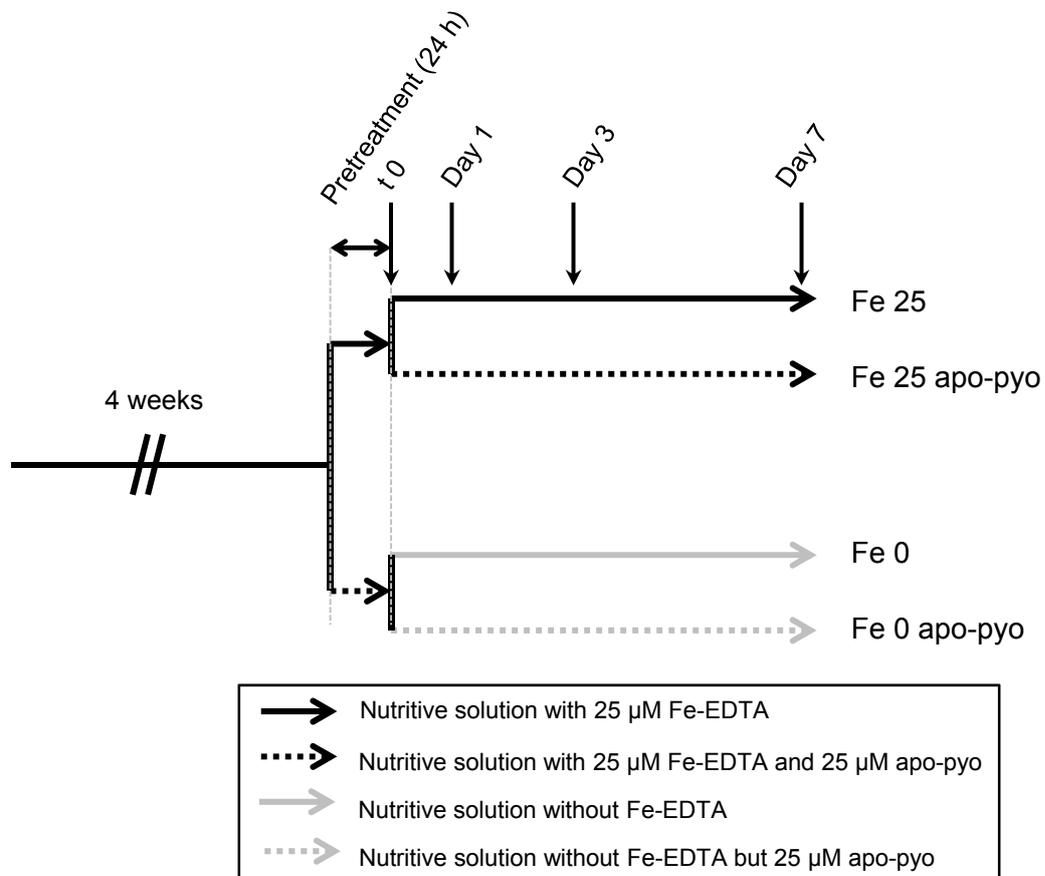


Figure 1. Experimental design.

After 4 weeks of hydroponic culture in the nutritive solution containing 25 μ M Fe-EDTA, plants were subjected to 24 h pre-treatment in iron-sufficient (nutritive solution with 25 μ M Fe-EDTA) or iron-deficient medium (nutritive solution without Fe-EDTA). Then, plants were treated for 7 days with 25 μ M apo-pyoverdine in iron-sufficient (Fe 25 apo-pyo) or iron-deficient medium (Fe 0 apo-pyo). As controls, plants were cultivated in iron-sufficient (Fe 25) or iron-deficient medium (Fe 0) without apo-pyo.

128 defense-related reactions were poorly correlated to the ability of the siderophores of interest to
129 promote ISR. Therefore how siderophores promote ISR remains poorly understood.

130 In addition to their protective function, siderophores produced by PGPR were shown to
131 enhance plant growth, probably by providing the plants with nutrients. Of particular interest
132 here, Vansuyt et al. (2007) provided evidence that in its iron-chelated structure, pyoverdine
133 from *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 is assimilated by roots of *A. thaliana* plantlets
134 grown *in vitro*. This process was accompanied by an improvement of plant growth and
135 chlorophyll content. This study also revealed that iron chelated to pyoverdine was
136 incorporated in a more efficient way than chelated to EDTA. The mechanism by which
137 siderophores enhance iron nutrition is little known. It has been proposed that microbial ferric-
138 siderophore could be reduced to release ferrous iron once transported in the apoplast of root
139 cells, thus providing substrate for the iron transport system (Ahmed and Holmström, 2014).
140 Also, ferric-siderophore could provide iron to plant phyto-siderophores (Crowley, 2006). In
141 the case of pyoverdine, Vansuyt et al. (2007) provided another explanation by showing that,
142 in *A. thaliana*, pyoverdine is incorporated by plant roots and accumulates in shoots.
143 Interestingly, this incorporation did not rely on the strategy I iron acquisition system. Taken
144 together, these observations underline the importance of pyoverdine in plant-microbe
145 interactions but call for further studies to better understand mechanisms involved.

146 In the present study, we further deciphered the mode of action of pyoverdine in plants. For
147 this purpose, we investigated the incidences of pyoverdine from *P. fluorescens* C7R12 on the
148 growth and defense capacities of *A. thaliana* plantlets grown in iron sufficient or in iron
149 deficient medium. Pyoverdine was provided to the culture medium in its iron free structure
150 (apo-pyo), thus mimicking a situation in which it is produced by the bacterial strain. We
151 observed that while apo-pyo displayed a remarkable growth promoting effects on plants
152 facing iron deficiency, it clearly impaired their resistance against *Botrytis cinerea*. Analysis of
153 the underlying mechanisms showed that the apo-siderophore triggered a strong up-regulation
154 of genes related to development and iron uptake/redistribution *in planta*. Accordingly, the
155 growth promoting effects of apo-pyo was shown to rely on *IRT1* and *FRO2* expression.
156 Furthermore, we provide evidence that in plants exposed to iron deficiency, the apo-
157 siderophore modulates the expression of genes controlling the trade-off between growth and
158 immunity in favour of growth. Collectively, data from our work describe an unexpected mode
159 of action of pyoverdine in *A. thaliana* plants grown in iron deficiency.

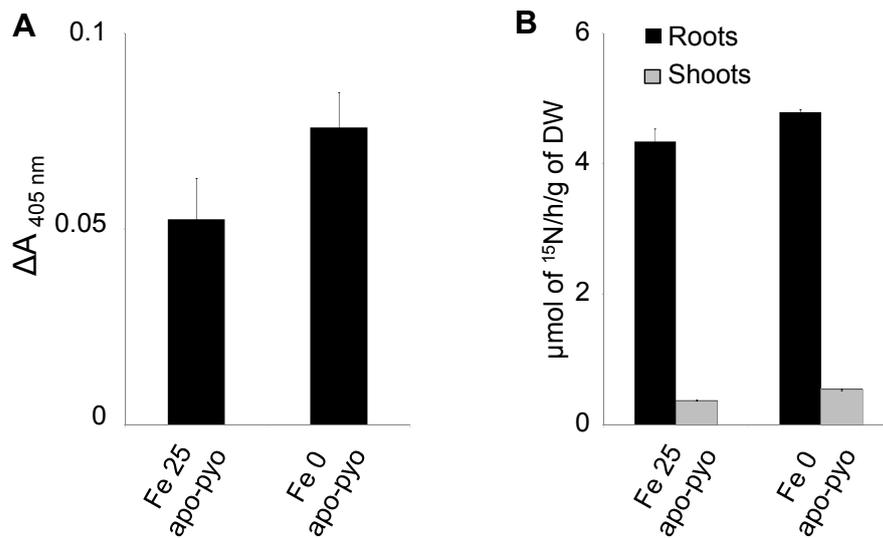


Figure 2. Detection of apo-pyo in *A. thaliana* tissues.

Plants were cultivated and treated by apo-pyo as indicated in Fig. 1.

A. Apo-pyo was detected in roots by ELISA using rabbit polyclonal anti-pyoverdine antibodies. Signal was expressed after deduction of the $A_{405 \text{ nm}}$ value of tissues without apo-pyo. Each value represents the mean \pm SE of three measurements. Experiments were repeated three times with similar results.

B. ^{15}N -apo-pyo was detected using isotope ratio mass spectrometry in roots and in shoots. Each value represents the mean \pm SE of three measurements. Experiments were repeated three times with similar results. DW: dry weight.

160 RESULTS

161

162 1. Impact of apo-pyoverdine on *A. thaliana* phenotype

163 Four week-old plants were subjected to apo-pyo treatment in iron-deficient or iron-sufficient
164 medium as described in Fig. 1. For this purpose, after 4 weeks of hydroponic culture in a
165 classical nutrient solution containing 25 μM Fe-EDTA, plants were subjected to 24 h pre-
166 treatment in iron-sufficient (nutritive solution with 25 μM Fe-EDTA) or iron-deficient
167 medium (nutritive solution without Fe-EDTA). Then, each resulting batch was separated in
168 two new batches containing fresh nutritive solution with or without 25 μM apo-pyo so as to
169 obtain four different treatments: 25 μM apo-pyo in iron-sufficient (Fe 25 apo-pyo) or in iron-
170 deficient medium (Fe 0 apo-pyo) and the corresponding controls without apo-pyo (referenced
171 Fe 25 or Fe 0 according to the presence or absence of Fe-EDTA, respectively). Importantly,
172 we measured the iron content of the culture media 6 h after apo-pyo addition (see below, Fig
173 6A). The corresponding data showed that apo-pyo addition did not result in iron enrichment in
174 the medium, thus proving that the siderophore was purified in its iron-free structure and was
175 not contaminated by ferri-pyo.

176 First, we checked that in our experimental conditions apo-pyo was efficiently assimilated by
177 plants and potentially transported from roots to shoots. The presence of pyoverdine in root
178 tissue was investigated by ELISA using rabbit polyclonal anti-pyoverdine antibodies. An
179 increase of absorbance in root extracts of Fe 25 apo-pyo- and Fe 0 apo-pyo-treated plants
180 relative to their respective controls (Fe 25- and Fe 0-treated plants) was detected (Fig. 2A). In
181 shoots, we were not able to discriminate a positive signal from the background (not shown).
182 To strengthen the data, the presence of apo-pyo in plant tissues was further analyzed by
183 isotope ratio mass spectrometry. Following the treatment of plants by ^{15}N -apo-pyo,
184 approximately 4.5 μmol of ^{15}N per hour per g of dry weight was measured in the roots of Fe
185 25 apo-pyo- and Fe 0 apo-pyo-treated plants, thus confirming the results from the ELISA
186 assays. In addition, a lower signal (0.37 and 0.54 μmol of $^{15}\text{N}/\text{h/g}$ of DW for Fe 25 apo-pyo-
187 and Fe 0 apo-pyo treatments respectively) was also measured in the shoots (Fig. 2B). These
188 data also showed that the concentration of apo-pyo assimilated by plants did not differ
189 according to the concentration of iron in the culture medium.

190 Next, the impact of apo-pyo treatment on the plants macroscopic phenotype was evaluated
191 (Fig. 3). Fe 25- and Fe 25 apo-pyo-treated plants appeared bigger and greener as compared to
192 plants facing iron deficiency. As expected, plants facing Fe 0 treatment were severely affected
193 after 7 days of culture: they showed a reduced growth and their leaf abaxial sides displayed a

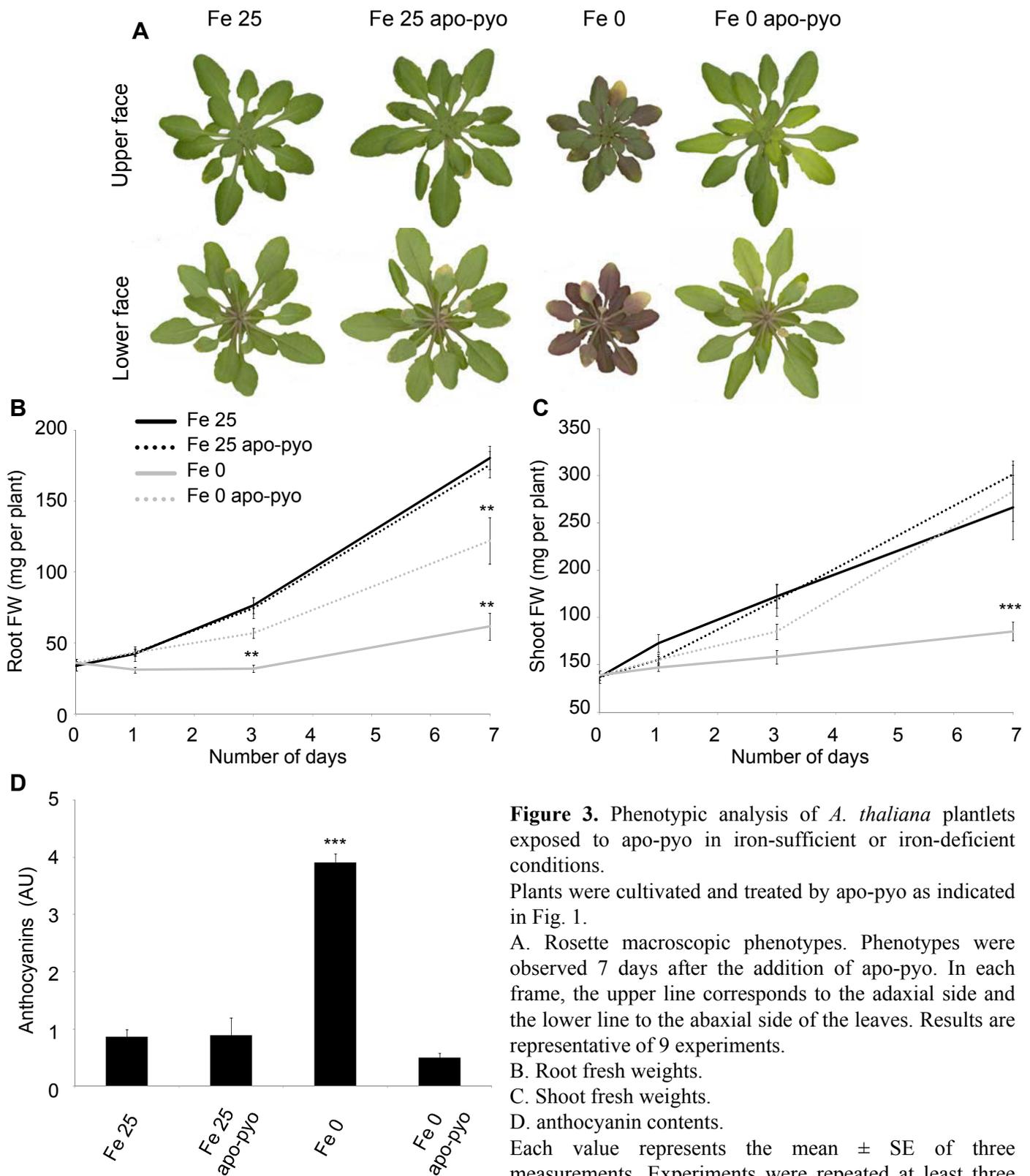


Figure 3. Phenotypic analysis of *A. thaliana* plantlets exposed to apo-pyo in iron-sufficient or iron-deficient conditions.

Plants were cultivated and treated by apo-pyo as indicated in Fig. 1.

A. Rosette macroscopic phenotypes. Phenotypes were observed 7 days after the addition of apo-pyo. In each frame, the upper line corresponds to the adaxial side and the lower line to the abaxial side of the leaves. Results are representative of 9 experiments.

B. Root fresh weights.

C. Shoot fresh weights.

D. anthocyanin contents.

Each value represents the mean \pm SE of three measurements. Experiments were repeated at least three times with similar results. Significant differences between the treatments were determined by one-way ANOVA/LSD method (** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$). FW: fresh weight. AU: arbitrary unit.

194 violet pigmentation probably due to anthocyanin production (Fig. 3A). In comparison to Fe 0-
195 treated plants, Fe 0 apo-pyo-treated plants exhibited a distinct phenotype which resembled
196 those of plants grown in iron-containing medium. Indeed, after 7 days of treatment with apo-
197 pyo, their growth was considerably higher. Quantitatively, their root masses were in between
198 those of Fe 25/Fe 25 apo-pyo and Fe 0 treated plants (Fig. 3B) and growth of their aerial parts
199 was similar to those of Fe 25 plants (Fig. 3C). Furthermore, although we noticed a yellowing
200 of several leaves, Fe 0 apo-pyo-treated plants did not show violet pigmentation as compared
201 to Fe 0-treated plants (Fig. 3A). Supporting this observation, the high production of
202 anthocyanins measured in Fe 0 plants was not observed in Fe 0 apo-pyo-treated plants which,
203 in contrast, displayed an anthocyanins level similar to those of Fe 25- and Fe 25 apo-pyo-
204 treated plants (Fig. 3D).

205 Collectively, these data indicate that apo-pyo is assimilated by *A. thaliana* plants grown in
206 hydroponic conditions and highlight a growth-promoting effect of the apo-siderophore in
207 plants facing iron deficiency.

208

209 **2. Transcriptomic analysis of apo-pyo-treated plants**

210 We initiated a transcriptomic analysis in order to provide a first and overall view of how apo-
211 pyo impacts the growth of plants. For this purpose, a microarray analysis using CATMA
212 arrays covering the entire transcriptome of *A. thaliana* was performed from roots and shoots
213 of plants 3 days after the addition of apo-pyo in the nutritive medium containing (Fe 25 apo-
214 pyo condition) or not (Fe 0 pyo condition) iron. This time point was chosen on the basis of
215 Fig. 3B and 3C demonstrating that the increase of growth of the Fe 0 apo-pyo plants was
216 noticeable from 3 days. Changes in root and shoot gene expression were determined by
217 comparing the transcriptomes of apo-pyo-treated plants with their respective controls non-
218 treated with the apo-siderophore (that is Fe 25 apo-pyo *versus* Fe 25; Fe 0 apo-pyo *versus* Fe
219 0).

220 We first selected genes whose expression was modulated by a log 2 ratio $\geq + 1.5$ or $\leq - 1.5$
221 (with adjusted p-value ≤ 0.05). This analysis revealed that 2109 genes displayed significant
222 differential expression in response to apo-pyo (Fig. 4A, listed in Tables S1 to S4). The
223 incidence of apo-pyo on gene expression clearly differed according to the tissue and the
224 presence or not of iron in the culture medium. Indeed, apo-pyo modulated the expression of
225 2053 genes in iron-depleted medium (Fig. 4B) *versus* 136 genes in iron-containing medium
226 (Fig. 4C). Furthermore, 1837 genes showed a modified expression in the roots (Fig. 4D)
227 *versus* 361 in the shoots (Fig. 4E). Regarding the percentages of induced/repressed genes,

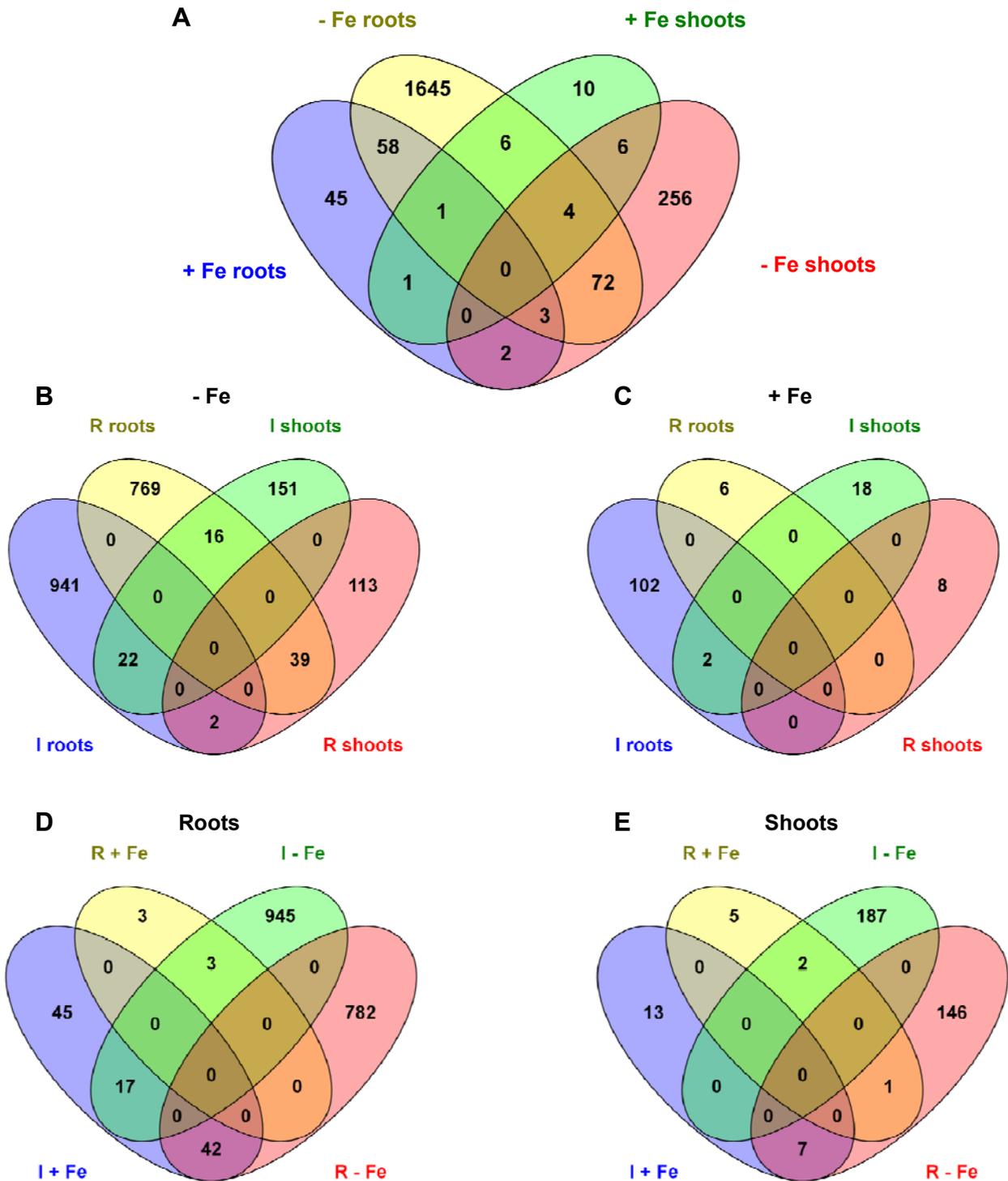


Figure 4. Venn diagrams illustrating the transcriptome changes in response to apo-pyo in iron-deficient (- Fe) or iron-sufficient (+ Fe) medium in roots or in shoots (\log_2 ratio $\geq +1.5$ or ≤ -1.5 ; p -value ≤ 0.05).

A. General view of the number of genes commonly regulated between the four comparisons.

B. Focus on the number of genes induced (I) or repressed (R) in the iron-deficient medium.

C. Focus on the number of genes induced (I) or repressed (R) in the iron-sufficient medium.

D. Focus on the number of genes induced (I) or repressed (R) in the roots.

E. Focus on the number of genes induced (I) or repressed (R) in the shoots.

Diagrams were generated using <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

228 apo-pyo-induced genes represent 55 to 56 % of the total apo-pyo-modulated genes when
229 considering the roots (Fig. 4D), the shoots (Fig. 4E) or the Fe 0 condition (Fig. 4B). In
230 contrast, in plants grown in the Fe 25 medium, 90 % of the genes were induced in response to
231 the apo-pyo treatment (Fig. 4C).

232 A closer analysis indicate that 79 of the apo-pyo-dependent genes (genes numbered 1 to 79,
233 Table S5) could be gathered in a first cluster corresponding to genes modulated under iron
234 deficiency in both roots and shoots. Amongst these genes, 22 (28 %) and 39 (49 %) were
235 induced or repressed in both tissues, respectively (Fig. 4B). A second cluster includes 63
236 genes (genes numbered 2, 62, 75 and 80 to 138, Table S5) modulated in roots in iron deficient
237 and iron sufficient media. Amongst this category, 45 (71 %) were inversely regulated
238 according to the presence or absence of iron in the culture medium. The third cluster groups
239 10 shoot genes (genes numbered 49, 60, 61, 71 and 139 to 144, Table S5) which showed
240 differential expression in iron sufficient and iron deficient medium, 9 of them being inversely
241 modulated in the two conditions. Therefore, a large part of the genes modulated by apo-pyo in
242 roots and shoots of plants cultivated in iron deficient condition were similarly regulated. On
243 the contrary, a majority of the apo-pyo-dependent genes modulated in both iron sufficient and
244 in iron deficient conditions were regulated in the opposite way. Using AmiGO
245 (http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term_enrichment), we identified these genes
246 as mainly responsive to stress or to stimulus.

247 Next, we focused our analysis on the genes whose expression was highly induced (91 and 15
248 genes in roots and shoots, respectively) or highly repressed (94 and 8 genes in roots and
249 shoots, respectively) by apo-pyo in the iron deficient condition (\log_2 ratio $\geq +3$ or ≤ -3 ; p-
250 value ≤ 0.05). This choice was made based on the phenotypic analysis showing that apo-pyo
251 deeply improved the growth of plants facing iron deficiency (Fig. 3). Genes were putatively
252 assigned to functional categories based on the Gene Ontology Annotations from the TAIR
253 database (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>; Fig 5). Concerning the genes
254 whose expression was induced by apo-pyo, an over-representation of genes related to
255 developmental processes (11.7 % compared to 6.2 % in the whole genome) and, in particular,
256 to cell differentiation was observed (Fig. 5A). These genes include for example the α -
257 expansins 7 (*AT1G12560*) and 18 (*AT1G62980*), the glycosyl hydrolase 9C1 (*AT1G48930*),
258 the cellulose synthase like 5 (*AT4G15290*), the β -galactosidase 6 (*AT5G63800*) and CER4
259 (*AT4G33790*) which encodes an alcohol-forming fatty acyl-CoA reductase involved in
260 cuticular wax biosynthesis. Moreover, this analysis revealed a predominance of genes
261 involved in transport when comparing to the whole genome categorization (15.6 % compared

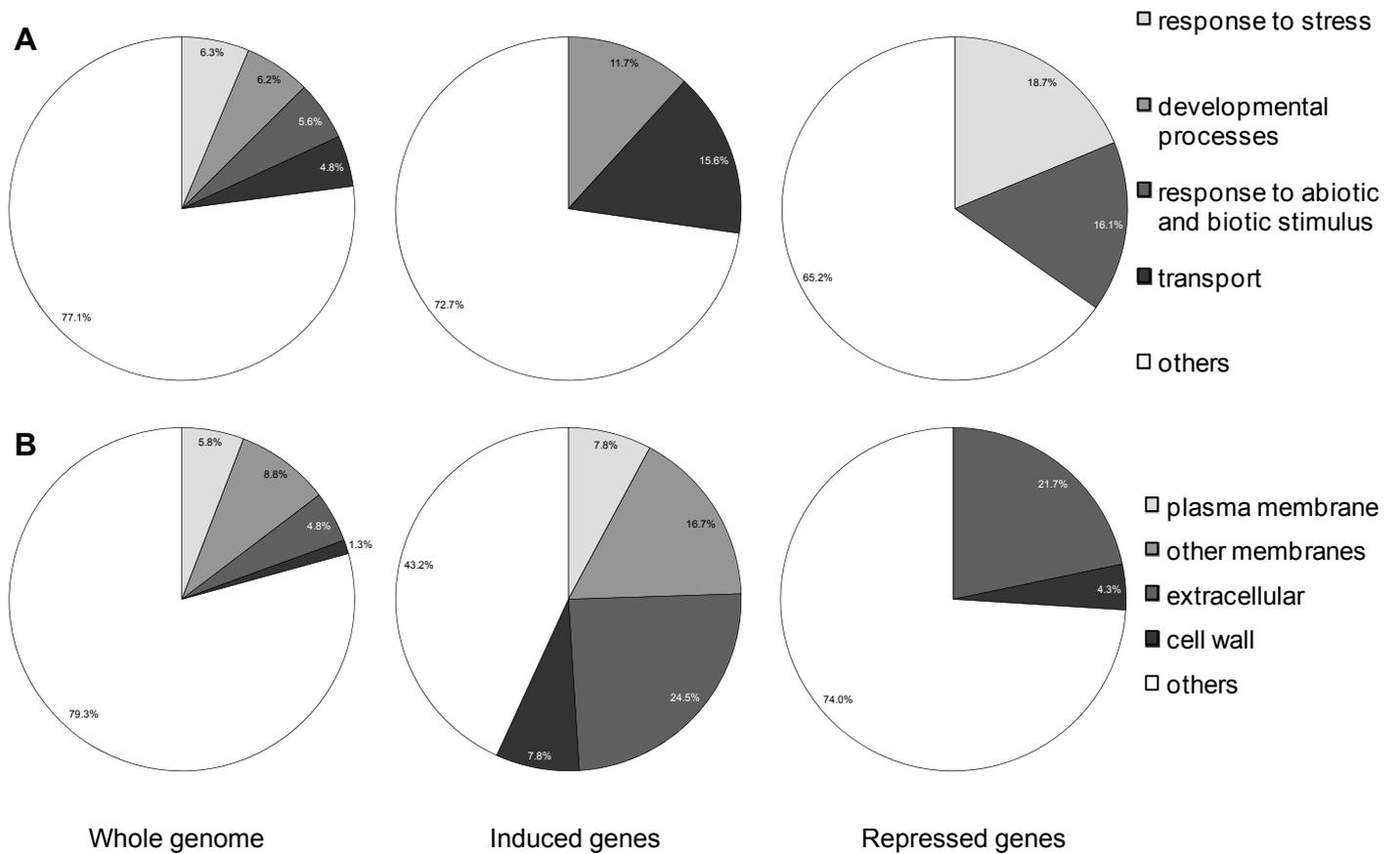


Figure 5. Over-represented functional categories of induced and repressed genes relative to the whole genome by annotation for Gene Ontology (GO).

A. GO Biological process.

B. GO cellular component.

Induced or repressed genes referred as genes whose expression was highly modulated (\log_2 ratio $\geq +3$ or ≤ -3 ; p -value ≤ 0.05) by apo-pyo in iron-deficient medium in roots and in shoots ($-Fe$ root and $-Fe$ shoot).

262 to 4.8 % in the whole genome). Accordingly, genes up-regulated by apo-pyo encode proteins
263 preponderantly located in the plasma membrane, in endomembranes, in the cell wall and also
264 extracellular proteins (Fig. 5B). These four cellular component categories represent 56.8 % of
265 the genes induced by apo-pyo while they represent only 20.6 % of the whole genome.
266 Importantly, this category includes genes related to iron transport including *IRT1*
267 (*AT4G19690*) and *IRT2* (*AT4G19680*; Table S6). Strengthening this data, other genes
268 encoding proteins involved in iron homeostasis were also identified as up-regulated by apo-
269 pyo in roots facing iron deficiency (Table S6). Amongst these, *FRO2* (*AT1G01580*) and the
270 transcription factor *bHLH39* (also named *ORG3*; *AT3G56980*) belonged to the most induced
271 genes. Another transcription factor, *bHLH100* (*AT2G41240*), was highly induced in roots and
272 in shoots. Although to a lower extent, *NAS4* encoding nicotianamine synthase 4, was also
273 found as being up-regulated. We recently showed that the corresponding protein, which
274 catalyses the synthesis of the iron chelator/*in planta* transporter nicotianamine, plays a key
275 function in the plant response to iron deficiency (Koen et al., 2014). To check the microarray
276 data, we tested the level of accumulation of four transcripts among the most modulated by
277 apo-pyo in iron deficiency medium by RT-qPCR. The results presented in Fig. S1 were in
278 agreement with the CATMA transcriptomic data. In particular, we noticed a major induction
279 of *bHLH39* and *AT2G38240* (encoding a 2-oxoglutarate and Fe²⁺-dependent oxygenase
280 superfamily protein) in the shoots and of *FRO2*, *bHLH39* and *IRT1* in the roots in response to
281 apo-pyo.

282 Regarding the genes whose expression was deeply repressed by apo-pyo in roots and shoots
283 of plants grown in iron deficient condition, an over-representation of genes involved in stress
284 response (18.7 % compared to 6.3 % in the whole genome) and to abiotic or biotic stimulus
285 (16.1 % compared to 5.6 % in the whole genome; Fig. 5A) was observed. For instance, we
286 identified the lipid transfer protein *LTP3* (*AT5G59320*) that is predicted to encode a
287 pathogenesis-related protein (Table S7). As described for up-regulated genes, down-regulated
288 genes encoding extracellular proteins (21.7 % versus 4.8 % in the whole genome) and
289 proteins located in the cell wall (4.3 % versus 1.3 % in the whole genome) were well
290 represented compared to the data of the whole genome (Fig. 5B). It should be also specified
291 that *AtFER1*, encoding FERRITIN 1 involved in iron sequestration, was found to be strongly
292 down-regulated in roots of iron-deprived plants (Tables S6 and S7). This data further supports
293 the assumption that apo-pyo impacts the iron homeostasis of plants grown in iron deficient
294 condition.

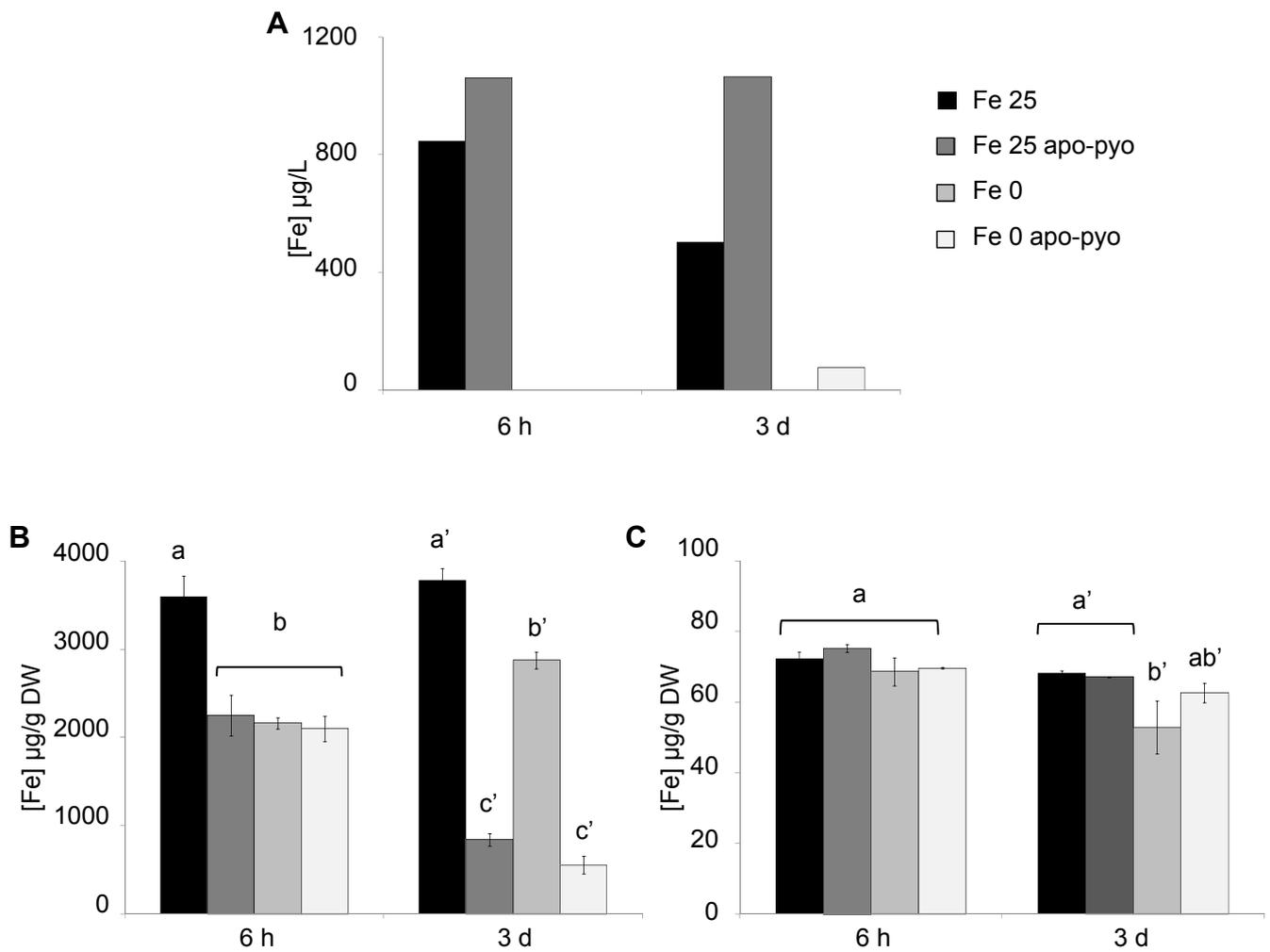


Figure 6. Iron concentrations measured in the nutritive medium and tissues 6 h and 3 days (3 d) after apo-pyo treatment in iron-sufficient or iron-deficient medium.

A. Iron concentrations measured in the nutritive medium.

B. Root iron contents.

C. Shoot iron contents.

Values are the means of 3 measurements \pm SE from 3 independent experiments. Significant differences between the concentrations of iron for each time point were determined by one-way ANOVA/LSD method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.001$ for B and $P < 0.05$ for C).

DW: dry weight.

295 The functional categorization of the root genes that expression was strongly modulated by
296 apo-pyo treatment (\log_2 ratio $\geq +3$ or ≤ -3 ; p-value ≤ 0.05) in plants grown in iron deficient
297 condition was further assessed using AmiGO and Mapman program. This analysis clearly
298 confirmed an incidence of apo-pyo in the expression of genes involved in development and
299 biotic stresses (Fig. S2A). The genes gathered in the biotic stress category encode proteins
300 playing roles in hormone signaling, in cell wall dynamic and in signaling processes (Fig.
301 S2B). To complete this investigation, we performed a more systemic analysis by including
302 root genes regulated by apo-pyo to a lower extent (\log_2 ratio $\geq +1.5$ or ≤ -1.5 ; p-value \leq
303 0.05) in plant facing iron-deficiency. We noticed a repression of genes encoding resistance
304 genes (R genes), transcription factors ERF, WRKY and MYB, salicylic acid (SA)-related
305 genes (such as *AT5G24210* belonging to the lipase class 3 family protein) and abscisic acid
306 (ABA)-related genes (such as the Lipid Transfer Protein *LTP3*) (Fig. S2C and Table S7). The
307 observation that genes related to the SA and ABA pathways were repressed prompted us to
308 compare our transcriptomic data to those recorded for hormone perturbations in
309 Genevestigator. The on-line analysis revealed that many of the root genes modulated by apo-
310 pyo in iron deficient condition were inversely expressed in *A. thaliana* exposed to SA or ABA
311 (Fig. S3). These data reinforce the possibility that apo-pyo might repress the SA/ABA
312 pathways. We also compared our transcriptomic signature to microarray analyses searching
313 for genes modulated in response to elicitors and biotic stresses. This comparison highlighted
314 that most of the apo-pyo-modulated root genes of plants facing iron deficiency were regulated
315 in an opposite way than in response to *Phytophthora parasitica*, *Sclerotinia sclerotiorum* and
316 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Fig. S4). These results support the hypothesis that
317 apo-pyo could display biological properties related to plant defence responses.

318 Collectively, the transcriptomic analysis revealed that apo-pyo treatment of plants facing iron
319 deficiency impacted the expression of numerous genes. Notably, apo-pyo positively regulated
320 the expression of genes related to development and iron acquisition (uptake/transport). On the
321 opposite, several genes encoding proteins involved in iron sequestration (ferritin) but also in
322 the plant response to biotic stresses were repressed.

323

324 **3. Perturbations of iron homeostasis induced by apo-pyo**

325 The impact of apo-pyo on the expression level of genes related to iron homeostasis led us to
326 investigate its impact on the plant iron content in our different conditions (see Fig. 1 for the
327 experimental design), 6 h and 3 days after the addition of apo-pyo.

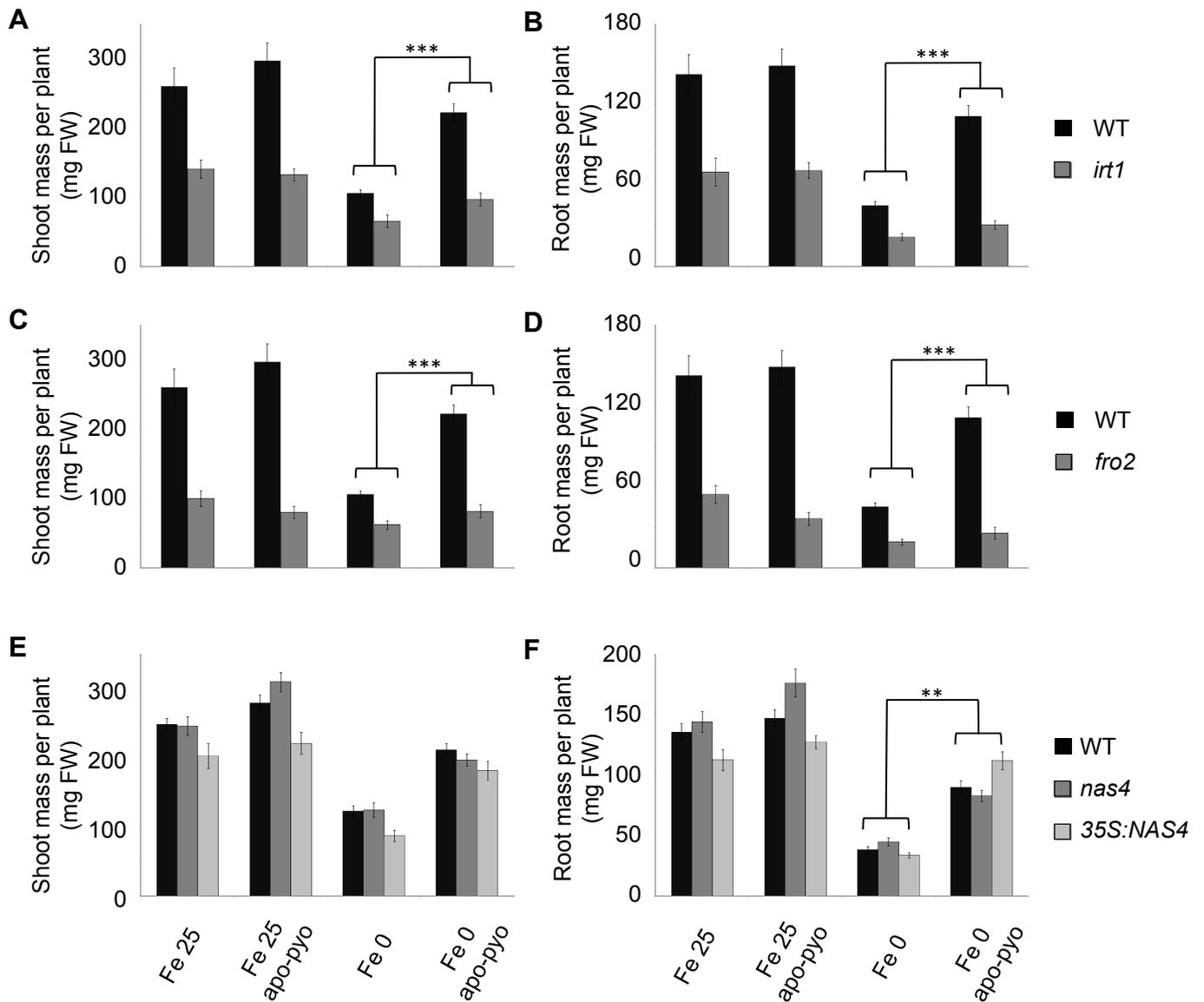


Figure 7. Growth phenotypes of mutants impaired in genes involved in iron homeostasis in response to apo-pyo in iron sufficient or in iron deficient medium.

Plants were treated as described in Fig. 1.

A, C and E. Fresh shoot masses measured in WT and *irt1* (A), *fro2* (C), *nas4* and *35S:NAS4* (E).

B, D and F. Fresh root masses measured in WT and *irt1* (B), *fro2* (D), *nas4* and *35S:NAS4* (F).

Each value represents the mean \pm SE of almost 12 measurements from almost 3 independent biological experiments. Significant differences between the shoot and root masses of WT and of the mutants in response to apo-pyo and/or iron deficiency were determined by two-way ANOVA/Tukey's HSD method (** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$). FW: fresh weight.

328 First, we measured the iron content in the nutritive medium. In the Fe 25 medium, a decrease
329 of the iron content occurred between 6 h and 3 days after the treatment, indicating that plants
330 imported part of the iron present in the medium. When apo-pyo was added in the same
331 medium, the concentration of iron did not decrease with time (Fig. 6A). The measurement of
332 iron contents in roots further supported these data (Fig. 6B). Indeed, compared to the Fe 25
333 treatment, the addition of apo-pyo in the medium containing 25 μ M of iron (Fe 25 apo-pyo
334 condition) strongly reduced the root iron concentration at 6 h and 3 days (Fig. 6B). In
335 contrast, the iron content in roots of plants grown in the Fe 25 μ M condition without apo-pyo
336 remained almost constant over time. As expected, this first set of data indicates that apo-pyo
337 negatively impacts the dynamic of iron import from the medium by plant roots, probably by
338 direct chelation of iron in the medium. Accordingly, the expression of *IRT1* and *FRO2* were
339 repressed 3 days after the addition of apo-pyo in the iron containing medium (Table S6). The
340 comparison of the Fe 0 and Fe 0 apo-pyo conditions was also relevant. In the absence of apo-
341 pyo, the level of iron at 6 h in the roots of Fe 0-treated plants was reduced compared to Fe 25-
342 treated plants (Fig. 6B). Therefore, it is likely that plants already perceived the lack of iron in
343 the medium. In comparison, the addition of apo-pyo did not further alter the root iron content
344 of plants grown in the iron deficient condition. In contrast, at day 3, whereas the iron content
345 of the Fe 0 plants was almost similar to that measured at 6 h, Fe 0 apo-pyo-treated plants
346 showed a strong reduction in the iron content. Taken as a whole, these results indicate that the
347 addition of apo-pyo in the culture medium containing or missing iron triggered a reduction of
348 the root iron content.

349 Completing this analysis, the iron content in shoots was also measured (Fig. 6C). Six hours
350 after the treatments, the iron content was similar in all conditions. After 3 days, while the apo-
351 pyo treatments induced a strong reduction of the root iron content in culture media containing
352 or not iron (Fig. 6B), the same treatments did not impact the iron concentration in shoots (Fig
353 6C). In contrast, the iron content in shoots of plants grown in medium lacking iron without
354 apo-pyo (Fe 0 treatment) slightly but significantly decreased.

355 To further investigate the incidence of apo-pyo treatment on iron homeostasis, we performed
356 a functional analysis of 6 key iron-related genes found to be modulated by apo-pyo: *IRT1*,
357 *FRO2*, *FER1*, *NAS4*, *bHLH100* and *bHLH39/ORG3*. As already discussed, with the exception
358 of *FER1* which was repressed, the expression of these genes was up-regulated in the roots in
359 the Fe 0 apo-pyo condition. Furthermore, *FRO2* and *IRT1* expressions were down-regulated
360 in the Fe 25 apo-pyo condition (see above, Table S6). We therefore studied whether
361 corresponding mutants could be affected in their response to apo-pyo in iron-deficient or iron-

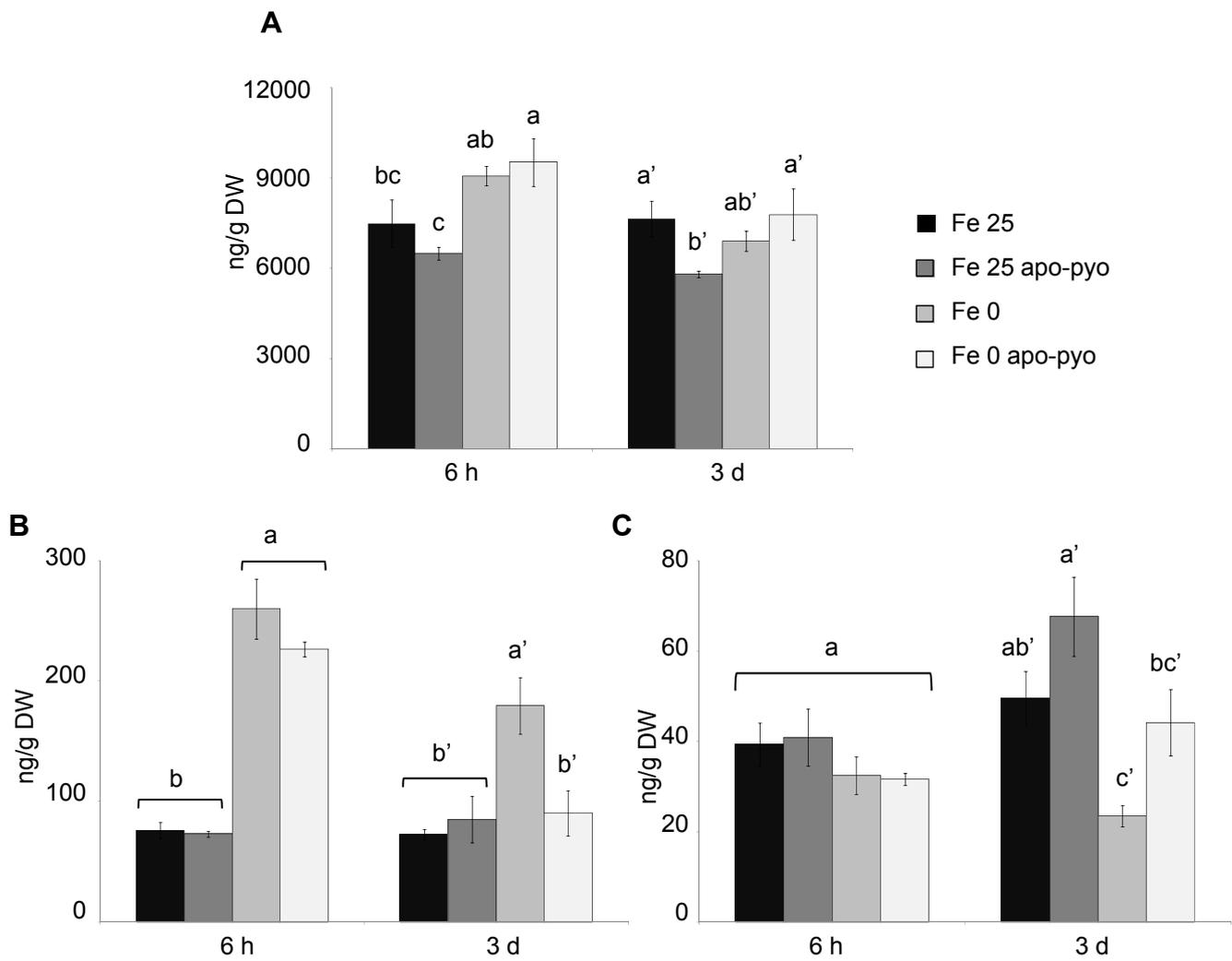


Figure 8. Analysis of hormone contents in the shoots 6 h and 3 days (3 d) after apo-pyo treatment in iron-sufficient or iron-deficient medium.

A. SA contents.

B. ABA contents.

C. IAA contents.

Values are the means of 4 measurements \pm SE from 4 independent experiments. Significant differences between the concentrations of hormones for each time point were determined by one-way ANOVA/LSD method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.05$ for A and C, $P < 0.01$ for B).

362 sufficient media by measuring their shoot and root masses as described in Fig. 3B and 3C.
363 The response to apo-pyo was not modified in the *bhlh100* and *bhlh39/org3* mutants as well as
364 in the *FER1* overexpressor (*ov. fer.*) whatever the iron content in the culture medium (Fig.
365 S5A to S5D). In contrast, compared to wild-type (WT), the *irt1* and *fro2* KO mutants showed
366 an impaired response to apo-pyo in iron deficient medium in shoots (Fig. 7A and 7C) and in
367 roots (Fig. 7B and 7D). Indeed, the growth-promoting effect triggered by apo-pyo in WT was
368 strongly reduced in both mutants in this culture condition, highlighting the involvement of
369 IRT1 and FRO2 in this process. Regarding NAS4, whereas the KO *nas4* mutant did not
370 showed a modified response to apo-pyo as compared to WT (Fig. 7E and 7F), the growth
371 promoting effect of the siderophore was significantly more pronounced in roots of plants
372 overexpressing *NAS4* (*35S:NAS4*) grown in iron deficiency (Fig. 7F). Similarly to WT plants,
373 apo-pyo treatment did not affect the shoot and the root masses of all the mutants and
374 overexpressors tested when grown in iron-sufficient conditions. Collectively, these data
375 highlight an involvement of *IRT1*, *FRO2* and, to a lower extent, of *NAS4* in the growth effect
376 of apo-pyo in plants exposed to iron deficiency.

377

378 **4. Incidence of apo-pyo in SA, ABA and IAA synthesis/accumulation**

379 The finding that apo-pyo modulated the expression of genes related to SA and ABA
380 signalings and increased the growth of plants in medium deprived of iron prompted us to
381 analyse the concentration of several hormones in our distinct conditions, namely SA, ABA
382 and indole-3-acetic acid (IAA, the major endogenous auxin). Hormone measurements were
383 performed on shoots 6 h and 3 days after apo-pyo treatment (see Fig. 1 for the experimental
384 design).

385 In plants grown in iron-containing medium, at 3 days, we only measured a slight decrease of
386 SA content by apo-pyo (Fe 25 apo-pyo *versus* Fe 25) (Fig. 8A). Concerning ABA, iron
387 deficiency induced a clear increase of its concentration at 6 h and 3 days (Fe 0 condition
388 *versus* Fe 25 condition) (Fig. 8B). At 6 h, the addition of apo-pyo did not influence the ABA
389 content in iron containing or missing culture media. However, after 3 days, the higher level of
390 ABA measured in the shoots of plants grown in iron deficient conditions (Fe 0) was not
391 observed anymore in plants grown in the same medium but supplied with apo-pyo (Fe 0 apo-
392 pyo). In this latter condition, the shoot concentration of ABA was similar than those found in
393 the shoots of Fe 25- and Fe 25 apo-pyo-treated plants. Therefore, apo-pyo appeared to
394 negatively impact ABA synthesis/accumulation in iron deficient condition at 3 days, the time
395 point where apo-pyo begins to rescue the growth of plants facing this deficiency (see Fig. 3).

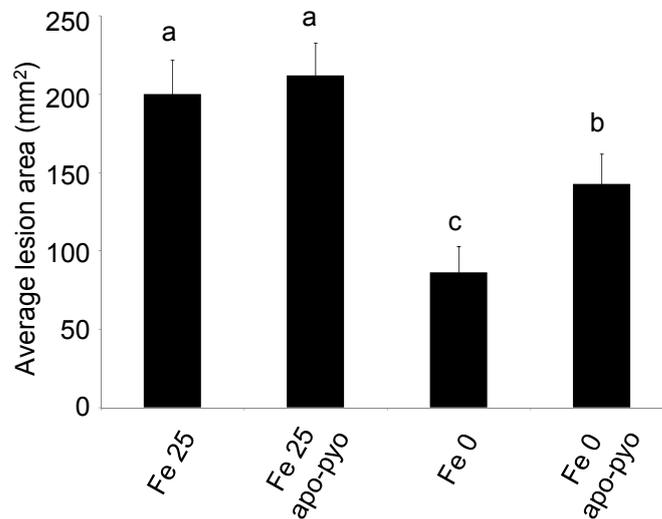


Figure 9. Evaluation of the sensitivity to *Botrytis cinerea* of plants treated by apo-pyo in iron-sufficient or iron-deficient medium.

Each value represents the mean of the area of the necrotic lesion \pm SE of 30 measurements. Experiments were repeated four times with similar results. Significant differences between the mean lesion area were determined by a one way ANOVA followed by one-way ANOVA/LSD method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.05$).

396 In the case of IAA, there was no difference after 6 h whatever the treatment. However, after 3
397 days, the iron deficiency induced a reduction of the content of IAA but in the absence of apo-
398 pyo (Fe 25 *versus* Fe 0 treatments; Fig. 8C).

399

400 **5. Involvement of apo-pyo in the growth/defense balance**

401 We and others recently reported that iron deficiency induces an increased resistance of *A.*
402 *thaliana* plants against the fungal pathogen *B. cinerea* (Kieu et al., 2012; Koen et al., 2014).
403 The findings that apo-pyo negatively regulated the levels of ABA and the expression of
404 defense-related genes of plants in the iron-deficiency condition let us to check whether the
405 siderophore could impact the plant resistance to this pathogen. For this purpose, leaves of
406 plants exposed to our different conditions (see Fig. 1 for the experimental design) were
407 inoculated by *B. cinerea* at day 3 and the disease symptoms were measured 4 days after the
408 inoculation. As expected and as previously reported, the average of the necrotic lesion areas
409 produced by *B. cinerea* infection was reduced in plants that suffered from iron deficiency
410 compared to plants grown in the Fe 25 medium (86 mm² versus 200 mm²; Fig. 9).
411 Interestingly, the induced resistance conferred by iron deficiency was partly impaired in
412 response to apo-pyo. Indeed, compared to the condition without apo-pyo, plants grown in iron
413 deficient medium in presence of the siderophore were more sensitive to the fungal infection
414 (necrotic lesion areas about 143 mm²). In contrast, no effect of apo-pyo was observed in
415 plants grown in iron-sufficient condition.

416 To further understand how apo-pyo impacts the growth and defense of plants grown under
417 iron deficiency, we analyzed the involvement of 4 genes highly modulated by the siderophore
418 and previously shown to display important functions in development and/or defense. These
419 gene include *LTP3*, *CER4*, *AT5G59320* (named *PLTP* in this paper) encoding a protein
420 involved in lipid transport and binding and whose transcripts were shown to be induced in
421 leaves of *A. thaliana* plants subjected to a combination of drought and heat stress (Rizhsky et
422 al., 2004) and *AT3G21460* (named *GRX* in this paper) which encodes a glutaredoxin family
423 protein involved in cell redox homeostasis (Finkemeier et al., 2005). The growth-promoting
424 effects of apo-pyo observed in plants facing iron deficiency was not altered in the mutants
425 impaired in the expression of the genes of interest (Fig. S5A, S5B, S5E and S5F).

426 We completed this analysis by investigating whether apo-pyo could impact the balance
427 between growth and defense as the siderophore had a positive effect on the growth but a
428 negative effect on the resistance to *B. cinerea* in plants cultivated in iron deficiency. Recently,
429 it has been demonstrated that this trade-off can be based on cross-talks operating between

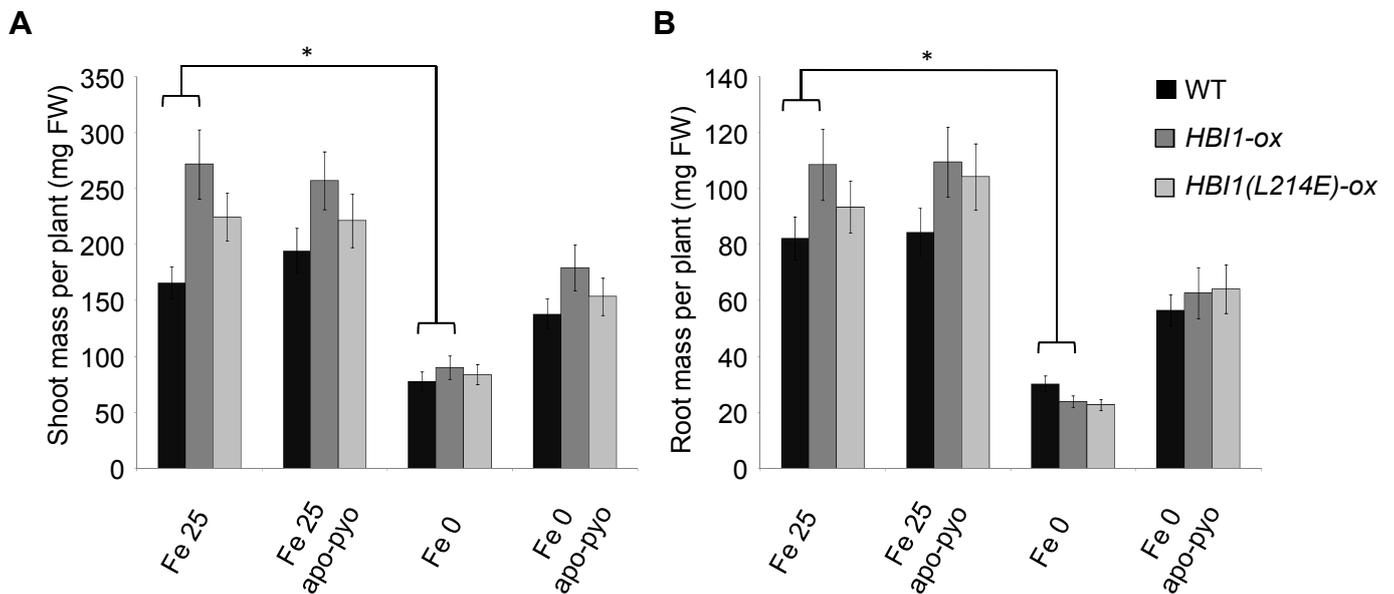


Figure 10. Growth phenotypes of *HBI1-ox* and *HBI1(L214E)-ox* mutants in response to apo-py in iron sufficient or in iron deficient medium.

Plants were treated as described in Fig 1.

A. Fresh shoot masses.

B. Fresh root masses.

Each value represents the mean \pm SE of almost 12 measurements from almost 3 independent biological experiments. Significant differences between the shoot and root masses of WT and of the mutants in response to apo-py and/or iron deficiency were determined by two-way ANOVA/Tukey's HSD method (* $P < 0.05$). FW: fresh weight.

430 growth- and immune-related signaling pathways (Bai et al., 2012; Fan et al., 2014;
431 Malinovsky et al., 2014). Notably, it has been shown that such cross-talks could involve 2
432 transcription factors namely BZR1 and HBI1, the second being a partner of the tripartite
433 module PRE1-IBH1-HBI1 that regulates cellular elongation upstream from external or
434 endogenous signals as brassinosteroids (BR) or temperature (Fan et al., 2014). IBH1 interacts
435 with and inhibits HBI1 which is a positive regulator of cellular elongation. In particular, HBI1
436 activates *ATEXPA8* and *ATEXPA1*, 2 genes encoding expansins (cell wall-loosening
437 enzymes) by direct binding to their promoters. The effects of IBH1 on HBI1 are inhibited by
438 PRE1 which sequesters IBH1. We first checked the modulation of these different genes in
439 the microarray experiment (Table S8). It appeared that *HBII* and *PRE1* were highly up-
440 regulated by apo-pyo in the shoots of Fe 0 apo-pyo- versus Fe 0-treated plants while the
441 inhibitor IBH1 was slightly down-regulated. We also noticed an induction of the expression
442 of *ATEXPI* and *ATEXP8*. Moreover, other genes encoding expansins were also activated in
443 response to apo-pyo in roots and/or shoots and could be involved in the siderophore-induced
444 promotion of growth in iron deficiency.

445 As no *HBII*-deficient mutant is available (Malinovsky et al., 2014), we tested the phenotype
446 of *HBII-ox* plants which over-express *HBII* in our different conditions (see Fig. 1 for the
447 experimental design). In the absence of apo-pyo, *HBII-ox* plants were significantly more
448 sensitive to iron deficiency than WT plants (Fig. 10). Indeed, in response to iron deprivation,
449 the shoot (Fig. 10A) and root (Fig. 10B) masses of *HBII-ox* plants were reduced by 68 and 77
450 %, respectively, while those of WT plants were reduced by 54 and 63 %, respectively. This
451 increased sensitivity was not observed in the *HBII(L214E)-ox* line that displays dominant-
452 negative effect on *HBII*. In presence of apo-pyo, the higher sensitivity of the *HBII-ox* to iron
453 deficiency was no more observed (Fig. 10A and 10B). Taken together, these results indicate
454 that apo-pyo attenuated the sensitivity of the HBI over-expressed line to iron deficiency.

455

456 **DISCUSSION**

457

458 Most of the studies dealing with the effects of bacterial siderophores on plants were achieved
459 in non-limiting iron nutrition media and/or using ferri-siderophores (for instance see Vansuyt
460 et al., 2007; Aznar et al., 2014). Here, we analysed the biological effects of a non-chelated
461 siderophore, apo-pyo, on plants that were maintained in a medium depleted or not of iron.
462 This enabled to mimic a situation in which the two partners, bacterial strain and host-plant,
463 are submitted to iron deficiency and make attempt to acquire iron from the rhizosphere. As a

464 matter of fact, siderophores are known to be only produced by bacteria in iron stress
465 conditions (Meyer and Abdallah, 1978) as the rhizosphere environment in which pyoverdine
466 synthesis was evidenced using a reporter gene (Loper et al., 1997; Duijff et al., 1999).

467 We first showed that apo-pyo was effectively taken up by roots when plants were cultivated in
468 hydroponic solution. This phenomenon was previously shown to occur in plants cultivated *in*
469 *vitro* and treated by ferri-pyo in a medium deprived of iron (Vansuyt et al., 2007). Moreover,
470 using ¹⁵N-apo-pyo, we were also able to detect ¹⁵N in the shoots. The fact that apo-pyo was
471 not detected by ELISA in the shoots could be explained by the less sensitivity of this
472 technique compared to ¹⁵N-detection by mass spectrometry or, eventually, by a degradation or
473 a chemical modification that would impair its recognition by antibodies as previously
474 suggested by Vansuyt et al. (2007). In both cases, this result indicates that apo-pyo or a
475 derivative is a systemic compound. Importantly, the quantity of apo-pyo assimilated by plants
476 did not differ whether the plants were pre-cultivated 24 h in presence or not of iron. This
477 observation indicates that plants may not adapt the rate of apo-pyo assimilation according to
478 the availability of iron in the rhizosphere.

479 Apo-pyo had a striking macroscopic effect on plants facing iron deficiency. Compared to non-
480 treated plants grown without iron, it induced a remarkable promotion of growth, together with
481 a reduction of anthocyanin accumulation. We verified that the iron-free medium was still
482 deprived of iron once apo-pyo was added, thus ruling out the possibility that the growth
483 phenotype observed in the presence of the siderophore was due to an iron contamination. A
484 promotion of growth was already observed in Vansuyt et al. (2007) in iron-deficient medium
485 following the addition of ferri-pyo to the roots of *A. thaliana*. This promotion was
486 significantly higher with ferri-pyo than with Fe-EDTA and was associated with a higher
487 increase in the iron content of the plants.

488 To investigate the mechanisms underlying apo-pyo effects, we choose to perform a large-
489 scale transcriptomic analysis. It appeared that apo-pyo modulated the expression of around
490 2100 genes (\log_2 ratio $\geq + 1.5$ or $\leq - 1.5$; p-value ≤ 0.05). The number of genes modulated by
491 apo-pyo and their induction or repression status clearly depended on the tissue and/or the
492 presence or not of iron in the hydroponic solution. First, root genes rather than shoot genes
493 were preferentially modulated. This result was expected as apo-pyo was applied in the
494 nutrient solution, directly in contact with the roots, and once assimilated by plants
495 accumulated preferentially in roots rather than in shoots. Secondly, a great part of the apo-
496 pyo-dependent genes was modulated in iron-deficiency rather than in iron-sufficient
497 condition. Therefore, the effect of apo-pyo on gene expression appeared to be dependent on

498 the plant iron status. Furthermore, the higher number of apo-pyo-modulated genes noticed in
499 plants grown in the iron-deficient medium corroborates the strong phenotypic effect triggered
500 by the siderophore in this condition.

501 A focus on the apo-pyo-regulated genes in plants grown in iron free medium showed that the
502 most induced genes encoded proteins involved in development and iron acquisition processes
503 while the most repressed were related to iron sequestration and defense responses.
504 Interestingly, Aznar et al. (2014) recently reported the data of a transcriptomic analysis
505 performed from *A. thaliana* plantlets cultivated in iron sufficient conditions and in which the
506 apo-form of the siderophore deferrioxamine (DFO, 1 mM) was infiltrated in leaves. The
507 major categories of genes modulated by DFO in leaves were related to biotic and abiotic
508 stresses including immune response, whereas in roots the DFO-target genes were associated
509 to heavy-metal homeostasis. Importantly, no effect on gene modulation was observed when
510 Fe-DFO complexes were used instead of iron-free DFO and the physiological responses
511 induced by DFO were similarly observed in response to a synthetic iron chelator. Therefore,
512 the effects of DFO were due, or partly due, to its iron-chelation ability. Inevitably, these data
513 raise the question of the incidence of apo-pyo on the plant iron homeostasis and whether its
514 effects could be also related to its chelating properties. The transcriptomic analysis as well as
515 the quantification of the iron content in apo-pyo-treated plants provided first answers. In
516 plants grown in iron-containing medium, the addition of apo-pyo did not affect the shoot iron
517 content but triggered a strong reduction of the root iron concentration accompanied by a
518 repression of *IRT1* and *FRO2* expression. Furthermore, many of the genes regulated by apo-
519 pyo in roots were also found to be modulated by iron deficiency in the roots of *A. thaliana* in
520 the study of Schuler et al. (2011) (listed in Table S9) and, using Genevestigator, we identified
521 a profile closed to those of two iron deficiency treatments (Fig. S6). Therefore, apo-pyo
522 triggered an iron deficiency-like response in plants grown in iron sufficient condition. As
523 expected, we provided evidence that this process was mainly due to the chelation by apo-pyo
524 of the iron present in the culture medium. Intriguingly, the resulting reduction of iron
525 availability did not impact the growth of the plants. This observation suggests that although
526 the apo-pyo treatment impacted the root iron content, the iron concentration of plants grown
527 in iron-containing medium was probably sufficient for ensuring normal growth. This
528 assumption does not exclude the possibility that part of the siderophore imported by the plants
529 could be internalized in its iron-chelated structure and contribute to iron assimilation. If it is
530 the case, this mechanism poorly accounts for the plant iron nutrition.

531 In plants facing iron deficiency, apo-pyo also triggered a strong reduction of the root iron
532 content compared to non-treated plants grown in iron free medium. However, the reduction of
533 shoot iron concentration observed in the latter was less pronounced in the apo-pyo-treated
534 plants. It is striking that, in plants grown in iron-deficient condition, apo-pyo promoted an
535 important induction of genes related to iron assimilation such as *IRT1*, *FRO2* and *ORG3* as
536 well as a down regulation of *AtFER1*. These data deeply contrast with those obtained in apo-
537 pyo-treated plants grown in iron-sufficient conditions and highlight that in plant facing iron-
538 deficiency apo-pyo strongly promotes the iron uptake machinery. Furthermore, in addition to
539 the iron uptake process, apo-pyo also induced a strong expression of genes encoding proteins
540 related to *in planta* iron redistribution such as *NAS4* and *OPT3* (see Table S6; Koen et al.,
541 2014; Zhai et al., 2014). As plants were grown in iron free condition, it is reasonable to
542 assume that apo-pyo provided in the culture could be imported by plants in its iron-free
543 structure and, once internalized in roots, could chelate cellular iron. Accordingly, due to their
544 high affinity for iron, bacterial siderophores including pyoverdine are able to efficiently
545 compete with host iron-binding proteins for iron acquisition (Saha et al., 2013). This process
546 could account for the ability of apo-pyo to induce the overexpression of the plant iron import
547 system. Whatever the scenario, we provide evidence that the induction of the iron import
548 machinery contributes to the growth promoting effects of apo-pyo in plants facing iron
549 deficiency. Indeed, the positive effect of apo-pyo on growth was severely impaired in the
550 mutants deficient in *IRT1* and *FRO2* expression. Furthermore, the positive effect of apo-pyo
551 on growth was further induced in the *35S:NAS4* plants overproducing NA, a non-
552 proteinogenic amino acid that contributes to iron long distance circulation in phloem and
553 transfer within the cells and which is required for the proper establishment of the plant
554 response to iron deficiency (Koen et al., 2014).

555 The analysis of the content of ABA in plants exposed to apo-pyo also supports the findings
556 that apo-pyo had a major impact on iron homeostasis. First, the hormone accumulated in the
557 shoots of plants suffering from iron deficiency in presence or not of apo-pyo within 6 h.
558 Secondly, after 3 days of apo-pyo treatment, plants grown in iron free medium showed a
559 drastic reduction of their shoot ABA level compared to non-treated plants cultivated in the
560 same medium. Therefore, the production of ABA appeared to be more transient in plants
561 exposed to apo-pyo. Accordingly, the transcriptomic analysis revealed that in the iron free
562 condition, apo-pyo repressed the expression of root genes related to ABA signaling. Our data
563 should be discussed in the light of Lei et al. (2014) investigation. These authors reported that
564 Fe deficiency induced a rapid ABA accumulation (within 6 h) in the roots of *A. thaliana*. In

565 this study, ABA was shown to contribute to alleviate iron deficiency by promoting root iron
566 reutilization and transport from the roots to the shoots. This process involved the ABA-
567 dependent regulation of genes encoding proteins related to the reutilization of the iron stored
568 in the vacuoles as *AtNRAMP3* and to long-distance transport of Fe including *AtFRD3*, *AtYSL2*
569 and *AtNAS1*. In our study, the observations that, in iron deficiency, the apo-pyo-treated plants
570 displayed, i) a higher iron content in shoots compared to non-treated plants, ii) an induced
571 expression of root genes related to iron *in planta* transport/redistribution, suggest that the
572 mechanism described by Lei et al. (2014) could operate efficiently and, therefore, more
573 transiently, in response to the siderophore. However, none of the ABA-dependent genes
574 described by these authors were found to be modulated by apo-pyo after 3 days of treatment,
575 thus minimizing this possibility.

576 Recent investigations have reported that the plant iron status conditions its resistance against
577 microorganisms. Notably, it has been found that iron deficiency activates defense-related
578 processes and confers resistance against microbial pathogens including *Dickeya dadantii* and
579 *Botrytis cinerea* (Kieu et al., 2012; Koen et al., 2014). Several studies also demonstrated that
580 siderophores produced by microorganisms trigger an immune response that could be linked to
581 their capacity to chelate iron from the host (Aznar and Dellagi, 2015). In the same vein, we
582 recently demonstrated that β -aminobutyric acid (BABA), a priming agent that confers
583 enhanced resistance to numerous pathogens, is a powerful iron chelator triggering a transient
584 iron deficiency in plants. This process could bring the plant to a defense-ready state
585 contributing to an efficient resistance (Koen et al., 2014). Further strengthening the concept
586 that plant immunity is tightly linked to iron homeostasis, several genes including those
587 encoding the transcription factor MYB72 (*AT1G56160*) and the β -glucosidase BGLU42
588 (*AT5G36890*) were shown to function in the cross-talk of root signaling pathways regulating
589 rhizobacteria-mediated ISR and the plant response to iron deficiency (Zamioudis et al., 2012).
590 In the present investigation, in accordance with the studies listed above, we confirmed that
591 plants cultivated in iron deficiency displayed a higher resistance to *B. cinerea*. This higher
592 resistance was suppressed by the apo-pyo treatment. This negative effect was correlated to a
593 general down-regulation of genes coding proteins involved in immunity with few exceptions.
594 In particular, the expression of *BGLU42* required for rhizobia-induced ISR was slightly
595 induced in apo-pyo-treated plants (Table S6). In contrast, apo-pyo treatment did not impact *B.*
596 *cinerea* development in leaves of plants grown in iron-containing solution.

597 We observed that pyoverdine did not favour the resistance against *B. cinerea* but rather
598 partially impaired it in plants grown in iron deficient condition. The interpretation of this

599 process should take into account the drastic growth-promoting activity of apo-pyo. Indeed, the
600 antagonistic effect of apo-pyo on growth and resistance observed in plants facing iron
601 deficiency strongly suggests that the siderophore impacts the trade-off between growth and
602 immunity. As recently highlighted in several studies, cross-talks between growth and immune
603 signaling operate in plants. According to the physiological contexts, notably pathogen
604 challenge or light conditions, these cross-talks prioritize one process over the second one
605 (reviewed in Lozano-Durán & Zipfel, 2015). Clearly, our data indicate that, in plants grown in
606 iron deficient condition and in response to apo-pyo, growth is prioritized over immunity.
607 Further supporting this assumption, the microarray analysis revealed that apo-pyo modulates
608 the expression of the PRE1-IBH1-HBI1 module in shoots of plants facing iron deficiency. As
609 discussed in the Results section, HBI1 is a key node for the cross-talk between growth and
610 immunity and, once activated, negatively regulates defense responses while prioritizing
611 growth (Fan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014). HBI1 effects are antagonized by IBH1. In
612 turn, through its binding to HBI1, PRE1 prevents its inhibitory effect (Bai et al., 2012).
613 Supporting a role of HBI1 in the mediation of the trade-off between growth and immunity, its
614 overexpression was shown to trigger the repression of the expression of genes involved in
615 immunity and to enhance susceptibility of the plants to the bacterium *Pseudomonas syringae*
616 (Fan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014). We found that both *HBII* and *PRE1* expression in
617 shoots were strongly up-regulated in response to apo-pyo whereas the expression of IBH1 was
618 slightly repressed. Therefore, these expression profiles reflect a physiological situation in
619 which the balance between growth and immunity is weighted in favour of growth. To
620 strengthen this possibility, we checked whether the growth promoting effect of apo-pyo in
621 plants grown in iron deficient condition was enhanced in the *HBII* overexpressing line (*HBII-*
622 *ox*). We did not observe such effect. This data could be explained by the fact that the level of
623 *HBII* expression induced by apo-pyo in WT plants was particularly high.

624

625 **CONCLUSION**

626

627 To conclude, the present investigation provides evidence that the effects of pyoverdine
628 depend on iron availability and, consequently, on the plant iron status. Furthermore, it
629 highlights that in plants facing iron deficiency, the apo-siderophore modulates the trade-off
630 between growth and immunity in favour of growth, this mechanism being depend on the
631 expression of the iron-uptake related genes *IRT1* and *FRO2*. More generally, this work

632 indicates that microorganism-derived siderophores impact the cross-regulatory interactions
633 operating on host plants between iron homeostasis, immune function and growth.

634

635 **MATERIALS AND METHODS**

636

637 **Plant material and growth conditions**

638 *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) ecotype was used as wild-type (WT) control for
639 phenotype comparisons for all mutants and transgenic lines described in this study. The T-
640 DNA mutants *bhlh100* (SALK_074568C), *bhlh39* (SALK_025676C), *cer4*
641 (SALK_000575C), *grx* (SALK_001139C), *ltp3* (SALK_095248C), and *pltp* (SALK_063856)
642 were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, Nottingham, United
643 Kingdom). Homozygosity for the mutant alleles was checked using specific primers (Table
644 S10). The following lines were described previously: *irt1* (Vert et al., 2002), *fro2* (also named
645 *frd1-1*; Robinson et al., 1999), *ov. fer.* (OV ferritin; Vansuyt et al., 2007), *HBII-ox* and
646 *HBII(L214E)-ox* (Malinovsky et al., 2014), 35S:*NAS4* and *nas4* (Koen et al., 2013).

647 Seeds were surface sterilized by immersion in a solution containing 1.2 % bleach and 50 %
648 EtOH for 3 min, rinsed three times with 100 % EtOH, air-dried and placed for 3 days at 4°C
649 in the dark in 0.15 % agar. Then, they were sown in seed holders filled with 0.75 % agar and
650 put in a cover placed above the nutrient solution container (Araponics, Liege, Belgium). The
651 nutritive medium named Fe 25 nutrient solution (0.25 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM KNO₃, 1 mM
652 KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 50 μM H₃BO₃, 19 μM MnCl₂, 10 μM ZnCl₂, 1 μM CuSO₄, 0.02 μM
653 Na₂MoO₄, 25 μM Fe-Na-EDTA) was changed twice a week. Plants were allowed to grow in a
654 climate-controlled growth chamber for four or five weeks before the treatments in the
655 following conditions: 10 h day (200 μE.m⁻².s⁻¹ light intensity, 20°C) / 14 h night (18°C) with
656 70 % relative humidity.

657

658 **Chemicals**

659 All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA) unless stated.

660

661 **Production and purification of apo-pyo and ¹⁵N-apo-pyo**

662 *Pseudomonas fluorescens* C7R12 has been isolated from a soil naturally suppressive to
663 soilborne disease and is an efficient biocontrol agent against pathogenic *Fusarium oxysporum*
664 (Lemanceau et al., 1991). *P. fluorescens* was grown on King's B (King et al., 1954) agar plate
665 for two days at 25°C. Several colonies were sowed in succinate medium and incubated with

666 shaking (180 rpm) for one day at 25°C (Meyer and Abdallah, 1978). Few millilitres of this
667 culture were used to inoculate the main culture (650 mL in 3 L Erlenmeyer) that was
668 incubated for four days in the same conditions as described above. After incubation, bacterial
669 cells were removed by two centrifugations at 4,800 g for 30 min (4°C). The pool of resulting
670 supernatants was adjusted at pH 6 with 6 N HCl and then was mixed with an
671 Amberlite®XAD-4 resin (Carson et al., 2000), 300 mL of resin being mixed under agitation
672 with 3.9 mL of the supernatant for 4 h. After loading, the resin was washed with mQ water
673 and apo-pyo was eluted from the column overnight with 100 % methanol at 4°C. The eluate
674 was concentrated with a rotary evaporator in order to obtain a 2-3 mL solution. The obtained
675 solution was adsorbed on a Sep-Pak C18 Vac 6 cc cartridge containing 500 mg of
676 octadecylsilane (Waters Co. Ltd., Bedford, MA, USA; Nagata et al., 2013). After loading, the
677 column was washed with 0.1 M EDTA, followed by pH 4.0 acidified water (1 % formic acid)
678 and apo-pyo was eluted with aqueous 80 % methanol and finally concentrated with a rotary
679 evaporator and lyophilized prior to storage of the powder at -20°C. The same protocol was
680 used to produce ¹⁵N-pyoverdine with supply of (¹⁵NH₄)₂SO₄ 98 % to the succinate medium.

681

682 **Treatments**

683 After 4 weeks of culture (or 5 weeks for infection experiments), plant roots were rinsed using
684 Fe 0 nutrient solution (hydroponic solution described above without Fe-Na-EDTA) and plants
685 were separated in 4 batches corresponding to 4 treatments (Fig.S1):

686 - Fe 25: pretreatment for 1 day in Fe 25 nutrient solution and treatment for 7 days in Fe 25
687 nutrient solution,

688 - Fe 25 apo-pyo: pretreatment for 1 day in Fe 25 nutrient solution and treatment for 7 days in
689 Fe 25 nutrient solution supplemented with 25 µM of purified apo-pyo.

690 - Fe 0: pretreatment for 1 day in Fe 0 nutrient solution and treatment for 7 days in Fe 0
691 nutrient solution,

692 - Fe 0 apo-pyo: pretreatment for 1 day in Fe 0 nutrient solution and treatment for 7 days in Fe
693 0 nutrient solution supplemented with 25 µM of purified apo-pyo.

694

695 **ELISA procedure for the detection of pyoverdine in roots**

696 Primary antibodies production was described in Vansuyt et al. (2007).

697 Roots of 3 plants per condition of treatment were washed 10 min with mQ water and 2 times
698 10 min with the following solution: EDTA 5 mM, KCl 1 mM, Na₂S₂O₄ 5 mM, CaSO₄ 0.5
699 mM pH 6 and finally 10 min with mQ water. Roots were frozen and grounded with pestle and

700 mortar in liquid nitrogen. Proteins were extracted with 15 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM
701 MgCl₂, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM
702 PMSF and a protease inhibitor cocktail (UltraCruz® Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Santa
703 Cruz Biotechnology Dallas, Texas, U.S.A.) following the manufacturer's instructions. After
704 centrifugation of the samples (14000 g, 15 min, 4°C), protein concentration of the
705 supernatants was estimated according to the procedure of Bradford (1976). Root protein
706 extracts were diluted to obtain 10 µg of proteins in 100 µl of TBS which were loaded in each
707 well of a microtitration plate (NUNC Maxisorp®, San Diego, CA, U.S.A.). These extracts
708 were coated directly overnight at 4°C. After 3 washes of 5 min with 200 µL of TBS-Tween 20
709 (0.1 %; v/v), each well was saturated with 100 µL of TBS-Tween 20 with 5 % milk (v/v) for 1
710 h. Antibodies anti-pyoverdine were diluted 100-fold in TBS-Tween 20 with 5 % milk (v/v)
711 and 100 µl per well were added in each well for 2 h. After another 3 washes of 5 min with 200
712 µL of TBS-Tween 20 (0.1 %; v/v), anti-rabbit secondary antibodies coupled to alkaline
713 phosphatase were diluted 30,000-fold in 50 mM Na₂CO₃ pH 9.6 and 100 µl per well were
714 added for 1 h. Three washes of 5 min with 200 µL of TBS were achieved and 100 µL of 1
715 mg.mL⁻¹ *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) dissolved in 10 % diethanolamine HCl pH 9.8, 0.5
716 mM MgCl₂ were added in each well. Absorbance was measured at 405 nm for 18 h in a
717 microplate reader (Thermomax, Molecular Devices, Menlo Park, CA, U.S.A.).

718

719 **Detection of ¹⁵N-apo-pyo**

720 After the treatments, roots or shoots of 4 plants were pooled for each condition. Roots were
721 washed as described in ELISA procedure. Root or shoot tissues were dried at 60°C for 2 days
722 and grounded with pestle and mortar. ¹⁵N was detected and quantified in the tissues by the
723 stable Isotope Analytical platform of B&PMP (Biochimie et Physiologie Moléculaire des
724 Plantes, Montpellier, France).

725

726 **Transcriptomic analysis**

727

728 **RNA preparation**

729 For 3 independent experiments, root and shoot tissues were collected separately after the
730 treatments and immediately frozen in liquid nitrogen and grounded with a TissueRuptor
731 (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) after addition of 175 µL of RNA lysis buffer (Promega
732 Corp., Madison, WI, U.S.A.) per 30 mg of tissues. Total RNA extraction was carried out
733 using the SV Total RNA Isolation System (Promega) according to the manufacturer's

734 instructions. RNAs were solubilised in 100 μ L RNase free water. Their concentration and
735 purity were determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific Inc., Madison, WI, USA).
736 For each experiment, RNA samples from 4 plants per condition were pooled in order to obtain
737 20 μ L of RNAs at 220 ng. μ L⁻¹. RNA Integrity Numbers (RINs) were determined with the
738 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and considered sufficient
739 for microarray if comprised between 8.5 and 9.8 for the shoot RNAs and between 7 and 7.8
740 for the root RNAs.

741

742 **Microarray experiment**

743 Microarray analysis was carried out at the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2,
744 Evry, France), using the CATMA version 6.2 array using the CATMAv6.2 array based on
745 Roche-NimbleGen technology. A single high density CATMAv6.2 microarray slide contains
746 twelve chambers, each containing 219,684 primers representing all the *Arabidopsis thaliana*
747 genes: 30,834 probes corresponding to CDS TAIRv8 annotation (including 476 probes of
748 mitochondrial and chloroplast genes) + 1289 probes corresponding to EUGENE software
749 predictions. Moreover, it included 5352 probes corresponding to repeat elements, 658 probes
750 for miRNA/MIR, 342 probes for other RNAs (rRNA, tRNA, snRNA, soRNA) and finally 36
751 controls. Each long primer is triplicate in each chamber for robust analysis and in both strand.
752 For each comparison, one technical replicate with fluorochrome reversal was performed for
753 each biological replicate (i.e. four hybridizations per comparison). The labeling of cRNAs
754 with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products) was performed as
755 described in Lurin et al. (2004). The hybridization and washing were performed according to
756 NimbleGen Arrays User's Guide v5.1 instructions. Two micron scanning was performed with
757 InnoScan900 scanner (InnopsysR, Carbonne, France) and raw data were extracted using
758 MapixR software (InnopsysR, Carbonne, France).

759

760 **Statistical Analysis of Microarray Data**

761 For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at
762 wavelengths 635 nm (red) and 532 nm (green). For each array, a global intensity-dependent
763 normalization using the loess procedure (Yang et al., 2002) was performed to correct the dye
764 bias. The differential analysis is based on the log-ratios averaging over the duplicate probes
765 and over the technical replicates. Hence, the numbers of available data for each gene equal the
766 number of biological replicates and are used to calculate the moderated t-test (Smyth, 2004).
767 Under the null hypothesis, no evidence that the specific variances vary between probes is

768 highlighted by Limma and consequently the moderated t-statistic is assumed to follow a
769 standard normal distribution.

770 To control the false discovery rate, adjusted p-values found using the optimized FDR
771 approach of Storey and Tibshirani (2003) were calculated. We considered as being
772 differentially expressed the probes with an adjusted p-value ≤ 0.05 . Analysis was done with
773 the R software. The function SqueezeVar of the library limma has been used to smooth the
774 specific variances by computing empirical Bayes posterior means. The library kerfdr has been
775 used to calculate the adjusted p-values.

776

777 **Microarray data deposition**

778 Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (GEO;
779 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), accession no. GSE71163, and at CATdb
780 (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: INRA13-03_pyo) according to the “Minimum
781 Information About a Microarray Experiment” standards.

782

783 **RT-qPCR analyses**

784 RNA samples were reverse-transcribed using ImpromIITM Reverse Transcriptase kit
785 (Promega) with a mix of anchored oligo(dT)17 and random hexamers primers according to
786 the manufacturer’s specifications. The resulting cDNAs were subjected to a 20-fold dilution
787 with water and 5 μ l of each cDNA sample was assayed by qPCR in a LightCycler (ViiATM 7
788 Real-Time PCR System, Thermo Fischer) using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega)
789 according to the manufacturer’s instructions. Expression levels were calculated relatively to
790 the housekeeping genes *AT5G08290* (encoding the mitosis protein YLS8) and *AT4G26410*
791 (encoding an uncharacterised conserved protein) using the relative standard curve method.
792 These 2 genes were shown to be among the 5 most reliable reference genes for normalization
793 purposes in *A. thaliana* Col-0 (Wang et al., 2014). For each sample, target quantity of the
794 gene of interest was determined by interpolating the value from the standard curve made from
795 a cDNA pool which enables to take into consideration the efficiency of amplification. The
796 value was then divided by the target quantity of the housekeeping gene. For a list of primers
797 used for RT-qPCR, see Table S11.

798

799 **Determination of Fe concentrations**

800 After the treatments, roots or shoots of 4 plants were pooled for each condition. Roots were
801 washed 10 min with mQ water, 2 times 10 min with the following solution: EDTA 5 mM,

802 KCl 1 mM, Na₂S₂O₄ 5 mM, CaSO₄ 0.5 mM pH 6 and finally 10 min with mQ water. Root or
803 shoot tissues were dried at 60°C for 2 days. Mineralization of the samples was achieved in
804 Pyrex tubes previously washed 3 h with 0.1 N HCl, 1 h with 5 mM EDTA and rinsed 3 times
805 with mQ water. Once dried, samples were grounded and solubilised in 300 µL of ultra-pure
806 nitric acid (67 % Normaton for trace analysis; VWR BDH Prolabo, Pennsylvanie, U.S.A.).
807 After heating of the samples (1 h at 80°C and 1 h at 100°C), 100 µL of ultra-pure nitric acid
808 and 200 µL H₂O₂ were added in the tubes to obtain a 10 mL solution in mQ water. The
809 concentrations of Fe were determined by inductively coupled plasma-atomic emission
810 spectroscopy (ICP-AES; Vista Pro, Varian, Palo Alto, CA, U.S.A.) by Welience (Pôle de
811 Chimie Moléculaire, Université De Bourgogne, Dijon, France).

812

813 **Measurements of anthocyanins**

814 Shoots from 3 plants per treatment were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen.
815 After grinding, anthocyanin content was determined using the protocol described by Teng et
816 al. (2005).

817

818 **Hormone content analysis**

819 Shoots from 5 plants per treatment were harvested, dried and grinded. For each sample, 10 mg
820 of freeze-dried powder were extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1
821 v:v:v). Abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and indole-3-acetic acid
822 (IAA) stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in Le
823 Roux et al. (2014). Two ng of each standard was added to the sample. The extract was
824 vigorously shaken for 1 min, sonicated for 1 min at 25 Hz, shaken for 10 minutes at 4°C in a
825 Thermomixer (Eppendorf®), and then centrifuged (8,000 g, 4°C, 10 min). The supernatants
826 were collected, and the pellets were re-extracted twice with 0.4 mL of the same extraction
827 solution, then vigorously shaken (1 min) and sonicated (1 min; 25 Hz). After the
828 centrifugations, the three supernatants were pooled and dried (final volume of 1.6 mL).

829 Each dry extract was dissolved in 140 µL of acetonitrile/water (50/50; v/v), filtered, and
830 analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters
831 Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were
832 separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3µm particle
833 size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹ and a binary gradient: (A) acetic
834 acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid. The following binary
835 gradient was used (t, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %),

836 (9.6 min., 0 %), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %). Mass spectrometry was conducted in
837 electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive
838 mode for IAA and in negative ion mode the other hormones. Relevant instrumental
839 parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and
840 desolvation gas temperatures 130°C and 500°C, respectively. Nitrogen was used to assist the
841 cone and desolvation (150 L.h⁻¹ and 800 L.h⁻¹, respectively), argon was used as the collision
842 gas at a flow of 0.18 mL/min. The parameters used for MRM quantification of the different
843 hormones are described in Leroux et al. (2014) for the other hormones.

844 Samples were reconstituted in 140 µL of 50/50 acetonitrile/H₂O (v/v) per mL of injected
845 volume. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were extrapolated for
846 each hormone from calibration curves and samples using Quantify module of MassLynx
847 software, version 4.1.

848

849 **Plant inoculation with *B. cinerea***

850 *B. cinerea* BMM strain was grown on 39 g.L⁻¹ Potato Dextrose Agar plates (PDA; BD
851 Biosciences, San Jose, USA) at 23°C for 10 days in the dark until sporulation. Spores were
852 harvested in sterile mQ water and filtered through glass wool to remove hyphae. Then, they
853 were diluted in Potato Dextrose Broth medium 6 g.L⁻¹ (PDB; BD Biosciences, San Jose,
854 USA) for inoculation. Five week-old plants were treated as described previously. Then, 3
855 days after the addition of 25 µM pyoverdine or water, Fe 25-, Fe 25 apo-pyo-, Fe 0- and Fe 0
856 apo-pyo-treated plants were inoculated by *B. cinerea*. Inoculation was achieved by application
857 of 5 µL droplets of spore suspensions at a concentration of 5.10⁴ spores.mL⁻¹ to the upper
858 surface of 5 leaves per plant with 5 plants per condition and per experiment minimum. The
859 inoculated plants were incubated at 100 % relative humidity under 16 h day (23°C) and 8 h
860 night (20°C). Symptom development was scored 7 days after inoculation by measuring the
861 lesion area using Optimas version 6.0 (Adept Turnkey Pty. Ltd., West Australia, Australia).

862

863 **Statistics**

864 One-way ANOVA was performed using XLSTAT software (Addinsoft, New York, NY)
865 followed by multiple comparison procedure with the Fisher's least significant difference
866 (LSD) method (at least P < 0.05). Two-way ANOVA was performed using VassarStats on-
867 line software (<http://vassarstats.net/>) followed by multiple comparison procedure with Tukey's
868 honest significant difference (HSD) method (at least P < 0.05).

869

870 **Accession numbers**

871 Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or
872 GenBank/EMBL database accession numbers: *IRT1*, AT4G19690; *FRO2*, AT1G015800;
873 *FER1*, AT5G01600; *NAS4*, AT1G56430; *bHLH100*, AT2G41240; *bHLH39*, AT3G56980;
874 *CER4*, AT4G33790; *GRX*, AT3G21460; *LTP3*, AT5G59320; *PLTP*, AT5G59330; *HBII*,
875 AT2G18300.

876

877 **ACKNOWLEDGMENTS**

878

879 We thank Carine Fournier for the preparation of *B. cinerea* spores, Pascal Tillard and Alain
880 Gojon from the Analytical platform of B&PMP, Cyril Zipfel for the gift of *HBII-ox* and
881 *HBII(L214E)-ox* lines. We are grateful to Olivier Lamotte, Valérie Nicolas-Francès, Claire
882 Rosnoblet and Hoai-Nam Truong for careful reading of the manuscript.

883

884 **LITERATURE CITED**

885

886 **Ahmed E, Holmström SJ** (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb*
887 *Biotechnol* **7**: 196-208

888

889 **Albrecht-Gary AM, Blanc S, Rochel N, Ocaktan AZ, Abdallah MA** (1994) Bacterial iron transport -
890 coordination properties of pyoverdine Paa, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**:
891 6391-6402

892

893 **Aznar A, Dellagi A.** (2015) New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can
894 we learn from animals? *J Exp Bot* **66**: 3001-3010

895

896 **Aznar A, Chen NW, Rigault M, Riache N, Joseph D, Desmaële D, Mouille G, Boutet S, Soubigou-**
897 **Taconnat L, Renou JP, Thomine S, Expert D, Dellagi A** (2014) Scavenging iron: a novel mechanism of plant
898 immunity activation by microbial siderophores. *Plant Physiol* **164**: 2167-2183

899

900 **Bai MY, Fan M, Oh E, Wang ZY** (2012) A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell
901 elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Cell*
902 **24**: 4917-4129

903

904 **Bakker PAHM, Pieterse CMJ, Van Loon LC** (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas*
905 spp. *Phytopathology* **97**: 239-243

906

907 **Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein
908 utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**: 248-254

909

910 **Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ** (2000) Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biol*
911 *Biochem* **32**: 11-21

912

913 **Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, Slavinskaya Z, Vogel HJ**
914 (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* **23**: 601-
915 611

916

917 **Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron
918 deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412

919

920 **Curie C, Briat JF** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **52**: 183-206

921

922 **Crowley DE** (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In *Iron Nutrition in Plants and*
923 *Rhizospheric Microorganisms*. Barton LL and Abadía J (eds). Netherlands:Springer, pp. 169-189

924

925 **Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat JF, Gaymard F, Expert D** (2005)
926 Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi*
927 infection. *Plant J* **43**: 262-272

928

929 **Duijff BJ, Recorbet G, Bakker PAHM, Loper J, Lemanceau P** (1999) Microbial antagonism at the root level
930 is involved in the suppression of fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47
931 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* **89**: 1073-1079

932

933 **Dellagi A, Segond D, Rigault M, Fagard M, Simon C, Saindrenan P, Expert D** (2009) Microbial
934 siderophores exert a subtle role in Arabidopsis during infection by manipulating the immune response and the
935 iron status. *Plant Physiol* **150**: 1687-1696

936

937 **Eparvier A, Lemanceau P, Alabouvette C** (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and
938 fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol Ecol* **86**: 177-
939 184

940

941 **Fan M, Bai MY, Kim JG, Wang T, Oh E, Chen L, Park CH, Son SH, Kim SK, Mudgett MB, Wang ZY**
942 (2014) The bHLH transcription factor HBI1 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated
943 molecular pattern-triggered immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 828-841

944

945 **Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ** (2005) The
946 mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of Arabidopsis thaliana
947 under stress. *J Biol Chem* **80**: 12168-12180

948

949 **Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, Savirón M, Rey G, Gaymard F, Abadía A, Abadía J, Alvarez-
950 Fernández A, Briat JF** (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and
951 derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol* **201**: 155-167

952

953 **Franza T, Expert D** (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an “à la
954 carte” menu. *Mol Plant Pathol* **14**: 429-438

955

956 **Guerinot ML, Yi Y** (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol* **104**: 815-820

957

958 **Haas D, Défago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev*
959 *Microbiol* **3**: 307-319

960

961 **Kieu NP, Aznar A, Segond D, Rigault M, Simond-Côte E, Kunz C, Soulie MC, Expert D, Dellagi A** (2012)
962 Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*.
963 *Mol Plant Pathol* **13**: 816-827

964

965 **King EO, Ward MK, Raney DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.
966 J Lab Clin Med **44**: 301-307
967

968 **Koen E, Trapet P, Brulé D, Kulik A, Klinguer A, Atauri-Miranda L, Meunier-Prest R, Boni G, Glauser G,**
969 **Mauch-Mani B, Wendehenne D, Besson-Bard A** (2014) β -Aminobutyric acid (BABA)-induced resistance in
970 *Arabidopsis thaliana*: link with iron homeostasis. Mol Plant Microbe Interact **27**: 1226-1240
971

972 **Koen E, Besson-Bard A, Duc C, Astier J, Gravot A, Richaud P, Lamotte O, Boucherez J, Gaymard F,**
973 **Wendehenne D** (2013) *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron
974 deficiency and to cadmium exposure. Plant Sci **209**: 1-11
975

976 **Le Roux C, Del Prete S, Boutet-Mercey S, Perreau F, Balagué C, Roby D, Fagard M, Gaudin V** (2014) The
977 hnRNP-Q protein LIF2 participates in the plant immune response. PLoS One **9**(6):e99343
978

979 **Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng S** (2014) Abscisic acid alleviates iron deficiency by
980 promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in Arabidopsis. Plant Cell Environ **37**: 852-863
981

982 **Lemanceau P, Alabouvette C** (1991) Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and
983 non-pathogenic *Fusarium*. Crop Prot **10**: 279-286
984

985 **Lemanceau P, Bakker PAH., De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B** (1992) Effect of pseudobactin 358
986 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic
987 *Fusarium oxysporum* Fo47. Appl Environ Microbiol **58**: 2978-2982
988

989 **Lemanceau P, Bakker PAHM, De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B** (1993) Antagonistic effect of
990 nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp.
991 dianthi. Appl Environ Microbiol **59**: 74-82
992

993 **Lemanceau P, Bauer P, Kraemer S, Briat JF** (2009) Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for
994 analyzing interactions between soils, plants and microbes. Plant and Soil **321**: 515-535
995

996 **Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN** (2010) The bHLH transcription factor
997 POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. Plant Cell **22**: 2219-2236
998

999 **Loper JE and Henkels MD** (1997) Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk
1000 soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. Appl Environ Microbiol **63**: 99-105
1001

1002 **Lozano-Durán R, Zipfel C** (2014) Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. Trends
1003 Plant Sci **20**: 12-19
1004

1005 **Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J,**
1006 **Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B,**
1007 **Taconnat L, Small I** (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals
1008 their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell **16**: 2089-2103
1009

1010 **Malinovsky FG, Batoux M, Schwessinger B, Youn JH, Stransfeld L, Win J, Kim SK, Zipfel C** (2014)
1011 Antagonistic regulation of growth and immunity by the Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factor
1012 homolog of brassinosteroid enhanced expression2 interacting with increased leaf inclination1 binding bHLH1.
1013 Plant Physiol **164**: 1443-1455
1014

1015 **Meyer JM, Abdallah MA** (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis,
1016 purification and physicochemical properties. J Gen Microbiol **107**: 319-328
1017

1018 **Nagata T, Oobo T, Aozasa O** (2013) Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum*
1019 *lycopersicum* plants. *J Biosci Bioeng* **115**: 686-690
1020
1021 **Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G** (2014) Iron at the interface of immunity and infection. *Front*
1022 *Pharmacol* **5**:152
1023
1024 **Ong ST, Ho JZ, Ho B, Ding JL** (2006) Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* **211**:
1025 295-314
1026
1027 **Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide.
1028 The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683-1696
1029
1030 **Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer JM, Briat JF, Lemanceau P** (2008) Chapter 4 - Iron dynamics in
1031 the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv Agron* **99**: 183-225
1032
1033 **Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL** (2012) Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*
1034 **53**: 303-317
1035
1036 **Schuler M, Keller A, Backes C, Philippar K, Lenhof HP, Bauer P** (2011) Transcriptome analysis by
1037 GeneTrail revealed regulation of functional categories in response to alterations of iron homeostasis in
1038 *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **11**:87
1039
1040 **Sivitz AB, Hermand V, Curie C, Vert G** (2012) *Arabidopsis* bHLH100 and bHLH101 control iron
1041 homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS One* **7**:e44843
1042
1043 **Smyth GK** (2004) Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in
1044 microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article 3
1045
1046 **Storey JD, Tibshirani R** (2003) Statistical significance for genome-wide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:
1047 9440-9445
1048
1049 **Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S** (2005) Sucrose-specific induction of
1050 anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiol* **139**: 1840-1852
1051
1052 **van Loon LC, Bakker PA, van der Heijdt WH, Wendehenne D, Pugin A** (2008) Early responses of tobacco
1053 suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 1609-
1054 1621
1055
1056 **Van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ** (2008) Plant immune responses triggered by beneficial
1057 microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 443-448
1058
1059 **Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C, Lemanceau P** (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by
1060 *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 441-447
1061
1062 **Wang H, Wang J, Jiang J, Chen S, Guan Z, Liao Y, Chen F** (2014) Reference genes for normalizing
1063 transcription in diploid and tetraploid *Arabidopsis*. *Sci Rep* **4**: 6781
1064
1065 **Weller DM** (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years.
1066 *Phytopathology* **97**: 250-256
1067
1068 **Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** (2002) Normalization for cDNA microarray
1069 data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**:
1070 e15

1071
1072 **Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G** (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a
1073 biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* **47**: 138-145
1074
1075 **Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D, Ling HQ** (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and
1076 AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res* **18**: 385-397
1077
1078 **Zamioudis C, Hanson J, Pieterse CM** (2014) β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of
1079 rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *New*
1080 *Phytol* **204**: 368-379
1081
1082 **Zhai Z, Gayomba SR, Jung HI, Vimalakumari NK, Piñeros M, Craft E, Rutzke MA, Danku J, Lahner B,**
1083 **Punshon T, Guerinot ML, Salt DE, Kochian LV, Vatamaniuk OK** (2014) OPT3 Is a Phloem-Specific Iron
1084 Transporter That Is Essential for Systemic Iron Signaling and Redistribution of Iron and Cadmium in
1085 Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 2249-2264

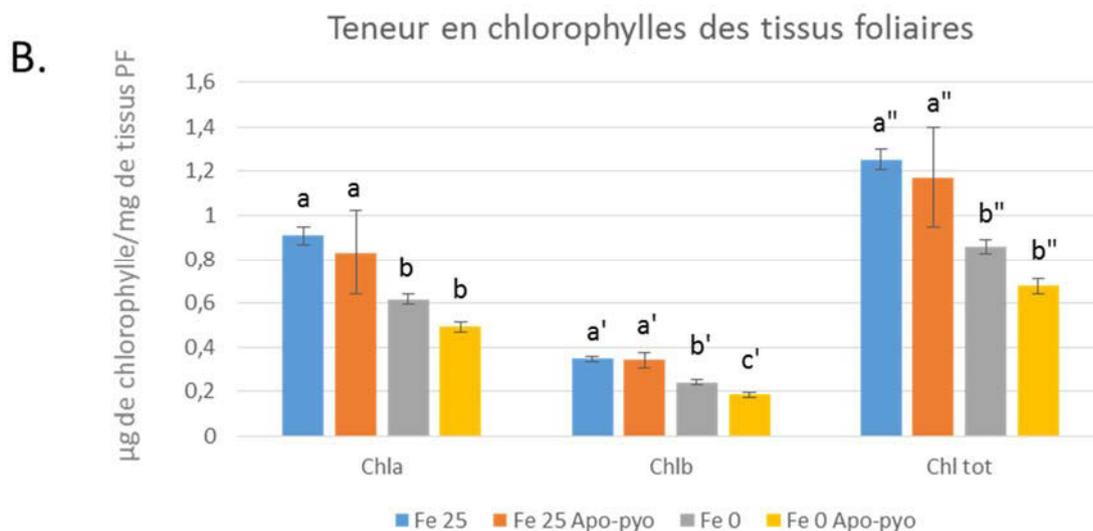
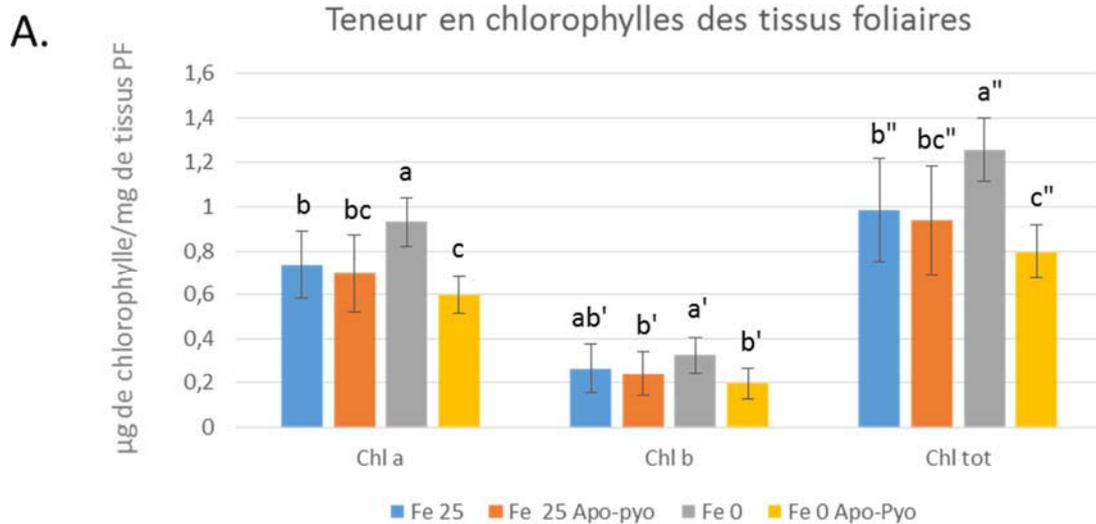


Figure III.1 : Mesure de la teneur en chlorophylles dans les tissus foliaires de plantes après sept jours de traitement (Fe 25, Fe 25 apo-pyo, Fe 0, Fe 0 apo-pyo)

- A. Compilation des résultats obtenus pour les quatre dosages de la teneur en chlorophylles réalisés sur quatre expériences indépendantes. Pour ces mesures, les plantes Fe 0 présentait le phénotype fortement anthocyané.
- B. Résultats du dosage de la teneur en chlorophylles réalisé sur une expérience pour laquelle les plantes Fe 0 ne présentait pas un phénotype anthocyané mais toujours un phénotype spécifique d'une carence en fer (une réduction de croissance et une chlorose).

Un test ANOVA a été réalisé entre les différents traitements et les différents pigments, les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes en haut des histogrammes.

PF : poids frais

3. Résultats complémentaires

En plus des résultats présentés sous forme d'article dans le § 4 du chapitre 3, plusieurs expériences complémentaires ont été réalisées afin de mieux cerner les effets induits par la pyoverdine sur la plante.

3.1. Analyse phénotypique complémentaire

Pour compléter l'analyse phénotypique de l'article présenté dans la partie 4 du chapitre 3, nous avons mesuré la teneur en chlorophylles a, b et totales dans les feuilles de plantes d'*A. thaliana* cultivées en condition Fe 25 et en condition Fe 0 traitées ou non par l'apo-pyo durant 7 jours.

Les résultats présentés dans la figure III.1 A correspondent aux mesures spectrophotométriques réalisées sur des plantes présentant le phénotype fortement anthocyané présenté dans l'article. Conformément à l'observation macroscopique, la teneur en chlorophylles des plantes Fe 25 et des plantes Fe 25 apo-pyo est similaire. En revanche, de manière générale, la teneur en chlorophylles des plantes Fe 0 apo-pyo est significativement inférieure à celle des plantes Fe 25, confirmant le phénotype légèrement chlorotique observé au niveau macroscopique. Enfin, pour les tissus foliaires Fe 0 fortement anthocyanés pour lesquels une diminution de la teneur en chlorophylles est attendue, les résultats obtenus indiquent une augmentation de la teneur de ces pigments. Ces résultats sont contradictoires avec la littérature (Koen *et al*, 2013a). Il est possible que la forte quantité d'anthocyanes présentes dans les tissus foliaires des plantes carencées interfère au cours du dosage spectrophotométrique. En effet, il est probable que les anthocyanes des tissus soient en partie extraites en même temps que les chlorophylles dans le solvant acétone aqueux 80%. L'utilisation ou le développement d'une autre méthode de dosage semble nécessaire pour effectuer une mesure correcte de la teneur en chlorophylles sur les tissus anthocyanés. Ces expériences ne nous permettent pas de conclure de manière fiable de l'évolution de la teneur en chlorophylle dans les tissus foliaires de plantes traitées en condition Fe 0. En revanche, nous pouvons affirmer que les plantes cultivées en condition Fe 0 apo-pyo présentent une quantité de chlorophylles significativement inférieure aux plantes cultivées en condition Fe 25 ou Fe 25 apo-pyo.

Au cours de mes travaux et de manière surprenante, sur des expériences, le phénotype anthocyané n'a pas été observé ce qui a permis de laisser apparaître un

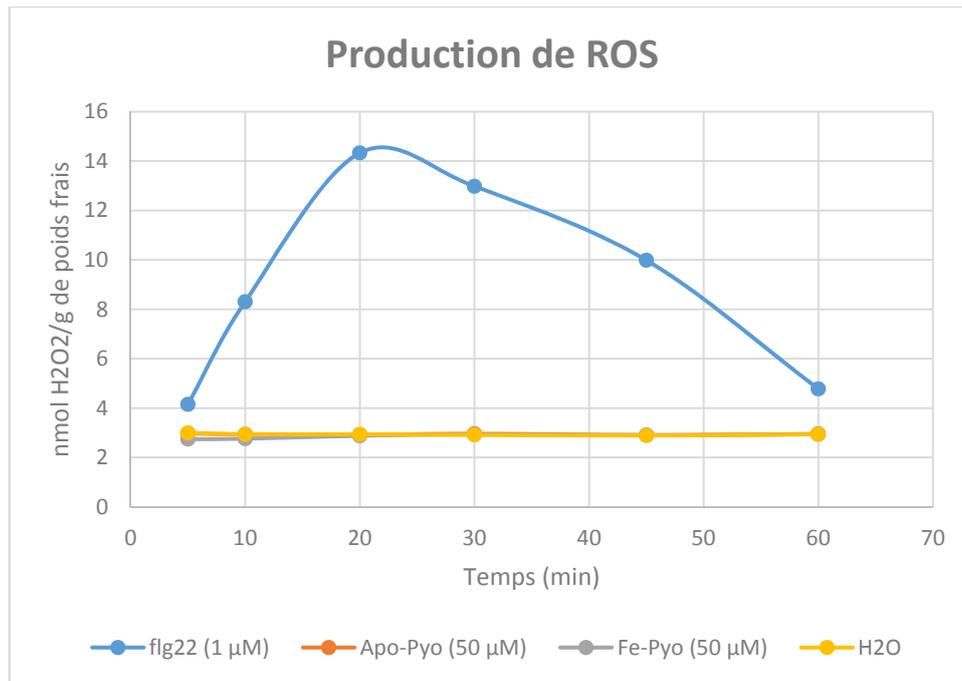


Figure III.2 : Mesure de la production de ROS sur suspensions cellulaires d'*A. thaliana* suite à un traitement par (i) le peptide flg22 (1 μM, témoin positif), (ii) de l'apo-pyoverdine (apo-pyo 50 nM), (iii) de la ferri-pyoverdine (50 nM) ou (iv) de l'eau (témoin négatif). La mesure de la production de ROS a été réalisée aux temps 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes. Les résultats sont issus d'une expérience préliminaire.

phénotype chlorotique communément observé sur des plantes cultivées en situation de carence en fer ou déficientes dans l'import et la distribution du fer dans la plante (Vert *et al*, 2002 ; Waters *et al*, 2006 ; Schuler *et al*, 2012). Sur ces mêmes plantes, nous avons réalisé un dosage de la teneur en chlorophylles pour se libérer du biais induit par la forte présence d'anthocyanes. La figure **III.1.B** présente les résultats de ce dosage. Les valeurs obtenues confirment les observations macroscopiques et sont cohérentes avec la littérature. Les plantes cultivées en condition Fe 25 et Fe 25 apo-pyo présentent des concentrations en chlorophylles très similaires conformément aux résultats présentés ci-dessus. On retrouve également la réduction significative de la teneur en chlorophylles observée pour les plantes de la condition Fe 0 apo-pyo. Enfin, nous pouvons observer que les plantes cultivées dans la condition Fe 0 contiennent significativement moins de chlorophylles que les plantes cultivées dans la condition Fe 25.

Ces résultats supportent les hypothèses suivantes : (i) malgré la forte diminution du fer dans les racines des plantes Fe 25 apo-pyo, la disponibilité/l'homéostasie du fer dans les feuilles ne semble pas affectée et (ii) les plantes Fe 0 et Fe 0 apo-pyo souffrent d'une carence en fer dans les feuilles qui s'illustre par la diminution de leur teneur en chlorophylles.

3.2. Analyse de la production de ROS et de NO en réponse à la pyoverdine

En réponse à un traitement par des sidérophores bactériens, des événements de signalisation précoces de la PTI sont induits dans des suspensions cellulaires de tabac (van Loon *et al*, 2008). Pour compléter les résultats obtenus contre le pathogène *B. cinerea*, à savoir une augmentation de la sensibilité de la plante vis-à-vis du pathogène, nous avons voulu déterminer quels étaient les effets de la pyoverdine de C7R12 sur les événements précoces de la signalisation, et en particulier sur la production de ROS et de NO. Pour identifier l'implication des ROS et du NO dans ces mécanismes, des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* ont été utilisées et des mesures à différents temps après le traitement par la pyoverdine ont été réalisées.

Les résultats de la figure **III.2** présentent une mesure de la production d'H₂O₂ à l'aide du réactif luminol sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* en réponse au peptide flg22, à 25 µM d'apo-pyo ou à 25 µM de ferri-pyo. Le traitement par le témoin positif, le

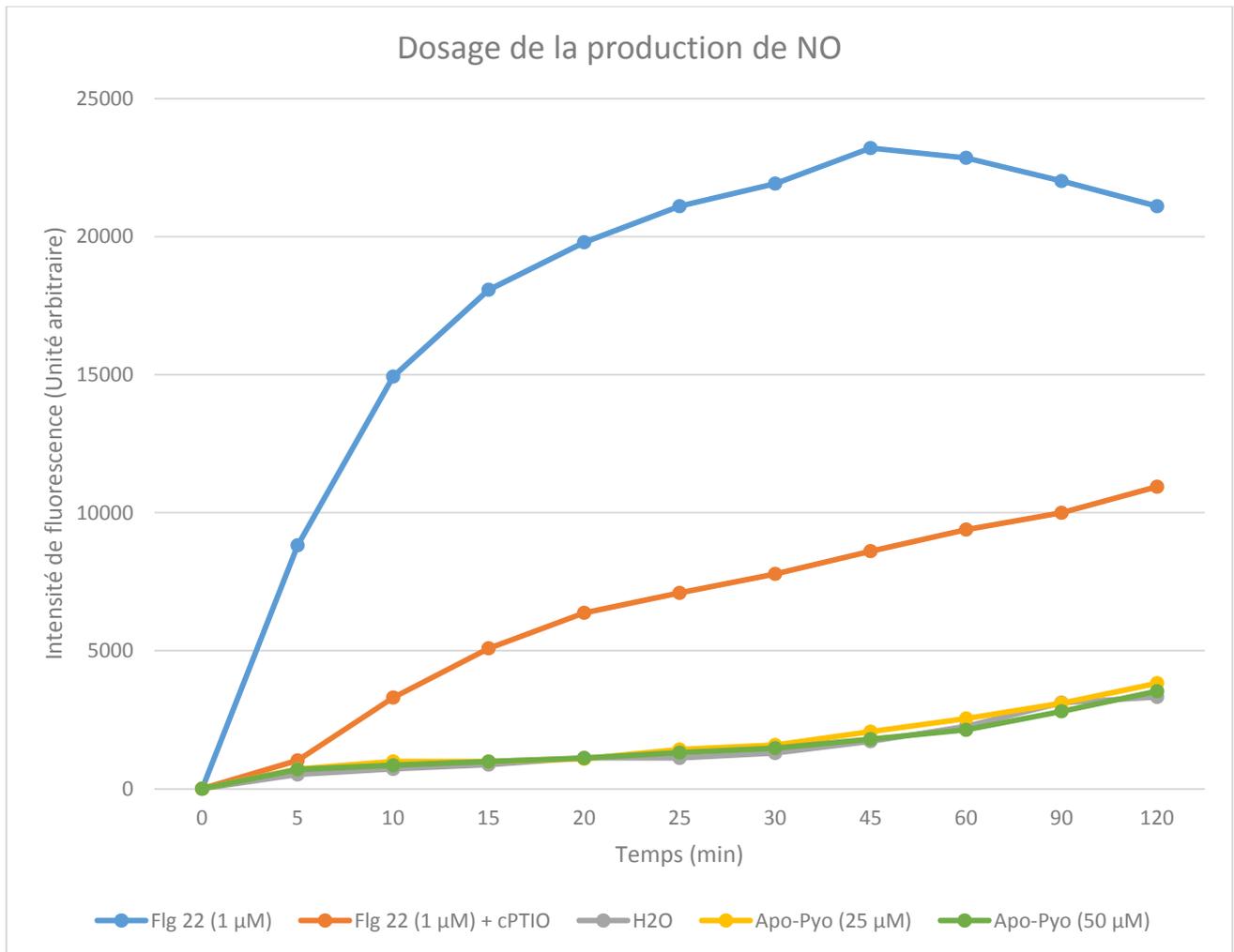


Figure III.3 : Mesure de la production de NO sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* suite à un traitement par (i) le peptide flg22 (1 μM, témoin positif), (ii) de l'apo-pyoverdine (apo-pyo 25 ou 50 μM), et (iii) de l'eau (témoin négatif). La mesure de la production de ROS a été réalisée aux temps 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes. Les résultats présentés sont issus d'une expérience représentative parmi 4 réalisées.

peptide flg22, induit une production de ROS alors que le témoin négatif (eau) ne conduit pas à la production de ROS par les cellules d'*A. thaliana*. Les traitements par l'apo-pyo et par la ferri-pyo conduisent à une réponse identique au traitement par l'eau, indiquant donc que dans ces conditions la molécule de pyoverdine, sous forme apo ou chélatée au fer ne conduit pas à la production de ROS par les suspensions cellulaires d'*A. thaliana*.

La production de NO a également été mesurée sur des suspensions cellulaires d'*A. thaliana* à l'aide de la sonde extracellulaire DAF-2 en réponse à l'éliciteur flg22 ou en réponse à différentes concentrations d'apo-pyo. La figure III.3 présente les résultats d'une expérience représentative. Tout comme pour la production de ROS, nous pouvons constater que le traitement par le peptide flg22 (1 μ M) induit une augmentation de la production de NO traduite par une augmentation de la fluorescence. L'ajout du piègeur de NO (flg 22 + cPTIO 500 μ M) atténue fortement le signal ce qui nous permet de conclure que le signal observé en réponse à flg22 est bien le résultat de la production de NO par les cellules. En revanche, tout comme pour le dosage de ROS, aucune production de NO n'a été détectée suite au traitement par l'apo-pyo (25 et 50 μ M).

Ces résultats sont cohérents avec la susceptibilité observée en réponse à *B. cinerea* suite à un traitement par l'apo-pyo. Ces observations laissent supposer que la pyoverdine n'induit pas la mise en place des mécanismes de défense.

3.3. Test de sensibilité à la bactérie pathogène *P. syringae* pv *tomato* DC3000

D'après les résultats précédents, le traitement par l'apo-pyo ne semble ni induire des événements précoces de réponses de défense ni induire de protection vis-à-vis du pathogène nécrotrophe *B. cinerea*. En revanche, on ne sait pas quel effet l'apo-pyo peut avoir vis-à-vis d'un pathogène hémibiotrophe de la famille des *Pseudomonas* potentiellement capable de récupérer la pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 pour optimiser son propre développement.

Après cinq semaines de culture en milieu complet, les plantes d'*A. thaliana* ont été prétraitées (en milieu Fe 0 ou Fe 25) pendant 24h puis transférées dans un milieu frais identique à celui utilisé lors du prétraitement complémenté ou non de 25 μ M d'apo-pyo (Fe 25, Fe 25 apo-pyo, Fe 0, Fe 0 apo-pyo). Après trois jours de traitement, les feuilles des plantes ont été infectées par infiltration avec la bactérie *P. syringae* pv *tomato* DC3000. La

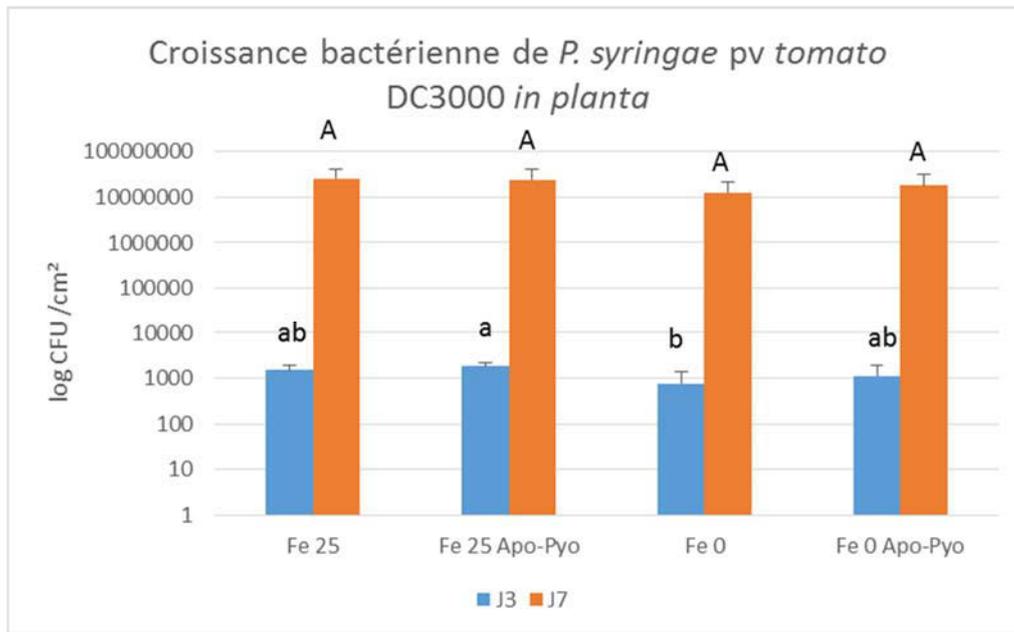


Figure III.4 : Evaluation du développement de l'infection causée par *P. syringae* pv *tomato* DC3000 dans les feuilles d'*A. thaliana*

L'histogramme représente la concentration bactérienne présente dans les feuilles d'*A. thaliana* infectées par *P. syringae* pv *tomato* DC3000 directement après l'infection (J3) et 3 jours après l'infection (J7 correspondant à 4 jours post-inoculation). Un test ANOVA a été réalisé entre les différents traitements pour un même temps, les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes en haut des histogrammes.

III. Chapitre 1

concentration bactérienne dans les feuilles a été évaluée par comptage sur boîte juste après l'infection (0 jour après inoculation, 0 jpi) et 3 jours plus tard (3 jpi). D'après les résultats obtenus présentés dans la figure **III.4**, ni le statut en fer de la plante, ni le traitement par la pyoverdine ne semblent affecter le développement de la bactérie *in planta*.

Ces résultats indiquent que la pyoverdine ne modifie pas le potentiel de défense d'*A. thaliana* contre ce pathogène, contrairement à l'infection causée par *B. cinerea*. Ces deux pathogènes ayant des cycles de développement différents (nécrotrophe/hémibiotrophe), la plante n'active pas les mêmes voies de défense pour se protéger (JA-Et/SA). Il est donc parfaitement concevable que la pyoverdine puisse avoir un effet négatif sur une seule de ces deux voies de défense qui sont généralement antagonistes. Ce résultat peut aussi s'expliquer (i) par l'incapacité de *P. syringae* pv *tomato* DC3000 de reconnaître et internaliser la pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 probablement due à l'absence de récepteur spécifique, et/ou (ii) par l'absence ou la présence trop faible de pyoverdine pour avoir un effet significatif dans les tissus foliaires. Cette seconde hypothèse est appuyée par les données présentées dans l'article (**§ 4.Results.1** du chapitre 3) qui montrent que peu de pyoverdine est transportée vers les parties aériennes de la plante.

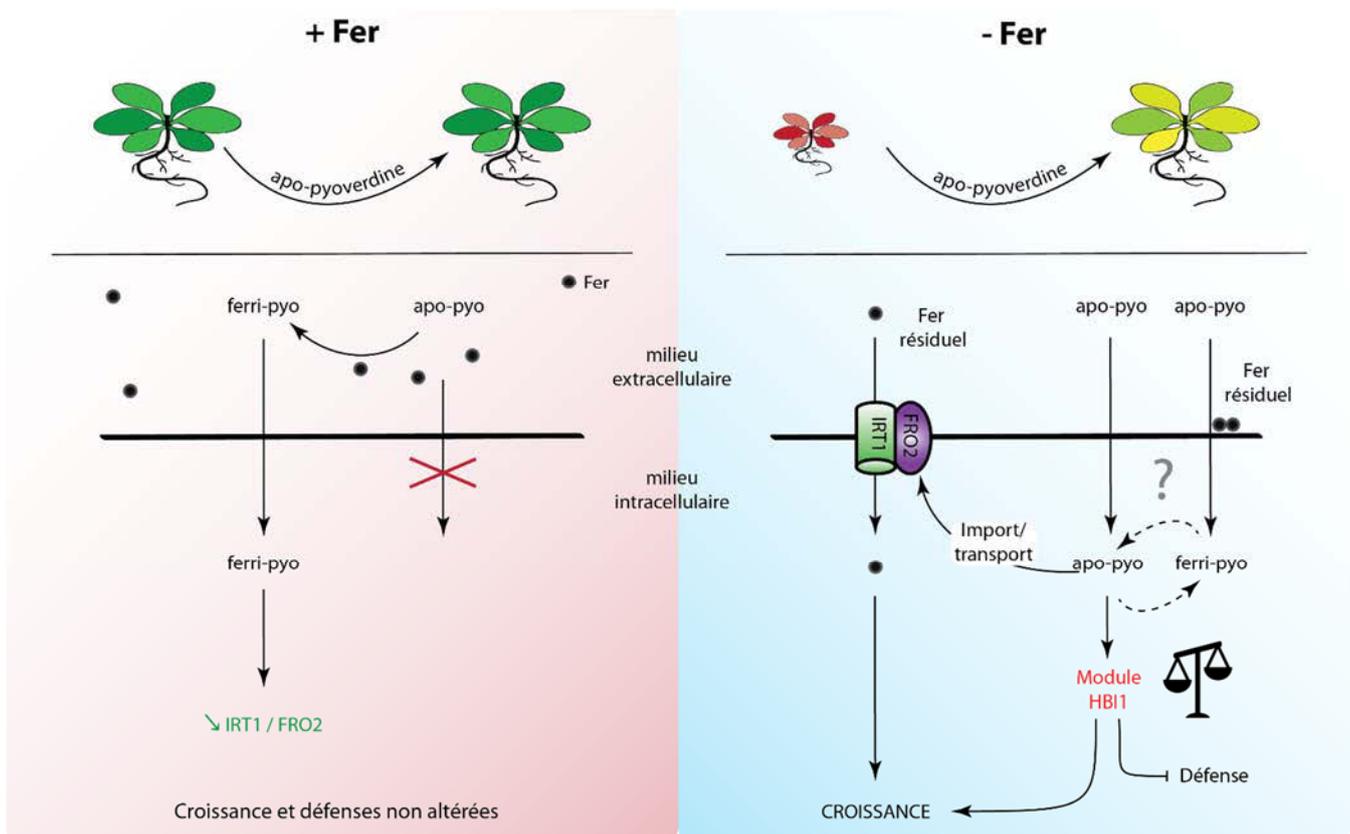


Figure III.5 : Mode d'action putatif de l'apo-pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 chez *A. thaliana* en présence ou en absence de fer dans le milieu nutritif.

Dans les deux conditions de culture, carence ou non, une partie de la pyoverdine apportée dans le milieu nutritionnel est assimilée par la plante et s'accumule dans les racines et, dans une moindre mesure, dans les feuilles. La présence ou non de fer dans le milieu ne semble pas impacter le taux d'assimilation du sidérophore. En revanche, l'incidence de l'apo-pyoverdine sur des traits physiologiques de la plante (croissance, défense et homéostasie du fer) est dépendante de son statut nutritionnel :

- lorsque les plantes sont cultivées en présence de fer, l'apo-pyoverdine chélate ce dernier dans le milieu extracellulaire et, en conséquence, réduit le taux du fer dans les racines sans toutefois altérer celui de la partie aérienne. Il est vraisemblable que l'apo-pyoverdine soit assimilée sous forme de ferri-pyoverdine et participe à l'alimentation en fer de la plante. Ce processus, qui se manifeste par une répression de l'expression des transcrits *IRT1* et *FRO2*, ne modifie pas la croissance de la plante ni sa résistance à *B. cinerea*.

- lorsque les plantes sont cultivées en absence de fer, l'apport d'apo-pyoverdine dans le milieu annule le phénotype de carence. Ce phénomène s'accompagne d'une forte reprogrammation de l'expression génique manifestée en particulier par une surexpression des gènes codant des protéines associées à la croissance et à l'import/redistribution du fer *in planta*. L'induction du système d'import/transport de fer pourrait s'expliquer par une assimilation de la pyoverdine sous forme d'apo-pyoverdine (non chélatée au fer) et la capacité de cette dernière à chélater le fer *in planta*. Il est également envisageable que l'apo-pyoverdine chélate du fer résiduel présent à la surface des racines ou dans l'apoplasme. Ces deux processus, croissance et import du fer, sont fortement liés dans la mesure où l'effet promoteur de croissance de l'apo-pyoverdine est invalidé chez les mutants *irt1* et *fro2*. L'effet bénéfique de l'apo-pyoverdine sur la croissance se fait aux dépens de ses défenses comme en témoignent une répression de l'expression de gènes de défense et une moindre résistance à l'encontre de *B. cinerea*. Il est plausible que cette priorisation en faveur de la croissance implique l'activation du facteur de transcription HBI1 et l'inhibition de son régulateur négatif IBH1 par PRE1.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons appréhendé les effets de la pyoverdine issue de la PGPR *P. fluorescens* C7R12 sous forme non chélatée au fer (apo-pyo) sur la plante modèle *A. thaliana* en condition ou non de carence en fer. Des plantes cultivées en hydroponie ont été traitées pendant une semaine à l'aide d'un milieu nutritif complet (Fe 25) ou déficient en fer (Fe 0) additionné ou non de 25 μ M d'apo-pyo. Ces conditions se rapprochent des conditions naturelles. En effet, dans le sol, les sidérophores sont produits par les bactéries en situation de carence en fer sous forme apo. Les pyoverdines sont notamment connues pour jouer un rôle important dans le phénomène de génération de sols suppressifs ou résistants notamment *via* la compétition créée pour l'acquisition du fer vis-à-vis des autres microorganismes (Lemanceau *et al*, 1993, 2009). Dans notre étude, en absence de fer, l'apo-pyo induit une amélioration de la croissance racinaire et foliaire et supprime le phénotype de carence en fer (Fe 0 apo-pyo vs Fe 0, figure III.5). Ces résultats sont originaux car les autres études qui se sont intéressées aux effets des sidérophores sur les plantes ne les ont pas utilisés sous forme apo en conditions de carence en fer (Vansuyt *et al*, 2007 ; Nagata *et al*, 2013 ; Aznar *et al*, 2014). Nos analyses se sont donc concentrées sur la condition Fe 0 apo-pyo et nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes l'apo-pyo pouvait conduire à cette augmentation de croissance/réversion du phénotype de carence et de déterminer quelles en étaient les conséquences pour la physiologie de la plante.

4.1. La pyoverdine est internalisée par les racines d'*A. thaliana*

Les études de Vansuyt *et al* (2007) et de Shirley *et al* (2011) ont montré que la ferri-pyo de *P. fluorescens* C7R12 est internalisée au niveau des racines d'*A. thaliana* cultivée *in vitro*. Tout d'abord, il était nécessaire de vérifier que dans nos conditions de culture, les plantes étaient également capables d'assimiler l'apo-pyo. A l'aide d'anticorps anti-pyo (capables de reconnaître les formes apo- et ferri-), nous avons démontré par un test ELISA que la pyoverdine est détectable dans les tissus racinaires d'*A. thaliana*, et donc confirmé que la pyo est internalisée par les racines d'*A. thaliana*. En revanche, aucun signal n'a été détecté dans les tissus foliaires. Le traitement des plantes avec de l'apo-pyo marquée au ^{15}N nous a permis de démontrer que (i) de l'azote marqué issu de la pyoverdine est retrouvé dans les tissus racinaires et dans les tissus foliaires mais en moindre quantité et que (ii) la même quantité de pyo est assimilée par la plante quelle que soit la

concentration en fer du milieu. Ces résultats nous permettent de supposer que (i), une fois dans les cellules de la plante, la pyo est dégradée et utilisée dans le métabolisme de la plante ou que (ii) la pyo est transportée dans la plante des racines vers les feuilles et serait dans ce cas un composé systémique (figure III.5). Des analyses de microscopie réalisées au laboratoire par Laure Avoscan supportent cette seconde hypothèse. En effet, la pyoverdine est localisée dans le système conducteur racinaire, c'est à dire, dans les tubes du phloème, dans le cytoplasme des cellules du parenchyme phloémien associées (ensemble de cellules spécialisées dans la conduction de la sève élaborée) ainsi que, dans les vaisseaux du xylème (ensemble de cellules spécialisées dans la conduction de la sève brute) (communication personnelle L. Avoscan). En revanche, aucun élément ne nous permet actuellement de dire sous quelle forme (apo ou ferri) la pyoverdine est assimilée et ce qu'il en advient dans la plante.

4.2. La pyoverdine améliore la croissance de la plante

Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative de croissance en réponse à l'apo-pyo dans la condition Fe 25. En revanche, le phénotype de croissance réduite et l'induction de la production d'anthocyanes induits par la carence en fer sont annulés suite au traitement par l'apo-pyo en condition de carence en fer (Fe 0 apo-pyo)(figure III.5.). Les résultats publiés par Vansuyt *et al* (2007) rapportent eux-aussi une augmentation de croissance sur des plantes d'*A. thaliana* soumises à une carence en fer suite à leur traitement par la ferri-pyo. Cette augmentation de croissance est même supérieure à celle observée en réponse à un traitement par du fer chélaté à de l'EDTA. Ce constat a également été fait dans une étude similaire à celle de Vansuyt *et al.* (2007) s'intéressant aux effets de l'apport de ferri-pyo dans un milieu carencé en fer sur des plants de tomate (Nagata *et al*, 2013). La tomate, tout comme *A. thaliana*, utilise la stratégie I d'assimilation du fer. Les résultats de Nagata *et al* (2013) montrent que des plants de tomates, dont l'apport de fer est réalisé sous forme de fer ferrique non chélaté (Fe^{3+}), présentent les caractéristiques d'une plante carencée en fer avec un retard de croissance et une chlorose. Ce phénotype de carence est annulé par l'ajout de ferri-pyo (Fe^{3+} -pyo) ou de fer ferreux directement assimilable (Fe^{2+}). En revanche, dans cette étude, le traitement par la ferri-pyo n'induit pas d'augmentation de croissance par rapport aux plantes contrôles traitées directement par du fer ferreux. Ces deux études semblent donc indiquer que la pyoverdine améliore la croissance *via* une amélioration de la disponibilité

III. Chapitre 1

du fer. Il est cependant très difficile de comparer ces résultats aux nôtres étant donné que Vansuyt *et al* (2007) et Nagata *et al* (2013) apportent de la ferri-pyo alors que nous apportons de l'apo-pyo dans un milieu carencé en fer.

Dans notre étude, l'augmentation de croissance est donc plus complexe que l'effet nutritionnel observé précédemment (augmentation de la disponibilité du fer) et pourrait s'expliquer par l'induction de l'expression de nombreux gènes liés au développement et à l'élongation cellulaire dont de nombreuses expansines dans la condition Fe 0 apo-pyo vs Fe 0 (figure III.5). L'étude transcriptomique que nous avons menée indique également que la pyoverdine affecte l'expression de nombreux gènes impliqués dans les voies hormonales ainsi que des gènes impliqués dans l'homéostasie et/ou la redistribution du fer.

4.3. La pyoverdine modifie l'homéostasie du fer de la plante

Malgré une forte diminution des stocks de fer dans les racines des plantes traitées par l'apo-pyo en Fe 25, ces dernières ne présentent pas de signe phénotypique d'une carence en fer, pas de réduction de la croissance, ni de la quantité de chlorophylle. Cependant, la réponse transcriptionnelle à la condition Fe 25 apo-pyo est en grande partie similaire à celle observée en réponse à la carence en fer par Schuler *et al* (2011). Les données de dosage du fer dans le milieu montrent qu'en présence de fer et d'apo-pyo la quantité de fer dans le milieu reste constante, ce qui nous permet de supposer que l'apo-pyo chélate le fer du milieu qui devient indisponible pour la plante. Ce n'est probablement pas le seul mécanisme mis en jeu car la pyoverdine semble induire chez la plante une importante remobilisation du fer permettant à la plante de ne pas souffrir, au moins au niveau macroscopique, de la carence. Cet effet pourrait être dû à la capacité de chélation du fer *in planta* de la pyoverdine (figure III.5). Les plantes Fe 25 apo-pyo répriment notamment l'expression des gènes *AtFER1* et *AtFER3* (impliqués dans le stockage du fer) mais, contrairement à l'étude de Schuler *et al* (2011), répriment également l'expression des gènes *IRT1* et *FRO2* (impliqués dans l'import de fer).

En condition de carence en fer, l'analyse transcriptomique révèle une hyper activation de l'expression des gènes liée à l'import (*AtIRT1*, *AtFRO2*) ou au transport de fer *in planta* (*AtOPT3* et *AtNAS4*) (figure III.5). L'expression d'autres gènes marqueurs de la carence en fer ou impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer est également augmentée telle

III. Chapitre 1

celles des facteurs de transcription *AtFIT*, *AtORG2* et *AtORG3*, mais aussi celle du gène *AtBGLU42*, impliqué dans l'excrétion de composés phénoliques en réponse à la carence en fer (Zamioudis *et al*, 2014). Cette réponse transcriptionnelle atteste d'une dérégulation ou d'une modification de l'homéostasie du fer dans la plante. Ces modifications semblent permettre aux plantes Fe 0 apo-pyo de ne pas souffrir de la carence, à l'exception d'une légère chlorose parfois visible après sept jours de traitement. Aznar *et al* (2014) ont émis l'hypothèse que l'infiltration de la DFO sous forme apo induit une carence en fer locale dans les cellules de la plante, ce qui aboutit *in fine* à l'activation de la réponse à la carence dans la plante (activation d'*IRT1* et *FRO2*) et donc à l'import du fer présent dans le milieu. Les dosages de fer que nous avons effectués dans les plantes Fe 0 apo-pyo ont révélé que la quantité de fer dans les racines de ces plantes est drastiquement réduite après trois jours de traitement alors que la concentration en fer des feuilles est semblable à celle des plantes cultivées dans un milieu contenant du fer sans apo-pyo (figure III.5). Dans la condition Fe 0 apo-pyo, le fer étant absent du milieu, nous pouvons imaginer que (i) la pyoverdine entre sous forme apo (non chélatée au fer) et chelate le fer présent dans la cellule (fer lié aux ferritines ou présent dans les centres fer-soufre par exemple) conduisant à la sur-activation du système d'import, ou (ii) qu'elle chelate le fer adsorbé sur les racines et entre sous forme ferri-pyo améliorant l'import du fer résiduel (figure III.5). Il est important de préciser ici que l'augmentation de la croissance par la pyoverdine est intimement liée à ses effets sur l'homéostasie du fer. En effet, chez des plantes délétées pour *IRT1* ou *FRO2*, l'augmentation de croissance induite par la pyoverdine en condition de carence en fer (Fe 0 apo-pyo vs Fe 0) est fortement réduite comparée à celle des plantes sauvages. L'induction des mécanismes d'import de fer contribue à l'effet de promotion de la croissance même si actuellement nous ne connaissons pas le rôle exact de cette régulation. Concernant la concentration en fer qui est maintenue dans les feuilles des plantes Fe 0 apo-pyo, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'apo-pyo agit sur l'homéostasie du fer permettant à la plante de remobiliser efficacement le fer stocké dans les racines vers les feuilles. Ainsi, les plantes traitées par l'apo-pyo en milieu Fe 0 semblent être bien plus tolérantes à la carence en fer que les plantes non traitées par le sidérophore à sept jours de traitement. L'hypothèse d'une remobilisation du fer suite à un traitement par l'apo-pyo est supportée par l'induction de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport de fer *in planta* dont *AtNAS4* qui code une nicotianamine synthase. L'étude de Koen *et al* (2013a) montre

que ce gène est impliqué dans la réponse à la carence en fer chez *A. thaliana* et est responsable de la synthèse d'une importante partie de la nicotianamine (NA) de la plante. La NA est un acide aminé non-protéique impliqué dans le transport phloémique du fer et dans sa redistribution *in planta* en particulier aux jeunes feuilles. Ainsi, l'induction de l'expression du gène *NAS4* suggère une production plus importante de NA, et donc potentiellement une plus grande capacité de la plante à transporter son fer (figure III.5).

Dans leur ensemble, nos résultats sont différents de ceux publiés par Vansuyt *et al* (2007) et Aznar *et al* (2014). En effet, dans ces deux études, le traitement par le sidérophore induit une augmentation du fer dans les racines d'*A. thaliana*. En revanche, des similarités existent entre nos résultats et ceux de Nagata *et al* (2013). Dans cette étude, la quantité de fer dans les feuilles est maintenue en présence de ferri-pyo alors que les plantes en situation de carence en fer (*via* l'apport de fer ferrique non directement assimilable) présentent une diminution de concentration en fer foliaire. De plus, les auteurs ont quantifié une diminution de fer significative dans les racines de plantes traitées par la ferri-pyo comparativement aux plantes contrôles traitées directement avec du fer ferreux. Les auteurs observent en particulier une répression de *SIFRO1* en réponse à la ferri-pyo et supposent qu'elle est due au maintien de la concentration en fer dans les feuilles. Un mécanisme similaire pourrait également exister chez *A. thaliana*. Toutefois, pour différentes raisons, il est difficile de réaliser une comparaison directe avec ces trois études. Tout d'abord, les conditions de traitement sont différentes. Aucune de ces études ne se place dans un milieu totalement carencé en fer : le fer est soit présent dans le milieu (Aznar *et al*, 2014) soit apporté sous forme de ferri-sidérophore (Vansuyt *et al*, 2007 ; Nagata *et al*, 2013). Les méthodes de traitement sont également différentes avec soit une infiltration des feuilles (Aznar *et al*, 2014) soit un ajout de ferri-pyo au niveau des racines de plantes cultivées en boîte de Pétri (Vansuyt *et al*, 2007) ou au niveau du milieu liquide après culture sur boîte de Petri (Nagata *et al*, 2012). Enfin, signalons qu'Aznar et ses collaborateurs (Aznar *et al*, 2014) utilisent un sidérophore différent, la DFO, et que Nagata *et al* (2012) utilisent de la pyoverdine issue d'une autre souche de *P. fluorescens*. Les effets des sidérophores même structurellement proches étant très variables, il est probable que cela contribue aux différences observées ici.

L'ensemble des données obtenues (phénotypage, dosage de fer et analyse transcriptomique) sur l'effet de l'apo-pyo sur l'homéostasie du fer de la plante en

condition de suffisance ou de carence en fer suggèrent que la pyoverdine pourrait être détectée par la plante à l'aide d'un récepteur ou d'un senseur. La détection de pyo sous forme apo (non chélatée au fer) pourrait indiquer à la plante que le milieu extérieur est extrêmement pauvre en fer et que cette dernière doit activer davantage ses mécanismes de réponse à la carence et de remobilisation du fer. Dans le cas d'une détection de pyoverdine sous forme ferri, la plante pourrait toujours activer la remobilisation du fer mais bloquer son import. Ainsi, la détection de ferri-pyo serait à l'inverse interprétée comme un signal indiquant une présence importante de fer dans le milieu et donc un risque de stress oxydatif et de toxicité dûs au fer. Il est intéressant de signaler que les bactéries disposent de récepteurs capables de différencier l'apo- de la ferri-pyo et d'induire ou non en retour l'assimilation de la pyoverdine et l'activation de facteurs de transcription σ (Schalk *et al*, 2001; Visca *et al*, 2007). Ainsi, l'existence de récepteurs ou de senseurs chez la plante capables de faire le *distinguo* entre les deux formes de pyoverdine et d'induire une réponse adaptée est envisageable. D'autre part, l'étude de Dellagi *et al* (2005) indiquant que le traitement de plantes d'*A. thaliana* par des sidérophores (CB et DFO) chélatés ou non au fer induit une réponse transcriptionnelle différente notamment sur le gène *AtFER1* appuie également cette hypothèse.

4.4. La pyoverdine diminue le taux d'ABA des plantes cultivées dans un milieu carencé en fer

Etant donné l'effet de répression majeure de l'apo-pyo en milieu Fe 0 sur l'expression des gènes impliqués dans la voie du SA et de l'ABA, nous avons dosé différentes hormones dans les plantes. Nous avons en particulier détecté une augmentation significative du taux d'ABA dans les plantes Fe 0 qui n'est plus visible dans les plantes traitées par l'apo-pyo en Fe 0. Il a été précédemment montré que l'ABA atténue les effets de la carence en fer *via* l'activation de mécanismes de remobilisation du fer (Lei *et al*, 2014). Le fait que d'une part l'ABA soit présent en faible quantité en réponse à la pyo et que d'autre part les gènes *FRD3*, *YSL2* et *NAS1* dont l'expression est induite dans l'étude de Lei *et al* (2014) ne le soient pas dans notre étude indique que la remobilisation du fer induite par la pyo passe probablement par des mécanismes différents de ceux mis en place suite à une accumulation d'ABA consécutive à la carence en fer.

4.5. La pyoverdine affecte négativement les réponses de défense de la plante en condition de carence en fer

Comme l'indiquent les résultats de l'étude transcriptomique, en réponse à un traitement par l'apo-pyo dans des conditions de carence en fer, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques est diminuée. La répression des gènes de réponse aux stress abiotiques peut-être corrélée à l'absence du phénotype de carence en fer. En revanche, il était assez inattendu d'observer la répression de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et de gènes répondant à des hormones connues pour être impliquées dans la mise en place des défenses de la plante. Il aurait été logique d'observer un effet bénéfique de la pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 sur les défenses des plantes, car *P. fluorescens* C7R12 est connue pour être une bactérie de biocontrôle (Eparvier *et al*, 1991; Lemanceau & Alabouvette, 1991). De plus, les sidérophores bactériens issus des bactéries du genre *Pseudomonas* ont été décrits comme pouvant être des déterminants permettant l'induction de l'ISR et des réactions de défense de la plante (van Loon *et al*, 2008). Les résultats de l'analyse transcriptomique peuvent malgré tout s'expliquer car la pyoverdine ne représente qu'un seul des métabolites produits par la bactérie, l'effet de biocontrôle global de *P. fluorescens* C7R12 doit mettre en jeu d'autres déterminants cellulaires, notamment comme les métabolites aux propriétés antibiotiques (Van Loon, 2007 ; Mazurier *et al*, 2009). De plus la pyoverdine peut contribuer à l'effet de biocontrôle par des effets antagonistes directs comme par exemple la chélation du fer de la rhizosphère conduisant à une compétition qui affecte négativement le développement des microorganismes pathogènes. Les résultats de l'analyse transcriptomique sont néanmoins cohérents avec l'augmentation de la sensibilité au champignon *B. cinerea* et l'absence de production de ROS et de NO en réponse à la pyoverdine.

L'étude des sidérophores issues d'autres microorganismes rapporte également des résultats différents des nôtres (Dellagi *et al*, 2009 ; Aznar *et al*, 2014). En effet, il a été rapporté que la chrysobactine (CB), un sidérophore produit par le pathogène *D. Dadantii*, induit une accumulation de SA et l'expression de gènes de défense activés par le SA. Pourtant, malgré cette activation des défenses, les plantes traitées par la CB et infectées par *D. dadantii* sont plus sensibles que les plantes contrôles (Dellagi *et al*, 2009). Ces résultats indiquent que *D. dadantii* via la CB diminue les défenses de la plantes de manière

à favoriser l'infection (antagonisme SA/JA). D'autre part, Aznar *et al* (2014) ont montré une diminution de l'infection induite par *P. syringae* DC300 après un traitement par la DFO, indiquant ainsi que la protection induite par les sidérophores semble être dépendante du mode de vie du pathogène (nécrotrophe/hémibiotrophe). Ces auteurs ont également montré que l'infiltration de Fe-DFO ou de Fe-CB n'induit pas les réponses de défenses comme celle des sidérophores sous forme apo (Dellagi *et al*, 2005 ; Aznar *et al*, 2014 ; Dellagi *et al*, 2009). Il apparaît que ces apo-sidérophores activent simultanément les mécanismes de défense des plantes et la réponse à la carence en fer. L'étude de Kieu *et al* (2012) indique que des plantes d'*A. thaliana* infectées en condition de carence en fer sont plus résistantes aux pathogènes nécrotrophes *D. Dadantii* et *B. cinerea*. Une étude réalisée au laboratoire sur l'acide β -aminobutyrique (BABA)(Koen *et al*, 2014) appuie d'ailleurs cette hypothèse. En effet, il a été démontré chez *A. thaliana* que la protection conférée par le BABA contre l'infection par *B. cinerea* était dûe en partie à sa capacité de chélation du fer responsable de l'induction d'une carence en fer très rapide mais transitoire *in planta* (3 molécules de BABA chélatant 1 atome de fer). Ainsi, l'ensemble de ces résultats soutient l'existence d'un lien fonctionnel entre la réponse à la carence en fer et la mise en place des défenses.

4.6. La pyoverdine agit sur la balance croissance-défense

Comme mentionné dans l'introduction (§ I.5), en fonction des signaux environnementaux reçus, les plantes modifient l'allocation de leurs ressources énergétiques. Un exemple bien connu de ce phénomène est l'inhibition de croissance ou SGI (*seedling growth inhibition*) mise en place en réponse à un PAMP tel que flg22 ou à un pathogène (Chinchilla *et al*, 2007 ; Vos *et al*, 2013). Ainsi, les plantes ne semblent pas pouvoir dans un même temps présenter une croissance importante et une activation des systèmes de défense. La pyoverdine est issue d'une PGPR. Ce type de bactérie permet généralement l'augmentation de la croissance et le priming des réactions de défense, lequel n'entraîne pas de coûts énergétiques pour la plante mais lui permet de réagir plus fort et plus vite en cas de contact avec un agent pathogène (Pieterse *et al*, 2014).

Contrairement aux pyoverdines testées par van Loon *et al* (2008), la pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 n'induit pas l'ISR, et a même un effet négatif sur la défense en condition de carence en fer. Il est donc envisageable que la pyoverdine de *P. fluorescens* C7R12 modifie la balance croissance-défense de la plante au profit de la croissance dans la

condition Fe 0 apo-pyo. La balance croissance-défense est majoritairement régulée par des dialogues entre les différentes hormones et des interactions (activation/répression) entre molécules impliquées dans la transduction de la signalisation hormonale (De Bruyne *et al*, 2014 ; Huot *et al*, 2014). Parmi l'intégralité des acteurs pouvant être impliqués dans ce phénomène (§ I.5.1 de l'introduction), HBI1 a particulièrement attiré notre attention. En effet, la protéine HBI1 est un facteur de transcription décrit comme étant impliqué dans l'activation de l'élongation cellulaire (Malinovsky *et al*, 2014) et dans la répression des réactions de défense de la plante (Fan *et al*, 2014). HBI1 fait partie d'un module de régulation comportant 3 protéines : HBI1, IBH1 et PRE1. PRE1 libère et active HBI1 en s'associant et en inactivant son inhibiteur IHB1. Dans l'étude menée par Fan *et al* (2014), les plantes surexprimant HBI1 sont caractérisées par une activation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance cellulaire et une répression de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défense de la plante. Ainsi, plusieurs études récentes décrivent HBI1 comme un régulateur positif de la croissance en réponse aux brassinostéroïdes (BR) et un régulateur négatif des réponses de défense (Bai *et al*, 2012a ; Malinovsky *et al*, 2014 ; Lozano-Durán & Zipfel, 2015). Le traitement Fe 0 apo-pyo induit l'expression d'*HBI1* et de *PRE1* et réprime légèrement l'expression d'*IBH1*. Les effets de la pyoverdine pourraient donc s'expliquer en partie par son effet sur le module HBI1/PRE1/IBH1 (figure III.5). Malheureusement, nous ne disposons pas de mutants déficients dans l'expression d'*HBI1*. La réponse du mutant surexprimeur d'*HBI1* en réponse à la pyoverdine n'a pas montré de différence avec celle des plantes sauvages. Ce n'est pas étonnant dans le sens où la pyoverdine a pour effet d'induire l'expression de ce gène et que ce dernier est déjà surexprimé dans les mutants. A l'heure actuelle, nous ne pouvons donc pas affirmer le rôle majeur d'HBI1 dans la réponse des plantes à la pyoverdine en condition de carence en fer.

4.7. Conclusions et perspectives

Les différents résultats obtenus nous ont permis de comprendre certains effets de l'apo-pyo sur *A. thaliana*. Tout d'abord, nous avons observé une annulation du phénotype de stress induit par la carence en fer suite au traitement par l'apo-pyo (figure III.5). Nous avons également observé un important effet de la pyoverdine sur l'homéostasie du fer dans la plante. L'apo-pyo pourrait activer la remobilisation et la redistribution des réserves de fer présentes dans les racines vers les parties aériennes de la plante (figure

III.5). Pour valider cette hypothèse, des dosages de fer sur des plantes invalidées pour le transport (*nas4*, *frd3*, *ysl2*) ou la remobilisation du fer (*nramp3/4*) permettraient d'identifier les mécanismes utilisés par la pyoverdine. Malgré un phénotype amélioré suite à sept jours de carence en fer, il est concevable qu'à plus long terme (plusieurs semaines/génération suivante), cet effet devienne délétère pour la survie de la plante. Pour avoir une vision plus large de l'effet de la pyoverdine, des expériences sur des temps plus longs, des tests de germination et des dosages de fer sur les graines issues de plantes traitées pourraient être menées. Nous avons également observé que le traitement par l'apo-pyo affecte positivement la croissance et négativement les défenses de la plante contre un pathogène nécrotrophe (figure **III.5**). Ainsi, ces résultats nous amènent à penser que l'apo-pyo affecte la balance croissance-défense. Les études de Fan *et al* (2014) et Malinovsky *et al* (2014) ont mis en évidence l'importance du facteur de transcription HBI1 dans le contrôle de cette balance. L'analyse phénotypique des mutants surexprimant HBI1 n'ayant pas montré de différence en réponse à l'apo-pyo avec les plantes sauvages, il sera nécessaire de valider l'implication d'HBI1 par des expériences complémentaires. Il serait intéressant de doser les brassinostéroïdes par exemple ou de comparer la résistance à *B. cinerea* des plantes surexprimant HBI1 en réponse à l'apo-pyo à celle des plantes sauvages.

Pour conclure, le traitement par la pyoverdine affecte de nombreuses fonctions de la plante, l'homéostasie du fer, la croissance et la défense. De multiples connexions et liens existent entre ces trois fonctions ce qui rend l'analyse et l'interprétation des effets de la pyoverdine complexes.

CHAPITRE 2

Etude du mode d'action du BABA et liens avec
l'homéostasie du fer chez *A. thaliana*

IV. Etude du mode d'action du BABA et liens avec l'homéostasie du fer chez *A. thaliana*

1. Contexte de l'article et principaux résultats

1.1. Présentation de l'acide β -aminobutyrique

L'acide β -aminobutyrique ou BABA est un acide aminé non-protéique découvert dans les années 1960 (Conrath *et al*, 2015). Il a depuis été beaucoup étudié car il protège de nombreuses plantes contre un large spectre de stress biotiques et abiotiques et a été décrit comme un potentialisateur des réponses de défense des plantes (Conrath *et al*, 2006). En effet, il n'induit pas directement les réactions de défense comme un PAMP mais lorsqu'il est utilisé en pré-traitement ces dernières sont mises en place plus rapidement et sont plus intenses lors d'un stress ultérieur. Le BABA agit par différents mécanismes suivant le type d'interaction. Par exemple, les effets du BABA sur *A. thaliana* contre deux pathogènes nécrotrophes (*Alternaria brassicicola* et *Plectosphaerella cucumerina*) sont liés au renforcement des dépôts de callose dépendant de la phytohormone ABA (Ton & Mauch-Mani, 2004). La résistance aux hémibiotrophes est quant à elle liée à la capacité du BABA à activer les défenses induites par le SA, par exemple l'induction de l'expression d'*AtPR1* (Ton *et al*, 2005). Des progrès récents ont été réalisés dans la compréhension du mode d'action du BABA. En particulier, Po-Wen *et al* (2013) ont montré que le BABA induit des modifications de la chromatine importantes pour la potentialisation des réactions de défense. Il a également été mis en évidence une accumulation d'acide pipécolique en réponse à *P. syringae* (Návarová *et al*, 2012). Dernièrement, un récepteur du BABA a été caractérisé (Luna *et al*, 2014). Il s'agit d'IBI1, une aspartyl-tRNA synthétase. La fixation du BABA à la place du résidu aspartyl induit un changement d'activité de l'enzyme qui passe de son activité classique à une activité dans les réactions de défense. Malgré ces nouvelles données, de nombreuses zones d'ombre persistent sur les effets du BABA *in planta*.

1.2. Contexte et objectifs de l'étude

Cette étude a été initiée suite au constat suivant : le BABA présente toutes les caractéristiques d'une molécule pouvant chélater le fer. Ainsi, compte tenu des études de plus en plus nombreuses proposant une connexion fer-défense, un lien entre les effets

protecteurs du BABA et son pouvoir potentiel de chélation du fer était envisageable. Cette étude avait donc pour objectifs d'analyser et de comprendre les effets du BABA sur l'homéostasie du fer de la plante et ses conséquences sur la défense et la physiologie de la plante afin de mieux appréhender son mode d'action *in planta*.

1.3. Résultats principaux

Dans l'article suivant, il a été démontré par voltamétrie et spectroscopie que trois molécules de BABA sont capables de former *in vitro* un complexe stable hexacoordonné avec un atome de fer (Fe^{3+}). Un traitement par le BABA pendant 24 heures sur des plantes d'*A. thaliana* cultivées en hydroponie conduit après 4 jours à l'apparition d'un phénotype caractérisé par une taille réduite ainsi qu'une coloration violette des tissus foliaires. Ce phénotype est intermédiaire entre celui observé sur des plantes carencées en fer de manière transitoire ou de manière prolongée. Une analyse métabolomique globale a en outre révélé que les plantes traitées par le BABA ou dans une situation de carence en fer accumulent des métabolites communs, des anthocyanes mais aussi la *p*-coumaroylagmatine, une molécule connue pour jouer un rôle dans les défenses lors de l'attaque de pathogènes. Enfin, les profils d'expression des gènes *AtIRT1*, *AtFRO2*, *AtNAS4* et *AtFER1* en réponse au BABA et à la carence en fer sont également comparables. Tous ces éléments indiquent que le traitement par le BABA induit une carence en fer transitoire dans la plante. En revanche, le dosage de fer a révélé que les plantes traitées par le BABA ne présentent pas de réduction de la teneur en fer. Ainsi, il semblerait que le BABA affecte l'homéostasie du fer *in planta*, sa disponibilité et sa distribution plutôt que son assimilation. Enfin, nous avons démontré que la protection d'*A. thaliana* contre *B. cinerea* conférée par le BABA peut être mimée par une carence en fer. Les résultats de cette étude mettent en évidence un lien fonctionnel entre les effets protecteurs du BABA et la perturbation de l'homéostasie du fer de la plante.

1.4. Ma contribution

Cette étude a débuté avant mon arrivée au laboratoire, Emmanuel Koen et Angélique Besson-Bard étaient majoritairement impliqués dans la réalisation des expériences de ce sujet. Après la première soumission de l'article et le retour des rapports d'expertise, plusieurs expériences ont dû être réalisées. J'ai participé à la réalisation de ces dernières. J'ai notamment mis au point et réalisé plusieurs expériences d'infection par *P. syringae*

IV. Chapitre 2

sur des plantes d'*A. thaliana* cultivées en hydroponie (milieu complet avec ou sans BABA, carence en fer transitoire ou prolongée). J'ai également participé à la réalisation des tests d'activité ferrique réductase (FRO) sur des racines de plantes cultivées *in vitro*. L'article a ensuite été resoumis et accepté en juillet 2014.

2. Article scientifique n°2 :
Beta-Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in
***Arabidopsis thaliana*: Link with Iron Homeostasis**

(Données complémentaires sur CD-ROM joint au manuscrit :
Figure S1 à S5 et tableau S1)

β -Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in *Arabidopsis thaliana*: Link with Iron Homeostasis

Emmanuel Koen,^{1,2,3} Pauline Trapet,^{1,2} Daphnée Brulé,^{1,2} Anna Kulik,^{2,4} Agnès Klinguer,^{2,4} Livia Atauri-Miranda,⁵ Rita Meunier-Prest,⁶ Gilles Boni,⁶ Gaétan Glauser,⁷ Brigitte Mauch-Mani,⁵ David Wendehenne,^{1,2} and Angélique Besson-Bard^{1,2}

¹Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France; ²ERL CNRS 6300, BP 86510, 21000 Dijon, France; ³AgroParisTech, ENGREF, 75015 Paris, France; ⁴INRA, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France; ⁵Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Institut de Biologie, Université de Neuchâtel, 2009 Neuchâtel, Switzerland; ⁶Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne–UMR CNRS 6302, BP 47870, 21000 Dijon, France; ⁷Chemical Analytical Service of the Swiss Plant Science Web, University of Neuchâtel, 2000 Neuchâtel, Switzerland

Submitted 19 May 2014. Accepted 10 July 2014.

β -Aminobutyric acid (BABA) is a nonprotein amino acid inducing resistance in many different plant species against a wide range of abiotic and biotic stresses. Nevertheless, how BABA primes plant natural defense reactions remains poorly understood. Based on its structure, we hypothesized and confirmed that BABA is able to chelate iron (Fe) in vitro. In vivo, we showed that it led to a transient Fe deficiency response in *Arabidopsis thaliana* plants exemplified by a reduction of ferritin accumulation and disturbances in the expression of genes related to Fe homeostasis. This response was not correlated to changes in Fe concentrations, suggesting that BABA affects the availability or the distribution of Fe rather than its assimilation. The phenotype of BABA-treated plants was similar to those of plants cultivated in Fe-deficient conditions. A metabolomic analysis indicated that both BABA and Fe deficiency induced the accumulation of common metabolites, including *p*-coumaroylagmatine, a metabolite previously shown to be synthesized in several plant species facing pathogen attack. Finally, we showed that the protective effect induced by BABA against *Botrytis cinerea* was mimicked by Fe deficiency. In conclusion, the Fe deficiency response caused by BABA could bring the plant to a defense-ready state, participating in the plant resistance against the pathogens.

Iron (Fe), an essential nutrient for both animals and plants, is the fourth most abundant element in the Earth's crust. Paradoxically, it is the third most limiting nutrient for plant development, mainly due to its poor solubility under aerobic conditions. To deal with the limiting amounts of bioavailable Fe, plants have evolved two different strategies to assimilate the metal from the soil. Non-grass plants such as *Arabidopsis thaliana* use the strategy I mechanism, which includes three steps: i) proton release in order to solubilize Fe³⁺ in the soil, ii) re-

duction of Fe³⁺ by a membrane-bound Fe³⁺ chelate reductase (mainly ferric reductase [FRO]2 in *A. thaliana*) (Robinson et al. 1999), and iii) subsequent transport of the resulting Fe²⁺ into the plant root cells by an Fe²⁺ transporter. In *A. thaliana*, the major root Fe transporter is IRT1 (Vert et al. 2002). Strategy II is exclusively used by grasses and involves direct Fe³⁺ chelation by phytosiderophores (PS) and the subsequent uptake of Fe³⁺-PS complexes via specific transporters. Once assimilated by roots, Fe is utilized, sequestered, or transported to other organs. Because Fe³⁺ ions are often precipitated in ferric hydroxides and Fe²⁺ free ions can catalyze the synthesis of hydroxyl radicals through the Fenton reaction, Fe is associated with various molecules such as organic acids. In the xylem sap, Fe is mostly associated with citrate whereas, in the phloem, it might be chelated to nicotianamine (NA) (von Wiren et al. 1999), a nonproteogenic amino acid. More generally, NA plays a key role in iron homeostasis. Indeed, in strategy II plants, NA is an intermediate for the synthesis of mugineic acid family PS. In strategy I plants, NA contributes to iron long-distance circulation in phloem and transfer within the cells, and may act as a sensor for iron availability (Curie et al. 2009; Koen et al. 2013; Schuler et al. 2012). At the subcellular level, plants can cope with Fe scarcity and toxicity by buffering and storing Fe in the apoplast, vacuoles, and plastids. Ferritins are key plastidial proteins able to sequester between 2,000 and 4,000 Fe³⁺ atoms by storing them in their central cavity. These proteins are essential to protect plants against oxidative stresses and to provide iron during developmental processes or environmental stresses (Briat et al. 2010).

Under Fe limitation, plants initiate physiological and morphological responses to increase Fe mobilization and uptake from the soil. In *A. thaliana*, expression of *IRT1*, *FRO2*, and the root specific *bHLH* FER-like iron-deficiency-induced transcription factor (*FIT*) is modulated upon Fe-deficiency. The expression of *FRO2* and *IRT1* is regulated by *FIT* at the transcriptional and post-transcriptional level, respectively (Colangelo and Gueriot 2004). Moreover, *FRO2* is regulated post-transcriptionally by an unknown mechanism (Connolly et al. 2002) and both *IRT1* and *FRO2* expression are induced by local Fe (Vert et al. 2003). Recently, it was shown that *IRT1* is regulated by a monoubiquitin- and clathrin-dependent trafficking in root epidermal cells, enabling its low expression at the cell surface to cope with the toxicity induced by other metal sub-

Corresponding author: A. Besson-Bard; Telephone: +33380693178; Fax: +33380693753; E-mail: angelique.besson-bard@dijon.inra.fr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that five supplementary figures and a supplementary table are published online.

© 2014 The American Phytopathological Society

strates of IRT1 as cadmium (Barberon et al. 2011). Fe deficiency also triggers a decrease in the ferritin level (Petit et al. 2001) and an increase of *NA SYNTHASE (NAS)* transcript accumulation in the roots or in the shoots, depending on the isoform (Bauer et al. 2004). In particular, among the four *NAS* genes present in the *A. thaliana* genome, recent data support a key role of AtNAS4 in iron distribution and proper response to iron deficiency (Koen et al. 2013; Palmer et al. 2013). More generally, between the four AtNASs, the plant response to iron deficiency appears to be mostly determined by AtNAS4 (Koen et al. 2013; Schuler and Bauer 2011).

Plants interact with a variety of microorganisms that are potentially pathogenic. During the interaction, certain microbes produce siderophores which are normally secreted to assimilate Fe from their environment. Siderophores can exert beneficial or negative effects on the host plant. First, because siderophores are able to significantly increase Fe solubility in the soil, they can have a positive effect on plant growth by facilitating Fe assimilation (Chen et al. 1998). For example, pyoverdins, siderophores secreted by fluorescent pseudomonads can be directly imported into *A. thaliana* roots and, subsequently, promote an increase of Fe concentration in planta (Vansuyt et al. 2007). Second, siderophores are also required for the pathogenicity of bacteria and fungi (Expert 1999; Haas et al. 2008). Indeed, by releasing siderophores in plant tissues, microorgan-

isms can import the plant Fe. This process is favored by the highest affinity of microbial siderophores for Fe compared with those of phytosiderophores and other plant Fe carriers. Recent studies showed that plants can counteract this process by establishing an Fe retention strategy characterized by a rise in ferritin synthesis and Fe acquisition (Dellagi et al. 2009; Segond et al. 2009). Notably, it was shown that the induction of the expression of the *FERRITIN1 (FER1)* gene is required for the basal resistance of *A. thaliana* against *Dickeya dadantii*, a bacterium which causes soft rot on a large range of host plant species. In addition, *FRO2* or *IRT1* transcript accumulation is also induced in response to *D. dadantii* infection and bacterial siderophores such as deferrioxamine (Aznar et al. 2014). Recently, the existence of a link between plant iron status and susceptibility or resistance to diseases was highlighted by Kieu and associates (2012). They demonstrated that *A. thaliana* plants grown in Fe-deficient conditions were more resistant to *D. dadantii* and *Botrytis cinerea* infections. The exact mechanism of Fe-starvation-induced resistance in response to *D. dadantii* is not yet elucidated. It has been proposed that this phenomenon might be related to the decrease in plant Fe availability rather than an amplification of the plant defense responses.

β -Aminobutyric acid (BABA) is a nonproteogenic amino acid that potentiates plant defense responses via priming mechanisms and confers resistance to a variety of biotic and abiotic

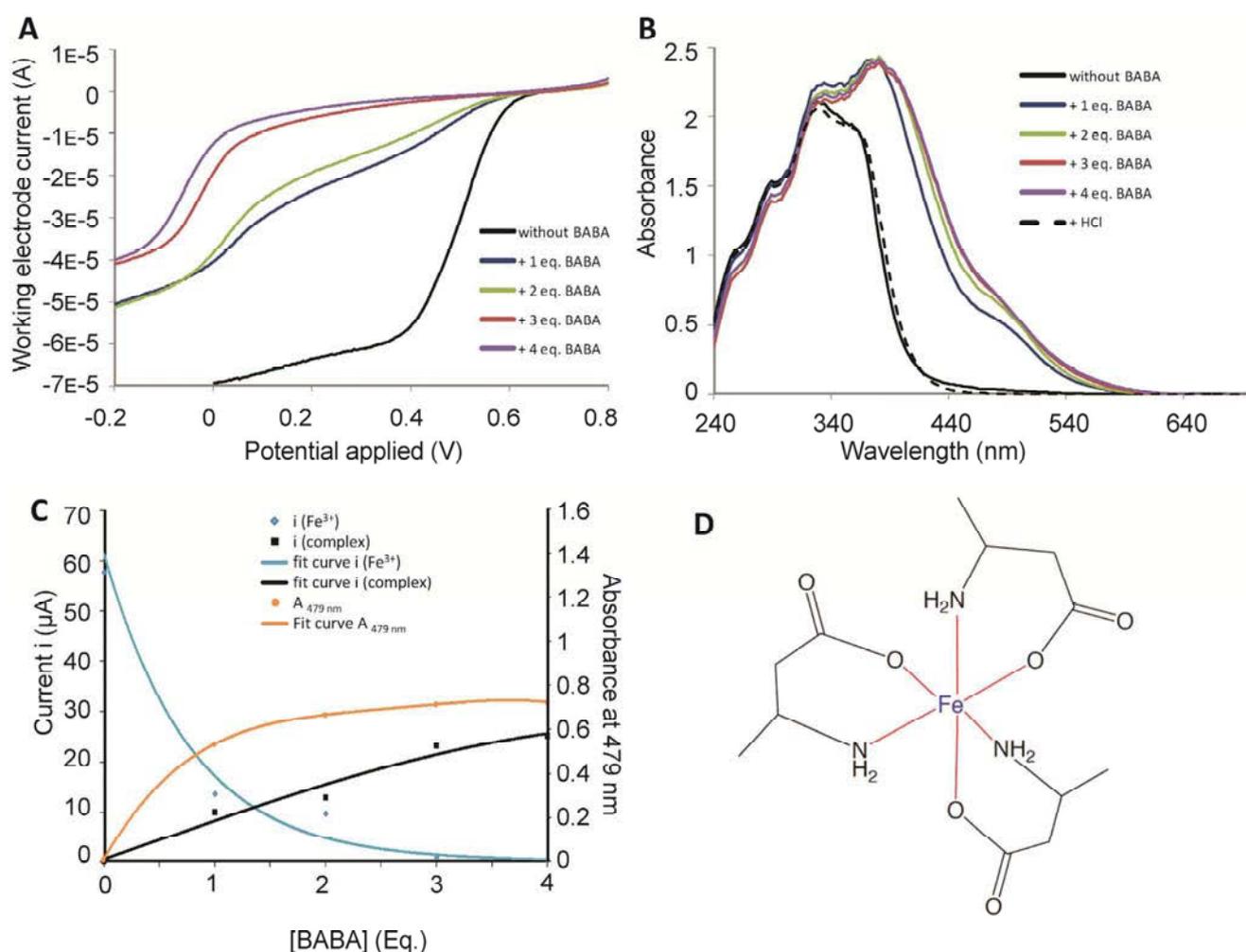


Fig. 1. Analysis of the Fe³⁺-chelating properties of BABA by **A**, electrochemistry using turning-type electrode and **B**, UV/visible spectroscopy. **C**, Comparison of the results obtained by the two techniques and **D**, BABA-Fe³⁺ complex model. In this model, generated with ChemBioDraw Ultra 12.0, three molecules of BABA (in black) chelate one atom of Fe³⁺ (in blue) through their carboxylic and amine functions (the six bonds are represented by the red lines). Results presented in A, B, and C are from one of three representative experiments.

stresses (Cohen 1994; Cohen et al. 1999; Jakab et al. 2005; Ton et al. 2005; Zimmerli et al. 2000, 2001). Application of BABA to *A. thaliana* plants induces resistance against both biotrophic and necrotrophic pathogens. Nevertheless, this broad spectrum of effectiveness is based on different priming mechanisms. Against some pathogens, such as the bacterial leaf pathogen *Pseudomonas syringae*, BABA-induced resistance is based on the priming of defense reactions that are regulated by the plant hormone salicylic acid (SA) and the defense regulatory protein NPR1. During these interactions, the priming manifests as a faster and stronger induction of SA-inducible defense genes, such as *PR1*. However, against some fungi and oomycetes, BABA-induced resistance operates independently of SA and NPR1. In these cases, the induced protection is based on an abscisic acid (ABA)-dependent priming of cell-wall-related defense such as the formation of papillae that blocks pathogen invasion (Conrath et al. 2006; Ton and Mauch-Mani 2004; Ton et al. 2005).

In addition to numerous studies revealing that BABA is able to modulate the expression of defense-related genes and to potentiate plant defense reactions, several teams have recently attempted to explore BABA mode of action. It was suggested that BABA induces a stress-induced morphogenic response in *A. thaliana* that could be responsible for the BABA-induced resistance (Wu et al. 2010). The same group showed that BABA-induced chromatin modification is correlated with BABA priming of *A. thaliana* pattern-triggered immunity, suggesting that epigenetics could be important for BABA priming (Po-Wen et al. 2013). In addition, it was shown that BABA treatment leads to a strong accumulation of pipercolic acid, an endogenous modulator of priming that likely plays a role in BABA-induced resistance against bacteria (Návarová et al. 2012). More recently, Luna and associates (2014) brought evidence that IB11, an aspartyl-tRNA synthetase (AspRS), is a plant receptor of BABA. Binding of BABA to the L-Asp-binding site of IB11 leads to a switch from its canonical AspRS activity to its noncanonical defense activity. They also suggest that the inhibitory effect of BABA on plant growth may be due to the accumulation of uncharged tRNA^{Asp}, which triggers phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α .

In the present study, we provide new elements that could explain BABA mode of action by demonstrating that BABA displays in vitro Fe-chelating properties. To investigate whether this property might account for BABA effects in planta, we analyzed the putative incidence of BABA on plant Fe homeostasis. We found that the pretreatment of *A. thaliana* plantlets with BABA triggered drastic changes in the expression of Fe-related genes and proteins, as well as a macroscopic phenotype resembling those induced by a transient or drastic Fe deficiency. Furthermore, BABA triggered the accumulation of several metabolites also accumulating in plants exposed to Fe deficiency. Measurement of Fe level in BABA-treated plants suggested that BABA acts by modifying in planta Fe availability rather than Fe assimilation. Finally, we provide evidence that the Fe status is an important determinant for plant resistance against *B. cinerea*. Collectively, our study highlights a new mode of action of BABA and further supports the recent concept (Aznar et al. 2014) that iron scavenging is a mechanism of immunity activation in plants.

RESULTS

BABA chelates Fe³⁺ ions by forming a stable hexacoordinated complex.

Based on its structure, BABA is a potential Fe chelator, as described for other amino acids (Mandado and Cordeiro 2010;

Pizarro et al. 2002). Therefore, the possibility that BABA forms a complex with Fe³⁺ was first monitored by linear voltammetry using a turning-type electrode (Fig. 1A). The voltammogram of a 5×10^{-3} M Fe³⁺ solution enriched with increasing concentrations of BABA shows that, in the absence of BABA (black curve), a typical voltammetric wave was observed from 0.35 to 0.7 V. The height of this wave was drastically reduced following the addition of one equivalent of BABA (blue curve) and disappeared from three equivalents of the amino acid (red curve). Simultaneously, a new wave at less positive potentials corresponding to the reduction of the BABA-Fe³⁺ complexes was observed with increasing concentrations of BABA. Hence, the complex formation between BABA and iron facilitates the Fe³⁺ reduction. Using these voltammetric measurements and according to the method proposed by Stephan and associates (1996), we calculated an Fe(III)-BABA stability constant of 30.07, which is more than the Fe(III)-citric acid and the Fe(III)-EDTA stability constants (11.85 and 25.7, respectively) (Furia 1972).

To confirm these results, the formation of BABA-Fe³⁺ complexes was analyzed by UV-visible spectroscopy (Fig. 1B). The UV-visible spectrum of Fe³⁺ displayed four bands at wavelengths below 400 nm (black curve). When one (blue curve), two (green curve), three (red curve), or four (purple curve) equivalents of BABA were added in the medium, two additional bands at 380 and 479 nm were observed. Appearance of these bands highlights the formation of a complex between BABA and Fe³⁺.

The data obtained by linear voltammetry (blue curve for Fe³⁺ alone and black curve for BABA-Fe³⁺ complexes) and spectroscopy at 479 nm (orange curve) are combined in Figure 1C. This wavelength was chosen because Fe³⁺ alone does not absorb such a value. The curves clearly show that both methods gave similar data: addition of BABA results in the formation of a complex between the amino acid and Fe³⁺. The curves did not further evolve from the addition of three equivalents of BABA, indicating that the complex involves three molecules of BABA for one Fe³⁺ ion. Based on this information, we generated a molecular model representing the putative structure of BABA and Fe³⁺ complexes (Fig. 1D). In this model, Fe³⁺ is hexacoordinated, each molecule of BABA binding the iron ion by their carboxylic and amino groups.

BABA modulates the accumulation of ferritins and *AtNAS4* transcripts in plants grown in soil.

The ability of BABA to chelate iron in vitro suggests that it might affect plant iron homeostasis. For this purpose, the accumulation of the iron storage protein ferritin was checked in plants grown in soil for 4 weeks and then soil drenched with water or 300 μ M BABA. Leaf tissues were collected 24 h after the soil drench. This procedure is classically used for BABA-induced resistance against pathogens (Jakab et al. 2005; Zimmerli et al. 2000). An immunoreactive band of 28 kDa corresponding to the monomeric form of ferritins was detected in both BABA-treated and control plants (Fig. 2A). However, ferritin accumulation was significantly reduced by 27% in BABA-treated plants (Fig. 2B). Because the major isoform among the four *A. thaliana* ferritins expressed in leaves is *AtFER1* (Ravet et al. 2009), the level of *FER1* transcript accumulation in BABA-treated plants was specifically monitored by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Compared with control plants, BABA-treated plants exhibited a significant reduction of *FER1* transcript accumulation (Fig. 2C). Therefore, BABA affects ferritin accumulation at both the transcript and protein levels.

To provide further arguments that BABA interferes with the regulation of components of iron homeostasis, its effect on the

accumulation of *NAS4* transcripts was also analyzed. As discussed above, the *NAS4* gene is upregulated in response to iron deficiency (Klatte et al. 2009; Koen et al. 2012) and the corresponding protein is required for proper response to iron deficiency (Koen et al. 2013). BABA treatment induced a 40% increase of *NAS4* transcript accumulation compared with control plants (Fig. 2D).

Macroscopic phenotypes of BABA-treated plants resemble those of plants facing iron deficiency.

The effects of BABA on ferritin and *AtNAS4* expression suggest that BABA affects plant iron homeostasis. To further investigate this hypothesis, we compared the responses triggered by BABA to those induced by iron deficiency. To allow an accurate control of the iron concentration in the growth medium, plants were cultivated in hydroponic conditions (Supplementary Fig. S1). Four treatments were performed: 4-week-old plants were treated for 24 h with 300 μ M BABA (BABA treatment) or the same volume of water (control) and were then transferred to a fresh nutritive solution without BABA for one additional week. In parallel, 4-week-old plants were exposed to

iron-deficiency conditions for 24 h and were then transferred either to a fresh nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to a fresh nutrient solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) for an additional week.

The macroscopic phenotype of the plant rosettes was observed after the 24-h pretreatment with BABA or Fe 0, and then 4 and 7 days after the plant transfer to the fresh medium. After 24 h of pretreatment, no difference was observed between control, BABA-, and Fe 0-treated plants (Fig. 3A). However, from 4 days after transfer, BABA-treated plants displayed a reduced growth compared with control plants and their leaf abaxial sides showed a red-purple pigmentation characteristic of anthocyanin production (Fig. 3B and C). Similar phenotypes were previously reported by Wu and associates (2010). Interestingly, the phenotype of the BABA-treated plants resembled that of Fe 0-treated plants. Indeed, from 4 days after transfer, Fe 0-treated plants were smaller and presented red-purple pigmentation of their leaf abaxial sides. The pigmentation was more pronounced than following BABA treatment. Moreover, they showed a chlorotic phenotype characteristic of iron deficiency (more pronounced at 7 days) (Fig. 3C). The plants tran-

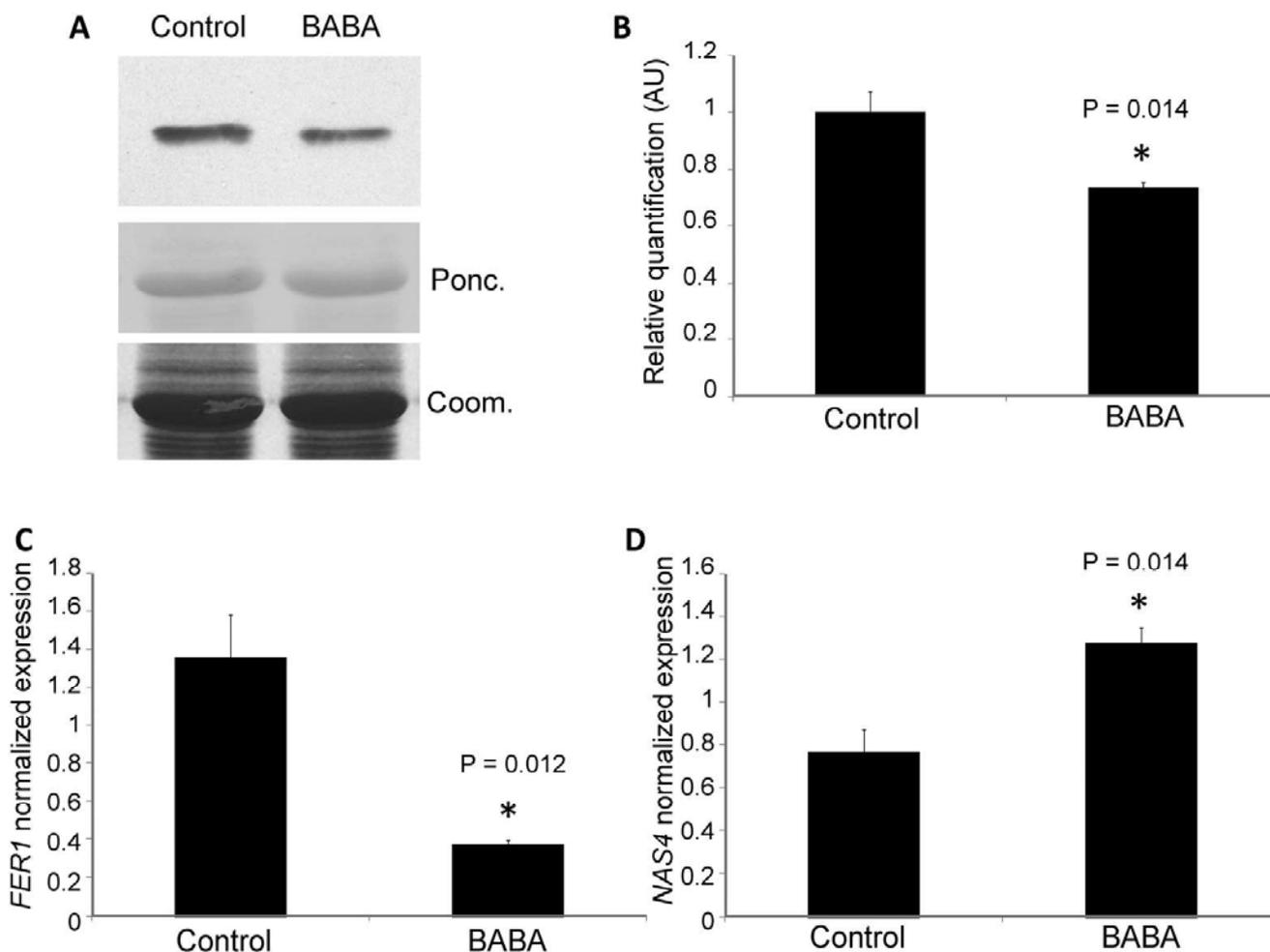


Fig. 2. A and B, Ferritin accumulation and C, *FER1* and D, *NAS4* leaf transcript accumulation in plants grown in soil drenched with BABA. A, Immunodetection of ferritins by Western blotting was performed in protein extracts prepared from leaves of 4-week-old plants treated for 24 h with BABA or water. The Coomassie Blue (Coom.) and the Ponceau Red (Ponc.) stainings show equal loading and transfer, respectively. Results are from one of three representative experiments. B, Relative intensity (expressed in arbitrary units) of the immunoreactive bands from three independent Western blotting experiments were quantified using the Bio-Rad program Quantity one, version 4.6.7. Significant differences between the two treatments were determined by the Student's *t* test (* indicates $P < 0.05$). C and D, Measurement of transcripts accumulation by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction was performed from leaves of 4-week-old plants treated for 24 h with BABA or water. Data are expressed as mean normalized expression relative to the appropriate house-keeping gene *AtYLS8* (arbitrary unit) and are the means of triplicates (\pm standard error) from one of three representative experiments. Significant differences between the two treatments were determined by the Student's *t* test (* indicates $P < 0.05$).

siently exposed to iron deficiency (Fe 0 → Fe 50 treatment) showed a slight delay in their growth 4 days after transfer. This delay was almost recovered 7 days after transfer, even though some leaves still exhibited anthocyanin accumulation. To complete this analysis, the plant shoots and roots were weighed and the leaf chlorophyll levels (Supplementary Fig. S2) were measured just after the 24-h pretreatment and 4 and 7 days after the transfer. From 4 days after the transfer, BABA-, Fe 0 → Fe 50-, and Fe 0-treated plants had reduced shoot and root weights

compared with control plants. At 7 days after the transfer, BABA-treated plants displayed shoot and root weights in between the plants cultivated in full or transient iron-deficiency conditions. Regarding chlorophyll content, a small decrease was measured for Fe 0 → Fe 50- and BABA-treated plants at 4 days after the transfer which was no longer observed after 7 days. The effects of the Fe 0 condition were more drastic, with a reduction of the chlorophyll content from 4 days after the transfer in agreement with the chlorotic phenotype observed in

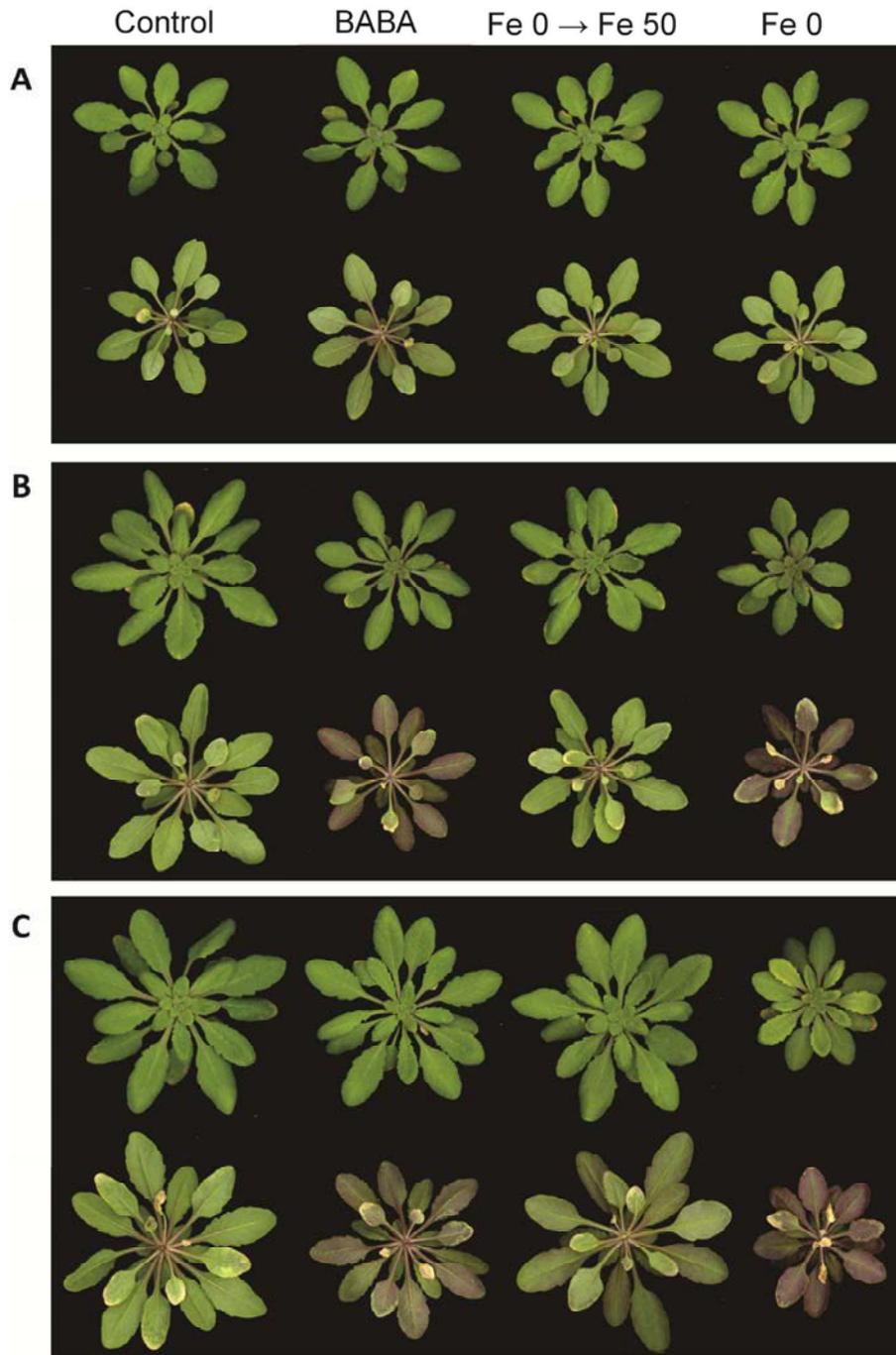


Fig. 3. Macroscopic rosette phenotype of the plants treated with BABA or grown in iron-deficient conditions. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μ M BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutrient solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 → Fe 50 treatment) for an additional week. Phenotypes were observed **A**, 24 h after the pretreatments by BABA or Fe 0 and **B**, 4 and **C**, 7 days after the plant transfer. In each frame, the upper line corresponds to the adaxial side and the lower line to the abaxial side of the leaves. Results are from one of three representative experiments.

Figure 3B and C. In summary, BABA-treated plants displayed macroscopic symptoms intermediate between those induced by a transient and a drastic iron deficiency.

BABA and Fe deficiency treatments induce the accumulation of common metabolites.

A metabolomic analysis of leaves taken from plants 4 days after their transfer to the fresh nutritive solutions was performed using ultra-high-pressure liquid chromatography quadrupole

time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS). We detected more than 2,900 features. Among them, 330, 333, and 663 accumulated differentially between control plants and plants treated with BABA or exposed to Fe 0 → Fe 50 or Fe 0 treatments, respectively (Supplementary Fig. S3). Six major compounds were tentatively identified as *p*-coumaroylagmatine, proline, indole-3-acetaldehyde, and three cyanidin 3-O glucosides—cyanidin 3-O-[2''-O-(xylosyl) 6''-O-(*p*-O-(glucosyl) *p*-coumaroyl) glucoside] 5-O-[6'''-O-(malonyl) glucoside], cya-

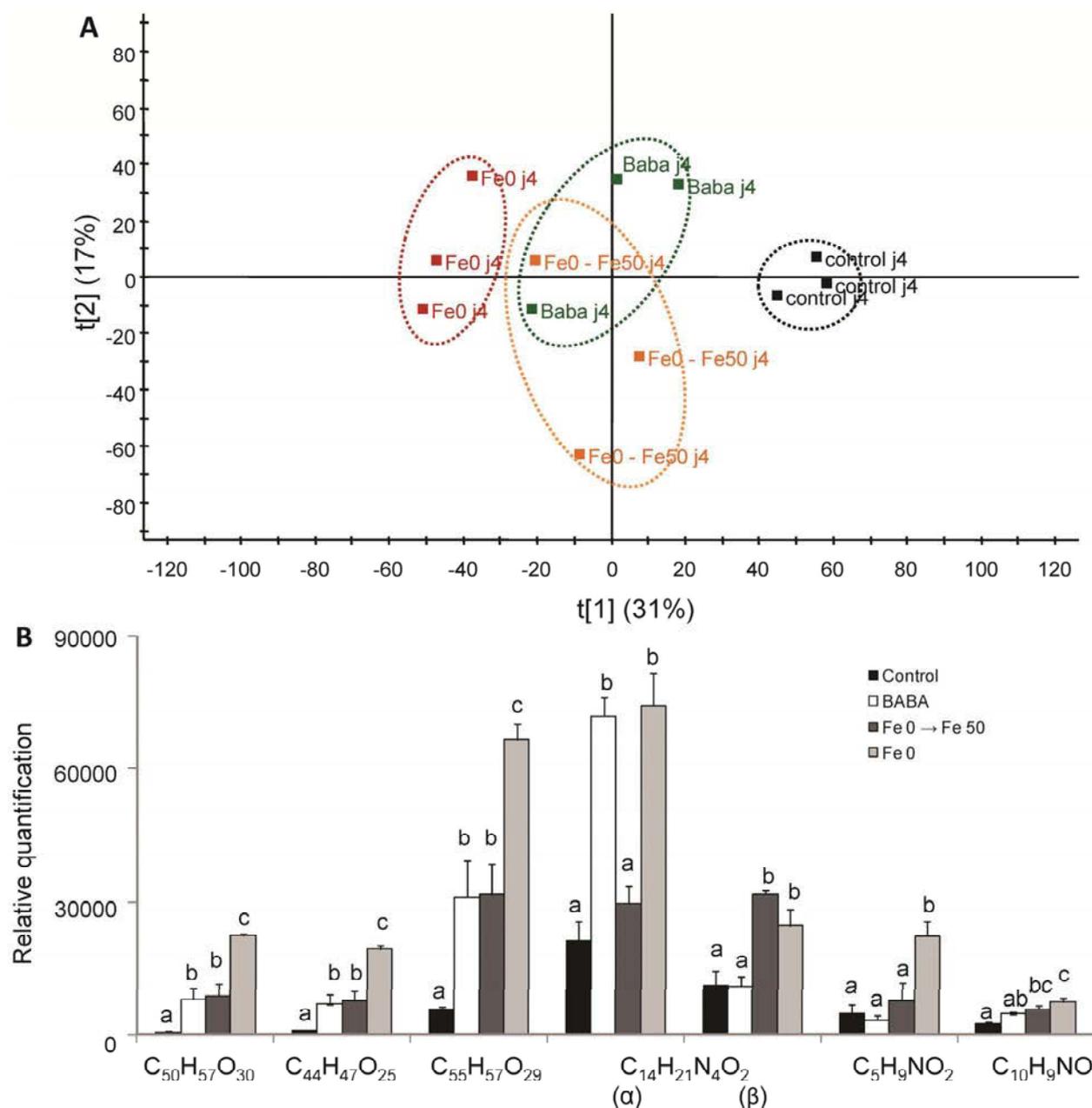


Fig. 4. Leaf metabolomic analysis of BABA- and Fe-deficiency-treated plants. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μ M BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutrient solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 → Fe 50 treatment) for an additional week. **A**, Results of principal component analysis (PCA) after Pareto scaling on the MS data set. Analysis was performed on shoot tissues 4 days after the plant transfer. Peak lists were normalized by unit norm and subjected to PCA after Pareto scaling using the EZinfo software (Umetrics, Umea, Sweden). **B**, Relative quantification of the metabolites induced in Fe deficiency- or BABA-treated plants versus control plants. Metabolomic analyses were performed on shoot tissues, 4 days after the plant transfer, by ultra-high-pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Each value represents the mean \pm standard error of nine measurements (three replicates per experiment performed three times). Significant differences between the amounts of each metabolite were determined by a one-way analysis of variance followed by multiple comparison procedure with the least significant difference method, different letters signifying distinct statistical groups for each compound ($P < 0.05$).

nidin 3-O-[2''-O-(xylosyl)-6''-O-(*p*-coumaroyl) glucoside] 5-O-malonylglucoside, and cyanidin 3-(6''-*p*-coumaryl-2''-sinapylsambubioside)-5-(6-malonylglucoside)—which are particular types of anthocyanins (Supplementary Table S1). More precisely, two *p*-coumaroylagmatine molecules, corresponding to two putative E and Z isomers named α and β , were identified.

The results of a principal component analysis performed on the MS data set after Pareto scaling are shown in Figure 4A. A clear separation between the control samples and the other treatments was observed. Notably, overlapping clusters were observed between BABA and Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatments. The relative quantifications of each compound in the four treatments are detailed in Figure 4B. Compared with control plants, a similar overaccumulation of the three anthocyanins (C₅₀H₅₇O₃₀, C₄₄H₄₇O₂₅, and C₅₅H₅₇O₂₉) was observed between BABA and Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment. These three compounds deeply accumulated in the Fe 0 treatment. This result confirmed the phenotypic analysis shown in Figure 3. The isomer β of *p*-coumaroylagmatine (C₁₄H₂₁N₄O₂) and indole-3-acetaldehyde (C₁₀H₉NO) were more abundant in iron-deficient conditions (Fe 0 \rightarrow Fe 50 and Fe 0 treatments). Proline (C₅H₉NO₂) is the only metabolite which accumulated only in response to Fe 0 treatment. Nevertheless, the quantification data relative to these three metabolites were not statistically different between BABA-treated plants and control plants. Concerning the isomer α of *p*-coumaroylagmatine, it strongly and similarly accumulated in both BABA and the complete iron-deficiency treatments.

Collectively, these results indicate that BABA triggered the accumulation of metabolites also accumulating in transient or permanent iron-deficiency conditions, further supporting the assumption that BABA affects iron homeostasis.

BABA treatment leads to a transient iron-deficiency response.

The phenotype analysis suggests that BABA triggers an iron-deficiency-like response. To further investigate this possibility, a comparative analysis of ferritin accumulation in leaves of plants grown in the hydroponic conditions described above was achieved by Western blotting. In control plants, the accumulation of ferritins increased with time, the strongest accumulation being observed 4 and 7 days after transfer to fresh

nutritive medium (Fig. 5). This variation in the level of ferritin accumulation is not surprising because ferritin rates were shown to be dependent on the leaf developmental stage and the life cycle (Petit et al. 2001). As expected, a drastic decrease in ferritin level was observed in the plants subjected to a permanent iron deficiency (Fe 0 treatment), thus confirming the efficiency of our experimental condition for inducing iron starvation. The decrease occurred from 24 h and was particularly drastic 4 and 7 days after the plant transfer to the iron-deficient medium. In comparison, the plants facing iron deficiency for only 24 h (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) presented a stronger ferritin accumulation 4 days after the transfer in the nutritive solution containing iron. Seven days after the transfer, their levels of ferritin accumulation were similar to those detected in control plants. Remarkably, BABA treatment reduced the accumulation of ferritins to near the detection limit after the pretreatment. It is noteworthy that the decrease triggered by BABA pretreatment was more drastic than the one observed for iron deficiency. After transfer of the plants to fresh medium without BABA, ferritin accumulation increased to reach a level intermediate between the one of plants grown in permanent (Fe 0 treatment) and in transient (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) iron-deficiency conditions.

To consolidate the assumption that BABA has a disturbing effect on iron homeostasis, the effect of BABA on the expression of the two iron-related genes *IRT1* and *FRO2* was investigated by qRT-PCR in roots and shoots of plants cultivated in BABA or iron-deficiency media (Fig. 6). Compared with control plants, the 24-h pretreatment in Fe-deficient medium led to a decrease in *IRT1* and *FRO2* transcript levels. Interestingly, a similar decrease was observed 24 h after the addition of BABA in the culture medium. Four days after the transfer, the levels of expression of *IRT1* and *FRO2* measured in BABA-treated plants were not statistically different from those measured in control plants, indicating that the effect of BABA seen after the 24-h pretreatment was transient. In contrast, the accumulation of both transcripts remained lower in Fe 0 \rightarrow Fe 50- and Fe 0-treated plants, although to a lower extent in the Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment. Seven days after the transfer, the transcripts decreased in all conditions and showed a similar level whatever the conditions. Taken together, these data show that

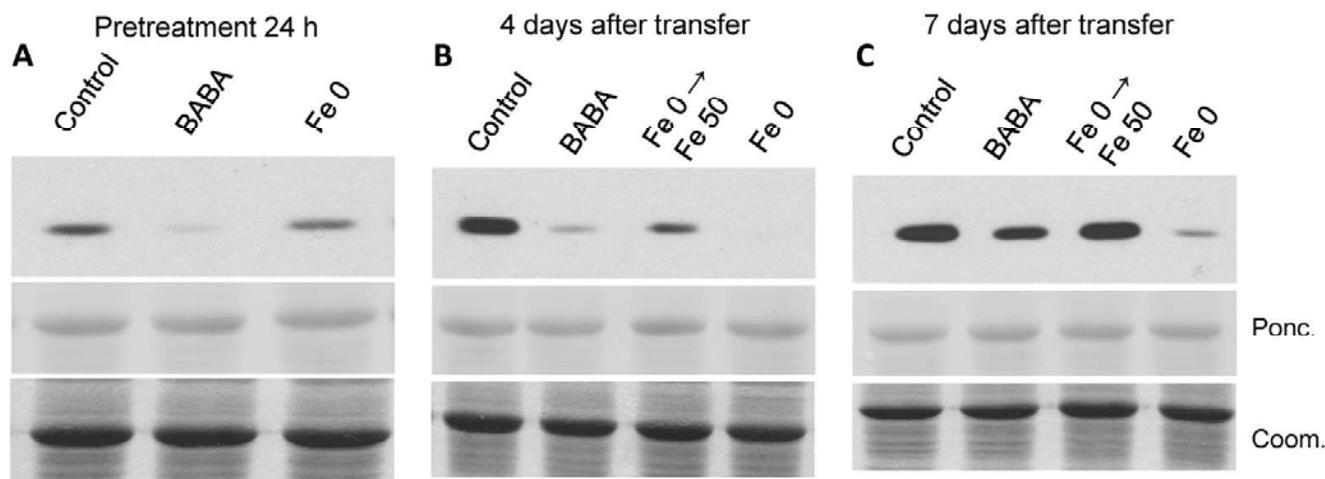


Fig. 5. Ferritin accumulation of the plants treated with BABA or grown in iron-deficient conditions. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μ M BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutrient solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) for an additional week. Accumulations of ferritins were detected by Western blotting in protein extracts prepared from leaves of plants **A**, pretreated for 24 h with BABA or Fe 0 and grown **B**, 4 and **C**, 7 days after transfer to the new medium. The Coomassie Blue (Coom.) and the Ponceau Red (Ponc.) stainings show equal loading and transfer, respectively. Results are from one of three representative experiments.

BABA treatment transiently affects the accumulation of *IRT1* and *FRO2* transcripts.

Globally, the changes in ferritin and in *IRT1* and *FRO2* transcript accumulations provide evidence that BABA-treated plants display iron homeostasis modifications typical of iron deficiency.

BABA-mediated iron deficiency is not correlated with a decrease in iron acquisition.

The effects of BABA on iron homeostasis reported above could be related to its ability to chelate and, therefore, remove all the iron present in the nutrient solution and available for plants. To investigate this possibility, we first checked whether the BABA-Fe complexes act as substrate of FRO. FRO activity was measured as reported by Yi and Guerinot (1996). For this purpose, plants were cultivated on plates in iron-sufficient conditions for 10 days and then transferred for 3 days in iron-sufficient or -deficient conditions. Next, roots were incubated with Fe(III)-EDTA or Fe(III)-BABA as a substrate for FRO activity. As expected, in the presence of Fe(III)-EDTA, FRO activity was strongly induced in plants cultivated in iron-deficient conditions (Fig. 7A). Interestingly, a similar FRO activity was measured in roots incubated with Fe(III)-BABA. Therefore, these data strongly suggest that Fe(III)-BABA complexes are, indeed, substrates for FRO and minimize the possibility that the effects of BABA on plant iron homeostasis are related to a reduction of iron availability in the nutrient solution. To strengthen this conclusion, we analyzed whether an increase of Fe availability in the nutrient solution could abolish the effects of BABA on iron homeostasis. For this purpose, plants were exposed to 350 μ M Fe-EDTA instead of 50 μ M and BABA concentration was kept at 300 μ M. The increase of iron concentration did not suppress the effects of BABA on the plant phenotype (Supplementary Fig. S4).

Classically, the iron-deficiency status can be due to either a decrease in root iron acquisition from the soil or from the nutritive solution, or to a reduction in iron availability in planta inde-

pendently of its import. Several processes might lead to a reduction in iron availability, including perturbations of the mechanisms involved in iron supply and distribution among the tissues or organs. A decrease in iron availability is usually accompanied by a stronger iron acquisition by the roots (Connolly et al. 2002; Vert et al. 2002). To determine the involvement of one of these two potential causes, root and shoot iron levels of the plants grown in the different conditions were measured by inductive coupled-plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Fig. 7B and C). As expected, 4 and 7 days after the plant transfer, the iron concentrations in the roots and in the shoots of the Fe 0-treated plants were reduced compared with control plants. In BABA- and Fe 0 \rightarrow Fe 50-treated plants, the root and shoot iron concentrations, respectively, were similar to those in control plants 24 h and 4 and 7 days after the transfer. Taken as a whole, these data show that the modifications induced by BABA treatment on the expression of ferritins, *IRT1*, and *FRO2* are not correlated to a decrease in iron acquisition by the roots.

BABA and Fe deficiency treatments modulate the expression of a similar set of 28 genes.

We compared the results of two transcriptomic analyses obtained in *A. thaliana* shoots in response to BABA (Tsai et al. 2011) and Fe deficiency (Schuler et al. 2011). In the first study, plants were soil drenched with BABA at a final concentration of 200 μ M, or with water, for 2 days 22 h before RNA sample collection. In the second one, gene expression of L3/L4 rosette leaves of wild-type plants grown for 1 week under sufficient or deficient Fe medium solution were analyzed. We compared the list of the genes modulated in response to Fe deficiency (2,872 genes) with the list of the 55 BABA-modulated genes. The comparison was reduced to 46 genes because nine of the 55 BABA-modulated genes were absent in the microarray used by Schuler and colleagues (2011). Interestingly, we found that 28 genes were commonly modulated by both treatments (Table 1), thus representing 61% of the BABA-dependent genes. More precisely, among those 46 genes, 22

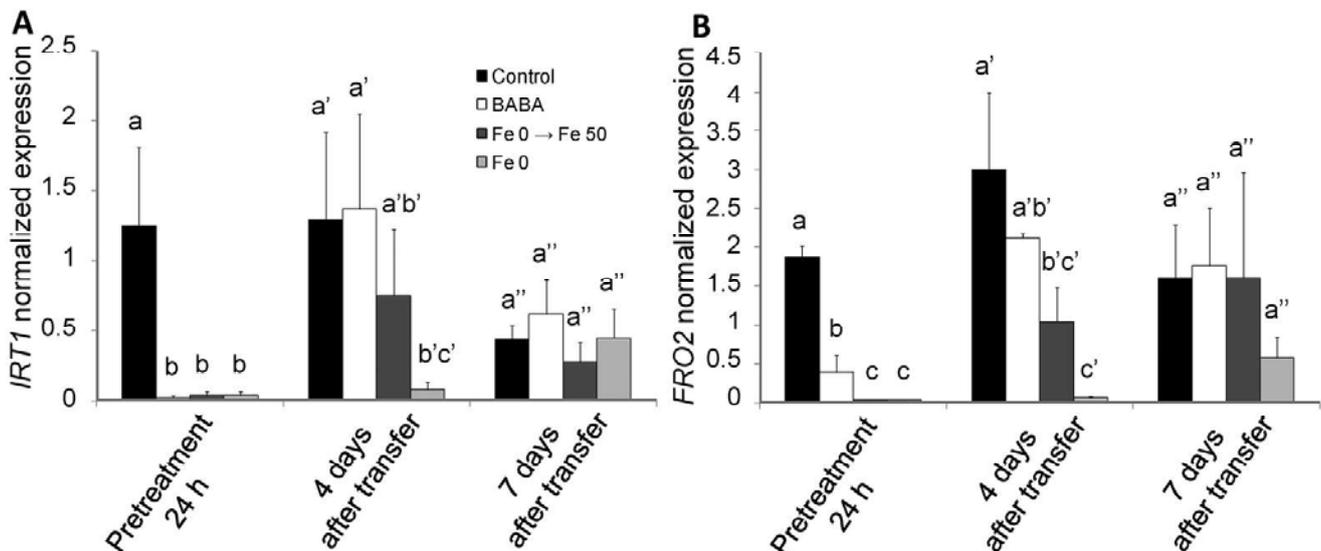


Fig. 6. Impact of BABA and Fe deficiency on the expression of iron-related genes. **A**, *IRT1* and **B**, *FRO2* transcript accumulation were measured in roots. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μ M BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutritive solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutritive solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) for an additional week. Measurements of *IRT1* and *FRO2* transcripts accumulation were performed by qRT-PCR. Data are expressed as mean normalized expression relative to the appropriate housekeeping gene *AtYLS8* (arbitrary unit) and are the means of triplicates (\pm standard error) from one representative experiment of three independent experiments. Significant differences between the treatments were determined by a one-way analysis of variance followed by multiple comparison procedure with the least significant difference method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.05$).

were induced by both treatments, 4 were induced by BABA but repressed by Fe deficiency and two were repressed by BABA but induced by Fe deficiency.

To complete this comparison, we used the tool “signature” of Genevestigator (Hruz et al. 2008). Among the 166 nutrient perturbations listed in the software, profiles from two transcriptional analyses studying the mutants in iron homeostasis *nas4x-1* (versus Col-0 in Fe sufficiency conditions) and *bhlh100/bhlh101* (versus Col-0 in Fe deficiency conditions) are among the most similar to the gene profile obtained after BABA treatment by Tsai and associates (2011), with relative similarity of 1.292 and 1.227 (Euclidean distance), respectively (Supplementary Fig. S5). The *nas4x-1* mutant is affected in the expression of the four *NAS* genes present in the *A. thaliana* genome and contains very low level of NA. It displays leaf chlorosis, reduced Fe content in the flowers and seed, sensitivity to

Fe deficiency, and disturbances in Fe homeostasis such as up-regulation of *IRT1* and *FRO2* (Klatte et al. 2009). As *nas4x-1*, the double mutant *bhlh100/bhlh101* is hypersensitive to Fe deficiency. Indeed, the transcription factors *BHLH100* and *BHLH101* function as key regulators of Fe deficiency responses independently of *FIT1*. They have been shown to regulate genes involved in the distribution of iron within the plant (Sivitz et al. 2012).

These data highlight the idea that BABA treatment and Fe deficiency probably share common signaling pathways.

Iron deficiency protects the plants against *B. cinerea*.

The virulence of certain microbial plant pathogens is linked to their ability to produce siderophores that act in trapping the host iron in order to use it for their own development. For example, pyoverdine, a siderophore produced by *P. fluorescens*, induces

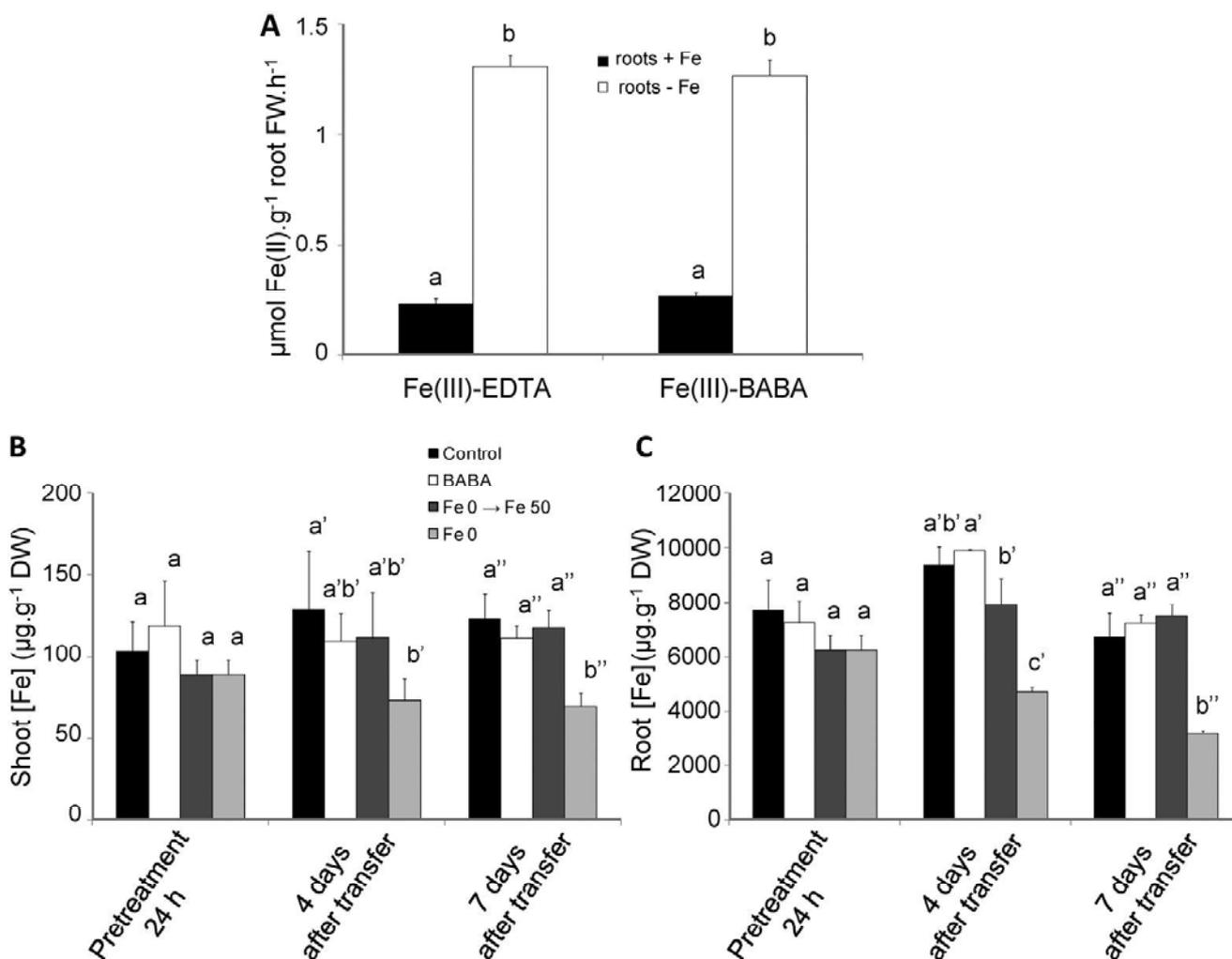


Fig. 7. Effects of Fe(III)-EDTA and Fe(III)-BABA complexes on root ferric-chelate reductase (FRO) activity and **B**, shoot and **C**, root iron concentration in plants exposed to BABA or grown in iron-deficient conditions. **A**, For measurement of FRO activity, plants were cultivated 10 days on plates supplemented with 50 μM Fe-EDTA and transferred for 3 days under iron-sufficient (Fe 50 μM ; roots + Fe) or iron-deficient (Fe 0 μM + 300 μM Ferrozine; roots - Fe) conditions. Then, roots were treated for 20 min with Fe(III)-EDTA or Fe(III)-BABA as a substrate. Each value represents the mean of triplicates (\pm standard error) from one representative experiment of three independent experiments. Significant differences between the treatments were determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison procedure with the least significant difference method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.01$). **B**, Shoot and **C**, root iron concentrations of the plants treated with BABA or grown in iron-deficient conditions. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μM BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutrient solution containing 50 μM Fe (Fe 0 \rightarrow Fe 50 treatment) for an additional week. Measurement of iron concentrations was performed by inductive coupled-plasma optical emission spectrometry. Each value represents the means \pm standard error of nine measurements (three replicates per experiment performed three times). Significant differences between the treatments were determined by a one-way ANOVA followed by multiple comparison procedure with the least significant difference method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.05$). FW = fresh weight and DW = dry weight.

defense reactions in plants (Van Loon et al. 2008). Therefore, a decrease in the iron availability due to siderophores could create a warning signal activating the plant immune system. Based on this hypothesis, one can assume that the potentialization of plant defense reactions induced by BABA is partly dependent on its capacity to disturb plant iron homeostasis. Moreover, it has been shown that iron deficiency protects *A. thaliana* plants against *D. dadantii* and *B. cinerea* infections (Kieu et al. 2012).

We compared the effects of BABA-induced resistance against the fungal pathogen *B. cinerea*, which was first shown by Zimmerli and associates (2001), to the putative resistance induced by iron deficiency. Plants grown in hydroponic conditions as described below were immediately subjected to *B. cinerea* infection after 24 h of pretreatment with BABA or iron deficiency. Then, the diameter of the necrotic lesions was measured 3 days postinoculation. Compared with the control,

Table 1. List of the 28 genes regulated in response to BABA versus water and to Fe deficiency (–Fe) versus Fe sufficiency (+Fe)^a

AGI Number	Name	Fold-change in response to	
		BABA vs. water	–Fe vs. +Fe
At3g11340	UDP-DEPENDENT GLYCOSYLTRANSFERASE 76B1, UGT76B1	4.96	5.34
At3g29250	SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE REDUCTASE 4, ATSDR4, SDR4	3.08	5.41
At4g35180	Lys/His transporter 7, LHT7	2.77	2.99
At3g52430	ARABIDOPSIS PHYTOALEXIN DEFICIENT 4, ATPAD4	2.56	2.14
At5g64000	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	2.47	5.92
At5g18470	Curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	2.46	2.05
At1g10340	Ankyrin repeat family protein	2.34	3.43
At3g16530	Lectin like protein (whose expression is induced upon treatment with chitin oligomers)	2.32	2.09
At5g51440	HSP20-like chaperones superfamily protein	2.28	9.16
At3g57260	β-1,3-GLUCANASE 2, BG2, BGL2, PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2, PR-2	2.28	4.95
At5g60800	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	2.27	6.23
At5g10380	ATRIN1	2.26	2.11
At4g04490	CRK36, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 36	2.23	19.81
At4g04540	CRK39, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 39	2.19	2.66
At4g04500	CRK37, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 37	2.17	6.96
At4g25110	METACASPASE 2, ATMC2	2.16	2.80
At3g21080	ABC transporter-related	2.10	4.87
At4g18250	Receptor serine/threonine kinase, putative	2.09	3.10
At1g51800	IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1, IOS1	2.09	2.55
At5g24530	DOWNY MILDEW RESISTANT 6, DMR6	2.04	4.36
At4g21120	AMINO ACID TRANSPORTER 1, AAT1; CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER 1, CAT1	2.02	2.78
At1g74710	ISOCHORISMATE SYNTHASE 1, ATICS1; SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2, SID2	2.02	4.30
At1g59950	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	2.49	0.40
At2g34930	Disease resistance family protein / LRR family protein	2.21	0.38
At3g46900	COPPER TRANSPORTER 2, COPT2	2.13	0.40
At4g36010	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	2.09	0.27
At2g28190	COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2, CSD2	0.23	2.01
At1g12520	COPPER CHAPERONE FOR SOD1, ATCCS	0.33	2.73

^a Results of two transcriptomic analyses obtained in *Arabidopsis thaliana* shoots exposed to BABA (Tsai et al. 2011) or Fe deficiency (Schuler et al. 2011) were compared. Genes showing a minimum induction of two- (dark gray) or a minimum repression of 0.5-fold (light gray) were selected ($P < 0.05$, t test, $n = 3$ per group).

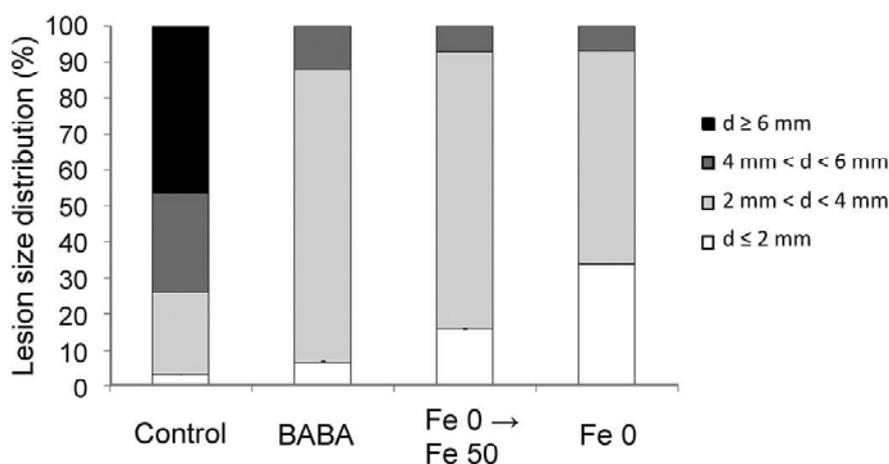


Fig. 8. *Botrytis cinerea* symptom development in the leaves of plants pretreated with BABA or grown in iron-deficient conditions. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μM BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutrient solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutrient solution containing 50 μM Fe (Fe 0 → Fe 50 treatment) for an additional week. Disease resistance of the plants was tested against *B. cinerea* isolate BMM. Leaves were inoculated after the plant transfer. Five leaves from 12 plants were used for each treatment. Disease resistance was scored by measuring the necrotic lesion diameters 3 days postinoculation (dpi). Histograms show lesion diameter (d) classification according to their size in four classes ($d \leq 2$ mm; $2 \text{ mm} < d < 4$ mm; $4 \text{ mm} < d \leq 6$ mm; and $d \geq 6$ mm). Results are from one representative experiment of three independent experiments.

under BABA, Fe 0 → Fe 50, and Fe 0 conditions, plants were more resistant to infection. In particular, we did not observe lesions showing diameters bigger than 6 mm in these three conditions whereas this category was prominent in control plants (47% of the lesions) (Fig. 8).

The decreased symptoms induced by *B. cinerea* in BABA-, Fe 0 → Fe 50-, and Fe 0-treated plants led us to measure the impact of the pretreatments on the expression of the two defense-related genes *PR1* and *PDF1.2*. Shoots of plants grown in hydroponic conditions were sprayed with *B. cinerea* spores after 24 h of pretreatment with BABA or iron deficiency and the tissues were harvested 48 h after. Although BABA had no effect on the expression of the genes in mock treatment, the transient and the drastic Fe deficiency conditions both induced their activation. In response to *B. cinerea*, the expressions of *PR1* and *PDF1.2* are higher in BABA-, Fe 0 → Fe 50-, and Fe 0-treated plants compared with control plants. Notably, the effects of Fe 0 → Fe 50 and Fe 0 treatments were slightly higher in response to *B. cinerea* than in response to mock treatment for *PR1* and no additive effect was observed for *PDF1.2* between these two conditions (Fig. 9).

DISCUSSION

Our present investigation contributes to a better understanding of the still largely unknown processes inherent in the effects of BABA, a molecule able to potentiate plant defense mechanisms and to protect plants against a variety of biotic and abiotic stresses.

An *in silico* structural analysis of BABA suggested that it might display Fe chelation properties. Indeed, the carboxylic and amino groups of each molecule of BABA are both able to coordinate Fe, the formation of the complex being possible in terms of energy and spatial arrangement. We propose a model in which three molecules of BABA coordinate one Fe³⁺ ion. This chelating property has already been shown for other amino acids such as glycine, with two amino acids forming a complex with one ion of iron, copper, or zinc (Mandado and Cordeiro 2010; Pizarro et al. 2002).

The Fe chelating properties of BABA led us to examine its impact on *in planta* Fe homeostasis. We observed that a pretreatment with BABA of *A. thaliana* plants grown in soil or hydroponic conditions modulates the expression of genes or proteins involved in Fe sequestration and transport. Drastic decreases in *FRO2* and *IRT1* transcript and ferritin accumulations were observed. These decreases were also observed in the plants facing iron deficiency. Analysis of the BABA-pretreated plants transferred in a medium deprived of BABA for one additional week indicates that its drastic effects on the accumulation of the transcripts and proteins of interest were transitory. Interestingly, these accumulation profiles were relatively similar to those observed in plants subjected to a transient Fe deficiency. These results suggest that BABA pretreatment induces in *A. thaliana* a series of events characteristic of Fe deficiency. We checked that these effects were not related to the removal of the iron present in the nutritive solution that BABA might cause through its Fe-chelating properties.

The ability of BABA to affect iron homeostasis was further confirmed by the phenotypical analysis showing violet pigmentation of the lower sides of the leaves in both BABA-treated plants and plants exposed to a transient or permanent Fe deficiency. An increase in the total foliar anthocyanin content in response to BABA associated with the activation of chalcone synthase and dihydroflavonol-4-reductase activities was previously shown by Wu and associates (2010). In the present study, we identified three anthocyanins whose production was stimulated by BABA. These flavonoid pigments are also

synthesized in response to other stresses such as desiccation or wounding or during pathogen attacks and were shown to shield tissues by preventing the deleterious effects of reactive oxygen species and free radicals (Gould 2004). Importantly, the metabolomic analysis also revealed a significant production of E or Z *p*-coumaroylagmatine in BABA and Fe 0 treatments. The production of this hydroxycinnamic acid amide was previously shown to be induced in several plant species in response to pathogen attack such as in *A. thaliana*–*Alternaria brassicicola* (Muroi et al. 2009) and barley–*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (von Röpenack et al. 1998) interactions. These data further confirm that BABA and iron deficiency trigger common processes, including defense-related mechanisms. More generally, the finding that 61% of the BABA-modulated genes identified in the investigation of Tsai and associates (2011) were also modulated by Fe deficiency (Schuler et al. 2011) highlights the

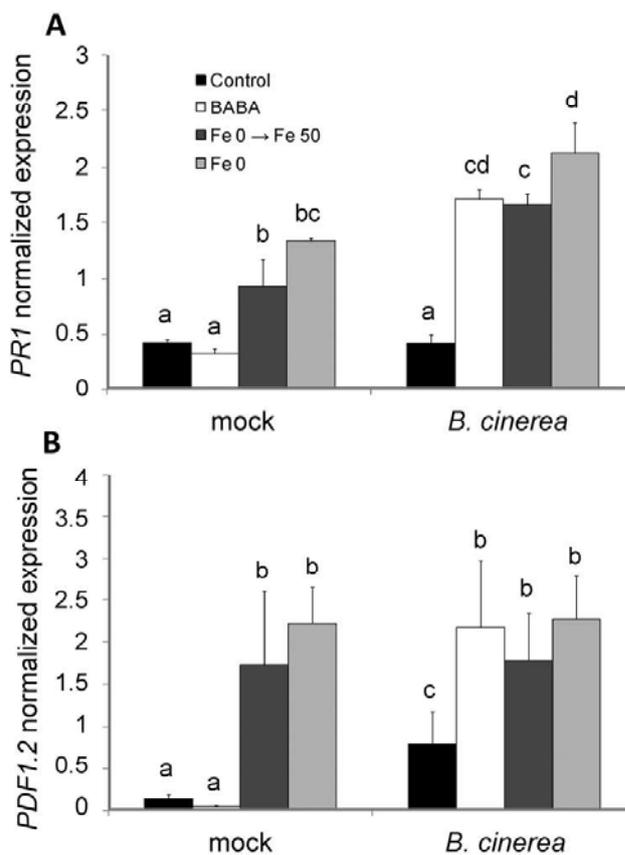


Fig. 9. Impact of BABA and Fe deficiency on the expression of defense-related genes. **A**, *PR1* and **B**, *PDF1.2* transcript accumulations were measured in shoots. After 4 weeks of hydroponic culture, plants were treated with 300 μ M BABA (BABA) or an equivalent volume of water (control) for 24 h and, then, were transferred to the nutritive solution without BABA for one supplementary week. For iron deficiency experiments, 4-week-old plants were treated for 24 h in the nutritive solution without Fe and then transferred either to the nutritive solution without Fe (Fe 0 treatment) or to the nutritive solution containing 50 μ M Fe (Fe 0 → Fe 50 treatment) for an additional week. Leaves were sprayed following the plant transfer, and the shoots were harvested 48 h after. Measurements of *PR1* and *PDF1.2* transcript accumulations were performed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Data are expressed as mean normalized expression relative to the appropriate housekeeping gene *AtYLS8* (arbitrary unit) and are the means of triplicates (\pm standard error) from one representative experiment of three independent experiments. Significant differences between the treatments were determined by a one-way analysis of variance followed by multiple comparison procedure with the least significant difference method, different letters signifying distinct statistical groups ($P < 0.05$).

possibility that BABA activates signaling pathways used by plants facing Fe starvation.

The comparative analyses of iron concentrations between BABA-treated plants and plants facing drastic Fe deficiency revealed that BABA did not induce a decrease in Fe concentration. Therefore, the BABA-induced transient Fe deficiency response deduced from the accumulation profiles of the transcripts and proteins related to Fe homeostasis is not caused by a reduction in Fe uptake. Rather, it might reflect a decrease in Fe availability. This statement raises the question of how BABA modulates Fe availability. First, it is conceivable that BABA is rapidly taken up by the roots and accumulates in the leaves. Using ^{14}C -BABA, it was indeed shown in lettuce plants that the amino acid is taken up within 2 h by the roots and, then, is transported from 18 h in the cotyledons before being incorporated in all the tissues by 45 h (Cohen et al. 2010). This systemic translocation was also shown in other species, including tomato (Cohen and Gisi 1994) and *A. thaliana* (Jakab et al. 2001; Návarová et al 2012). Based on these findings, we assume that once internalized in plants, BABA may trigger an Fe deficiency via its capacity to bind Fe. The finding that the Fe(III)-BABA stability constant was higher than those of Fe(III)-citric acid, a physiological complex involved in iron chelation and distribution, supports this hypothesis. Due to the transient effects of BABA on iron homeostasis, it is conceivable that BABA-treated plants set up Fe acquisition strategies promoting Fe recovery from the BABA-Fe complexes. Alternatively, BABA could also be taken up by the roots as BABA-Fe complexes. In this scenario, Fe deficiency might be related to the low Fe availability of the Fe bound to BABA. However, the observation that the BABA-Fe complexes act as substrates of the root ferric-chelate reductase clearly minimizes this hypothesis.

Our results also raise the question of the functional link between BABA effects on Fe homeostasis and its capacity to potentiate plant defense mechanisms against pathogen microorganisms. The chelation of Fe of the hosts by siderophores secreted by pathogen microorganisms should constitute signals triggering an immune response in the infected plants (Segond et al. 2009). For instance, Aznar and associates (2014) recently showed that the iron scavenger activity of the bacterial siderophore deferrioxamine triggers immunity in *A. thaliana* through perturbation of iron homeostasis. To test this hypothesis, we compared the impacts of Fe deficiency with those of BABA treatment in *A. thaliana* plants infected by the fungus *B. cinerea*. Our analysis pointed out that the transient Fe deficiency and BABA treatments decrease the sensitivity of *A. thaliana* plants to *B. cinerea* with the same intensity. Disease reduction in iron-starved plants was also observed with the bacterial plant pathogen *D. dadantii* in *A. thaliana* (Kieu et al. 2012), indicating that the plant nutritional iron status affects the response to several pathogens, highlighting a more general process. One possible explanation is that the lack of bioavailable Fe resulting from Fe deficiency reduces the Fe availability for the pathogen and, therefore, weakens its development. By chelating Fe in planta, BABA could mimic this process. Another explanation is that Fe deficiency could place the plant in a defensive waking state via the induction of defense reactions. In line with this proposition, we showed that iron deficiency provokes the transcript accumulation of genes coding key defense proteins. Therefore, as stated above, BABA and Fe deficiency treatments probably induce common defense-related pathways. Therefore, the chelation of endogenous iron by BABA leading to Fe deficiency could represent a warning signal, putting plants in a defensive state. In this scenario, BABA could mimic the action of a microbial siderophore. However, although the perturbation of iron homeostasis could account for BABA

effects, the mode of action of BABA may not be directly comparable with that triggered by iron deficiency or microbe siderophores and clearly involves iron-independent processes. Accordingly, in contrast to BABA treatment, we observed that Fe deficiency by itself triggered a significant induction of *PR1* and *PDF1.2* and, at least in the case of *PDF1.2*, did not induce a priming mechanism in response to *B. cinerea*.

Conclusion.

Our study demonstrates that BABA induces a transient Fe deficiency response in *A. thaliana* plants, probably due to disturbances in the availability of the metal. These changes could be the consequences of the in planta Fe chelation by the amino acid. We also bring evidence suggesting that Fe deficiency could place the plant in a defensive waking state, reinforcing its resistance. Therefore, the transient Fe deficiency induced by BABA could account for its protective effects against pathogens but probably not for BABA priming effects. In short, this survey opens up new horizons for the understanding of BABA-induced resistance.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions.

Experiments were performed using the wild-type *A. thaliana* accession Columbia (Col-0).

For soil experiments, plants were cultivated in a commercial soil (Jiffy-7, Moerdijk, The Netherlands). For hydroponic culture, seed were surface sterilized by immersion in a solution containing 1.2% bleach and 50% EtOH for 5 min, rinsed three times with 100% EtOH, air dried, and placed for 3 days at 4°C in the dark in 0.15% agar. Then, they were sown in seed holders filled with 0.75% agar and put in a cover placed above the nutrient solution container (Araponics, Liege, Belgium). The nutritive medium (0.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 50 μM H_3BO_3 , 19 μM MnCl_2 , 10 μM ZnCl_2 , 1 μM CuSO_4 , 0.02 μM Na_2MoO_4 , and 50 μM Fe-Na-EDTA) was changed once a week. Plants were allowed to grow in a climate-controlled growth chamber for 4 weeks before the treatments in the following conditions: 10-h day (200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity, 20°C) and 14-h night (18°C), with 70% relative humidity.

Chemicals.

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis), unless otherwise stated.

Treatments.

BABA treatment. For plants grown for 4 weeks in soil, Jiffy clods were drenched with a 300 μM BABA solution 1 day prior to harvesting samples for ferritin quantification. For plants cultivated for 4 weeks in hydroponic systems, roots were washed with fresh nutrient solution without Fe-Na-EDTA. Then, the plants were treated for 24 h in a fresh nutrient solution with 300 μM BABA (BABA treatment) or with an equivalent volume of water (control treatment). After root washing with the nutrient solution without Fe-Na-EDTA to remove BABA, they were cultivated in freshly prepared nutrient solution for an additional week.

Iron-deficiency treatments. After 4 weeks of hydroponic culture, roots were washed and then treated for 24 h in a fresh nutrient solution without Fe-Na-EDTA. After root washing with the nutrient solution without Fe-Na-EDTA, plants were separated into two sets: half were put in the nutrient solution without Fe-Na-EDTA (Fe 0 treatment) and half were grown in the nutrient solution containing 50 μM Fe-Na-EDTA (Fe 0 → Fe 50 treatment) for an additional week.

qRT-PCR analyses.

Root and shoot tissues were collected separately after the treatments and immediately frozen in liquid nitrogen before total RNA extraction using Trizol reagent, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paisley, UK). A DNase (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.) treatment was performed on 500 ng of total RNA to prevent genomic DNA contamination. RNA samples were subsequently used for reverse transcription (ImpromII Reverse Transcriptase kit; Promega Corp.) with anchored oligo(dT15) (Promega Corp.) and 0.4 mM deoxynucleotide triphosphates. The resulting cDNAs were subjected to a twofold dilution with water, and 1 μ l of each cDNA sample was assayed by qPCR in a LightCycler using GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corp.). Expression levels were calculated relatively to the housekeeping gene *AtYLS8* (*At5g08290*) (Czechowski et al. 2005; Han et al. 2013) using the relative standard curve method. For each sample, target quantity of the gene of interest was determined by interpolating the value from the standard curve made from a cDNA pool which enabled us to take into consideration the efficiency of amplification. The value was then divided by the target quantity of the housekeeping gene.

Primer sequences were as follows: YLS8-fw: 5'-GTCATTTATCTGGTGGACATCACT-3' and YLS8-rev: 5'-CCGAAACA GTAAGCAAAAAC-3', FER1-fw: 5'-CAGACTACATCACCCAGCTAAGGA-3' and FER1-rev: 5'-TCTGGTCGAAATGCCAACTC-3', NAS4-fw: 5'-TTGTGTTCTTGGCTGCTCTTG-3' and NAS4-rev: 5'-TGCTCGACCACCTTAACCTCCT-3', IRT1-fw: 5'-GCTTCTTTTTTCGCGGTAACA-3' and IRT1-rev: 5'-AGTTGATAGCGATCCCTAACG-3', FRO2-fw: 5'-CATCGTTTCCTTCGGTTTC-3' and FRO2-rev: 5'-AATCCGAGCAGCGAGCAA-3', PR1-fw: 5'-TCTTCCCTCGAAAGCTCAAGA-3' and PR1-rev: 5'-GTGCCTGGTTGTGAACCTTA-3', PDF1.2-fw: 5'-CACCGCAATGGTGGAA-3', and PDF1.2-rev: 5'-CCCTGACCATGTCCCACT-3'.

FRO activity assay.

Root FRO activities were determined by spectrophotometry, as described previously by Yi and Guerinot (1996). Plants were grown for 10 days on petri plates supplemented with 50 μ M Fe-EDTA and transferred for 3 days on iron-sufficient (50 μ M Fe) or iron-deficient (0 μ M Fe + 300 μ M Ferrozine) media, as already reported (Yi and Guerinot 1996). Then, the entire root system of seven plants was submerged in a solution of 10 mM morpholineethanesulfonic acid, pH 5.5, containing 100 μ M Fe(III)-EDTA and 300 μ M Ferrozine or 100 μ M Fe(III)-300 μ M BABA and 300 μ M Ferrozine. After 20 min in the dark at room temperature, roots were removed and the absorbance of the solution was determined at 562 nm. Concentration of Fe(II)-Ferrozine was calculated using a molar extinction coefficient of 28.6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Gibbs 1976).

Immunodetection of ferritins.

Total protein extracts were prepared from samples as previously described (Lobréaux et al. 1992). Immunodetection of ferritins was performed using a rabbit polyclonal antiserum raised against purified AtFER1 protein (Dellagi et al. 2005) recognizing the four ferritin subunits (Ravet et al. 2009). As loading controls, the corresponding protein gel and the nitrocellulose membrane were respectively stained with Coomassie Blue or Ponceau Red. For all treatments, a similar band corresponding to the same proteins was chosen at random to show equal loading and transfer.

Metabolomic analyses.

Shoot tissues were collected after the treatments and immediately frozen in liquid nitrogen before being ground to a fine

powder. Powder (100 mg) was transferred into a microcentrifuge tube. Then, 0.5 ml of extraction solvent consisting of a mixture of methanol, water, and formic acid (80:19.5:0.5, vol/vol) as well as a few glass beads (2 mm in diameter) were added to the tubes, which were immediately vortexed, shaken for 3 min at 30 Hz in a tissue lyser (Retsch MM300, Haan, Germany), and centrifuged at 14,000 \times *g* for 3 min. The supernatant was transferred into an appropriate vial for analysis.

UHPLC-QTOFMS metabolomic analyses were performed on a Synapt G2 QTOFMS (Waters, Milford, MA, U.S.A.) interfaced to an Acquity UPLC system (Waters) through an electrospray ionization source. In a first step, both positive and negative ion modes were tested, and positive ion mode was further selected for subsequent analyses because more discriminant signals were revealed in this mode. The MS was operated over 85 to 1,200 Da in the so-called MSE mode using scan times of 0.2 s at both low (4eV) and high (10 to 30 eV ramp) collision energies. Argon was used as collision gas at a flow rate of 2.2 ml min⁻¹ and a pressure of 7.2 \times 10⁻³ mbar. To obtain accurate mass measurements, external and internal calibrations were applied by infusing solutions of sodium formate (0.5 mM) and leucine-enkephalin (400 ng ml⁻¹), respectively, at a flow rate of 10 μ l min⁻¹. The source parameters were as follows: source temperature = 120°C; capillary voltage = 2,800 V; cone voltage = 25 V; desolvation gas flow and temperature = 800 liters h⁻¹ and 330°C, respectively; and cone gas flow = 20 liters h⁻¹. The UHPLC separation involved an Acquity BEH C18 column (2.1 by 50 mm, 1.7- μ m particle size) (Waters) and mobile phases consisting of 0.05% formic acid in water as solvent A and 0.05% formic acid in acetonitrile as solvent B. The following gradient program was applied: 2 to 30% B in 3.0 min, 30 to 100% B in 4.0 min, holding at 100% B for 2.0 min, and reequilibration at 2% B for 1.5 min. The flow rate was set to 0.4 ml min⁻¹. The column temperature was maintained at 30°C. The injection volume was of 2.5 μ l. The entire LC-MS system was controlled by Masslynx V.4.1.

UHPLC-QTOFMS data were processed with Markerlynx XS software (Waters). Mass signals were extracted and aligned from 0 to 6.5 min using the following parameters: mass range 85 to 1,200 Da, mass window 0.02 Da, retention time window 0.06 min, marker intensity threshold 400 counts, automatic calculation of peak width and peak-to-peak baseline noise, noise elimination disabled, and deisotoping enabled.

Determination of Fe concentrations.

The concentrations of Fe were determined both in the roots and in the shoots by ICP-OES (ICB-UMR 6303/Université De Bourgogne, Dijon, France).

Plant inoculation with *B. cinerea*.

B. cinerea BMM strain was grown on potato dextrose agar plates (Duchefa, Haarlem, The Netherlands) at 39 g liter⁻¹ and 16°C for 10 days (10 h of day and 14 h of night) until sporulation. Spores were harvested in sterile water and filtered through glass wool to remove hyphae. Then, they were diluted in PDB medium (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.) at 6 g liter⁻¹ for inoculation or spray. For quantification of lesion size, plants were inoculated by applying 6- μ l droplets of spore suspensions at a concentration of 5 \times 10⁴ spores ml⁻¹ to the upper surface of the leaves. For measurement of defense gene expression, leaves were sprayed with a solution of 2 \times 10⁵ spores ml⁻¹. The inoculated or sprayed plants were incubated at 100% relative humidity and 20°C with a 12-h photoperiod. Symptom development was scored by measuring the maximal lesion diameter. Control inoculation or spray were performed with PDB culture medium only (mock treatment).

Electrochemical measurements.

All electrochemical experiments were performed with a μ -AUTOLAB III (Metrohm, Herisau, Switzerland) potentiostat connected to a PC and the data collected were analyzed using Nova 1.7 software. Rotating disk electrode voltammetry was carried out by means of a three-electrode configuration: a platinum wire as counter electrode, a saturated calomel electrode (SCE) as reference, and a Pt rotating disk electrode (2 mm in diameter, EDI 101; Radiometer, Copenhagen, Denmark) as working electrode. The rotation speed was controlled with a speed control unit (CTV 101; Radiometer). Potentials are reported versus SCE. Voltammograms were recorded at 1,500 rpm.

The Fe^{3+} solutions were prepared by adding, in a 25-ml volumetric flask, 1.25×10^{-4} mol of Fe(III) chloride hexahydrate and 0, 1, 2, or 3 equivalents of BABA.

The Fe^{3+} solutions (5×10^{-3} M) were deoxygenated with argon and a positive overpressure of argon was maintained above the electrolyte during the entire measurement performed at room temperature.

UV-visible spectroscopy.

The spectra were recorded with a UV-visible diode array spectrometer (KINSPEC II/MMS-16 VIS, BIOLOGIC, Grenoble, France). The 150-W Xe lamp and the spectrometer were connected to the cell (optical length = 1 mm) by light fibers.

Statistics.

In order to detect significant differences between the treatments, one-way analysis of variance was performed using the statistical program STATGRAPHICS (release 5.1; Manugistic Inc., Rockville, MD, U.S.A.) followed by a multiple comparison procedure with the Fisher's least significant difference method ($P < 0.05$). For the Western blotting anti-ferritin and NAS4 and FER1 transcript accumulations in the plants grown in soil, significant differences from control plants were determined by the Student's t test (* indicates $P < 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the University of Burgundy, the Burgundy State (PARI AGRALE 8 project), and the French Ministry of Agriculture.

LITERATURE CITED

Aznar, A., Chen, N. W., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaële, D., Mouille, G., Boutet, S., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J. P., Thomine, S., Expert, D., and Dellagi, A. 2014. Scavenging iron: A novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores. *Plant Physiol.* 164:2167-2183.

Barberon, M., Zelaznya, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., and Vert, G. 2011. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:450-458.

Bauer, P., Thiel, T., Klatte, M., Bereczky, Z., Brumbarova, T., Hell, R., and Grosse, I. 2004. Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol.* 136:4169-4183.

Briat, J. F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., Cellier, F., and Gaymard, F. 2010. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann. Bot.* 105:811-822.

Chen, L., Dick, W. A., Streeter, J. G., and Hoitink, H. A. J. 1998. Fe chelates from compost microorganisms improve Fe nutrition of soybean and oat. *Plant Soil* 200:139-147.

Cohen, Y. 1994. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids. *Phytopathology* 84:55-59.

Cohen, Y., and Gisi, U. 1994. Systemic translocation of C-14 DL-3-amino-butyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45:441-456.

Cohen, Y., Reuveni, M., and Baider, A. 1999. Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:351-361.

Cohen, Y., Rubin, A. E., and Kilfin, G. 2010. Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- β -amino-butyric acid (BABA). *Eur. J. Plant Pathol.* 126:553-573.

Colangelo, E. P., and Guerinot, M. L. 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 16:3400-3412.

Connolly, E. L., Fett, J. P., and Guerinot, M. L. 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14:1347-1357.

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Mauch-Mani, B., Newman, M. A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., and Zimmerli, L. 2006. Priming: Getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1062-1071.

Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., and Mari, S. 2009. Metal movement within the plant: Contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* 103:1-11.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:5-17.

Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J. F., Gaymard, F., and Expert, D. 2005. Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* 43:262-272.

Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., and Expert, D. 2009. Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiol.* 150:1687-1696.

Expert, D. 1999. Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:307-334.

Furia, T. E. 1972. CRC Handbook of Food Additives, 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, U.S.A.

Gibbs, C. R. 1976. Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Anal. Chem.* 48:1197-1201.

Gould, K. S. 2004. Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004:314-320.

Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B. G. 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:149-187.

Han, B., Yang, Z., Samma, M. K., Wang, R., and Shen, W. 2013. Systematic validation of candidate reference genes for qRT-PCR normalization under iron deficiency in *Arabidopsis*. *Biometals* 26:403-413.

Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. 2008. Genevestigator V3: A reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinf.* 2008:420747.

Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2001. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:29-37.

Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2005. Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.* 139:267-274.

Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-Côte, E., Kunz, C., Soulie, M. C., Expert, D., and Dellagi, A. 2012. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 13:816-827.

Klatte, M., Schuler, M., Wirtz, M., Fink-Straube, C., Hell, R., and Bauer, P. 2009. The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol.* 150:257-271.

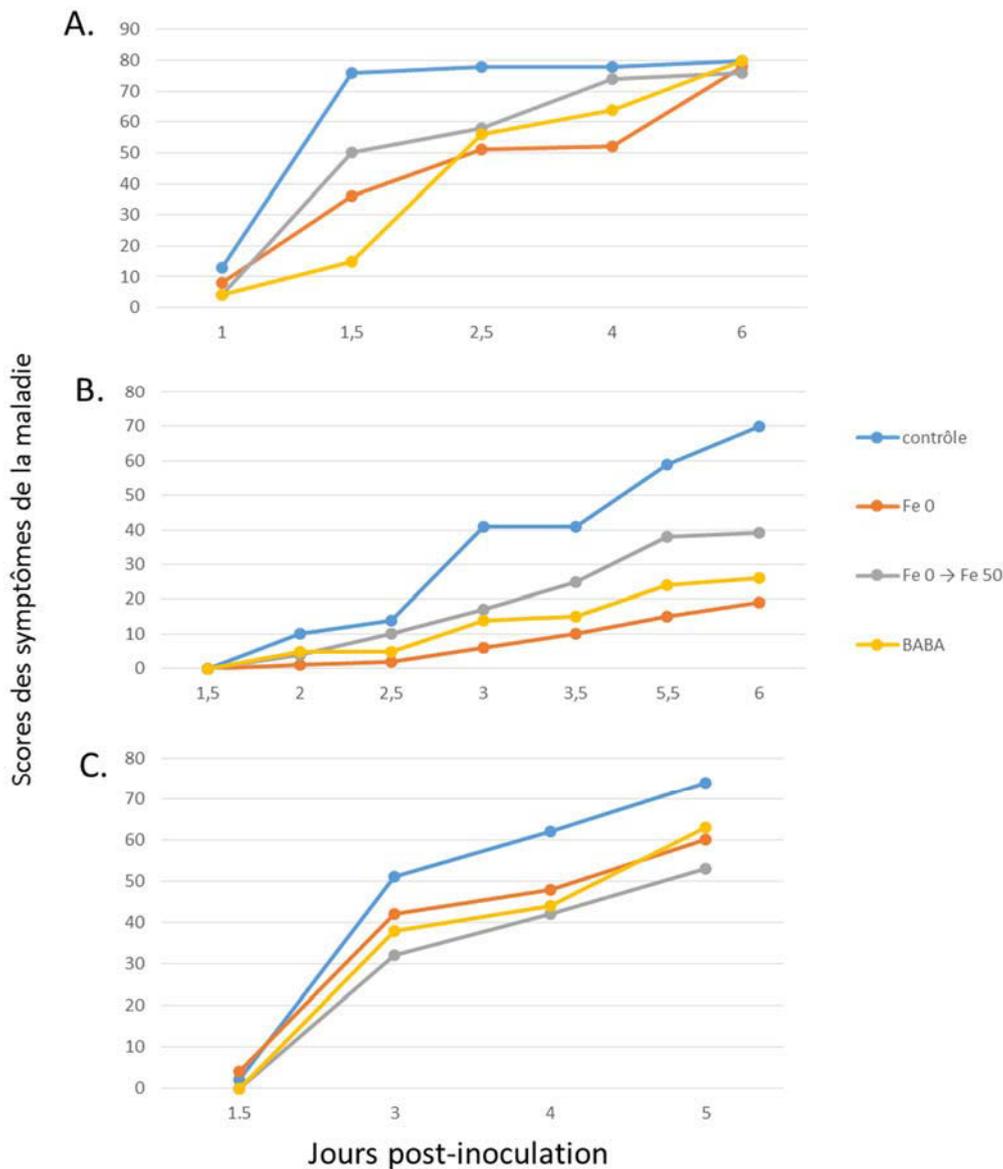
Koen, E., Szymańska, K., Klinguer, A., Dobrowolska, G., Besson-Bard, A., and Wendehenne, D. 2012. Nitric oxide and glutathione impact the expression of iron uptake- and iron transport-related genes as well as the content of metals in *A. thaliana* plants grown under iron deficiency. *Plant Signal. Behav.* 7:1246-1250.

Koen, E., Besson-Bard, A., Duc, C., Astier, J., Gravot, A., Richaud, P., Lamotte, O., Boucherez, J., Gaymard, F., and Wendehenne, D. 2013. *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure. *Plant Sci.* 209:1-11.

Lobréaux, S., Massenet, O., and Briat, J. F. 1992. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19:563-575.

Luna, E., van Hulten, M., Zhang, Y., Berkowitz, O., López, A., Pétriacq, P., Sellwood, M. A., Chen, B., Burrell, M., van de Meene, A., Pieterse, C.

- M., Flors, V., and Ton, J. 2014. Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 10:450-456.
- Mandado, M., and Cordeiro, M. N. 2010. On the stability of metal-amino acid complexes in water based on water-ligand exchange reactions and electronic properties: Detailed study on iron-glycine hexacoordinated complexes. *J. Comput. Chem.* 31:2735-2745.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., and Nishioka, T. 2009. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230:517-527.
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A. C., and Zeier, J. 2012. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24:5123-5141.
- Palmer, C. M., Hindt, M. N., Schmidt, H., Clemens, S., and Guerinot, M. L. 2013. *MYB10* and *MYB72* are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* 9:e1003953.
- Petit, J. M., Briat, J. F., and Lobréaux, S. 2001. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem. J.* 359:575-582.
- Pizarro, F., Olivares, M., Hertrampf, E., Mazariegos, D. I., Arredondo, M., Letelier, A., and Gidi, V. 2002. Iron bis-glycine chelate competes for the nonheme-iron absorption pathway. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:577-581.
- Po-Wen, C., Singh, P., and Zimmerli, L. 2013. Priming of the *Arabidopsis* pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 14:58-70.
- Ravet, K., Touraine, B., Kim, S. A., Cellier, F., Thomine, S., Guerinot, M. L., Briat, J. F., and Gaymard, F. 2009. Post-translational regulation of AtFER2 ferritin in response to intracellular iron trafficking during fruit development in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 2:1095-1106.
- Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L., and Guerinot, M. L. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694-697.
- Schuler, M., and Bauer, P. 2011. Heavy metals need assistance: The contribution of nicotianamine to metal circulation throughout the plant and the *Arabidopsis* NAS gene family. *Front. Plant Sci.* 2:69.
- Schuler, M., Keller, A., Backes, C., Philipp, K., Lenhof, H. P., and Bauer, P. 2011. Transcriptome analysis by GeneTrail revealed regulation of functional categories in response to alterations of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 11:87.
- Schuler, M., Rellán-Álvarez, R., Fink-Straube, C., Abadía, J., and Bauer, P. 2012. Nicotianamine functions in the Phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:2380-2400.
- Segond, D., Dellagi, A., Lanquar, V., Rigault, M., Patrit, O., Thomine, S., and Expert, D. 2009. NRAMP genes function in *Arabidopsis thaliana* resistance to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.* 58:195-207.
- Sivitz, A. B., Hermand, V., Curie, C., and Vert, G. 2012. *Arabidopsis* bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS One* 7:e44843.
- Stephan, U. W., Schmidke, I., Stephan, V. W., and Scholz, G. 1996. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals* 9:84-90.
- Ton, J., and Mauch-Mani, B. 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38:119-130.
- Ton, J., Jakab, G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M. N., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:987-999.
- Tsai, C. H., Singh, P., Chen, C. W., Thomas, J., Weber, J., Mauch-Mani, B., and Zimmerli, L. 2011. Priming for enhanced defence responses by specific inhibition of the *Arabidopsis* response to coronatine. *Plant J.* 65:469-479.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A., van der Heijden, W. H., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2008. Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1609-1621.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., and Lemanceau, P. 2007. Iron Acquisition from Fe Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:441-447.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., and Curie, C. 2002. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14:1223-1233.
- Vert, G. A., Briat, J. F., and Curie, C. 2003. Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol.* 132:796-804.
- von Röpenack, E., Parr, A., and Schulze-Lefert, P. 1998. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J. Biol. Chem.* 273:9013-9022.
- von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J. F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. A., and Hider, R. C. 1999. Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.* 119:1107-1114.
- Wu, C. C., Singh, P., Chen, M. C., and Zimmerli, L. 2010. L-Glutamine inhibits beta-aminobutyric acid-induced stress resistance and priming in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 61:995-1002.
- Yi, Y., and Guerinot, M. L. 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10:835-844.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12920-12925.
- Zimmerli, L., Métraux, J. P., and Mauch-Mani, B. 2001. Beta-aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 126:517-523.



Figures IV.1 : Evolution des symptômes de la maladie causée par *P. syringae* pv *tomato* DC3000 sur les feuilles de plantes d'*A. thaliana* pré-traitées par le BABA ou cultivées dans des conditions de carence en fer

Les graphiques A, B et C représentent respectivement 3 expériences indépendantes. La somme des scores présentés a été calculée sur 16 feuilles infectées par condition (score max 80). Chaque feuille a été examinée à différents temps entre l'infection et 6 jours post infection. Les scores ont été attribués selon la figure II-10.

3. Résultats complémentaires

3.1. Test de la sensibilité à *P. syringae* pv *tomato* DC3000

En complément des tests d'infection réalisés avec le pathogène *B. cinerea*, nous avons réalisé des tests à l'aide d'un second pathogène présentant un mode d'infection différent, la bactérie hémibiotrophe *P. syringae* pv *tomato* DC3000. Les plantes ont été cultivées et traitées de la même manière que pour les expériences précédentes. Après les différents traitements (Fe 50, BABA, Fe 0 → Fe 50 ou Fe 0), les plantes ont été infectées à l'aide d'une solution bactérienne à 10^6 CFU/mL, à raison de 4 feuilles/plante et 4 plantes/traitement (16 feuilles/traitement). L'évaluation du développement de la maladie a été réalisée par analyse visuelle de classes suivie de la somme de scores entre 1 jour et 6 jours post-infection comme décrit dans le § 4.6.2 de la partie matériels et méthodes. L'expérience a été répétée quatre fois, dont une fois sur des plantes plus âgées (cinq semaines au lieu de quatre, résultats non présentés).

Les résultats sont présentés dans la figure IV.1. Les résultats obtenus sont peu reproductibles. En effet, la cinétique du développement de la maladie, la rapidité d'apparition des symptômes ou des nécroses étaient très variables d'une expérience à l'autre, parfois les traitements ne semblaient pas avoir d'effet sur le développement de la maladie (figure IV.1C). Malgré tout, une tendance générale semble indiquer que les plantes traitées par le BABA et celles placées en condition de carence en fer présentent une meilleure résistance à *P. syringae*. L'évolution de la maladie a également été évaluée par comptage bactérien dans les tissus foliaires au début de l'infection (pour vérifier que le nombre de CFU injectés étaient homogènes entre les traitements) et à 3 jours post-infection. Pour cette expérience, les plantes ont été infectées avec une solution à 5.10^5 CFU/mL. Le comptage bactérien (résultats non présentés) n'a révélé aucune modification du développement de la bactérie dans les tissus foliaires des plantes cultivées dans nos différentes conditions. Il est donc difficile d'établir une conclusion claire sur la capacité de résistance des plantes en réponse à *P. syringae* pv *tomato* DC3000 en fonction des différents traitements. La mise au point d'un mode d'infection permettant l'obtention de résultats plus reproductibles et l'utilisation d'un contrôle positif et/ou négatif permettant d'affirmer que l'infection se déroule correctement et que les plantes sont capables de se défendre, seraient nécessaires pour déterminer avec certitude l'effet du BABA et de la

IV. Chapitre 2

carence en fer (transitoire ou prolongée) sur la sévérité de l'infection causée par *P. syringae* pv *tomato* DC3000.

CHAPITRE 3

Autres contributions

V. Autres contributions

1. Introduction

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule diatomique constituée d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène. *In vivo*, le NO existe sous trois états redox :

- sous forme radicalaire NO \cdot , l'électron non apparié étant porté soit par l'atome d'azote, soit par l'atome d'oxygène dans deux formes mésomères,
- sous une forme oxydée NO $^+$ appelée cation nitrosonium,
- sous une forme réduite NO $^-$ appelée anion nitroxyl.

Le terme NO désigne ces 3 états redox. Bien que chimiquement proches, le NO \cdot , le NO $^+$ et le NO $^-$ sont capables d'initier/propager des processus cellulaires distincts et servent de précurseurs à la synthèse de dérivés possédant à leur tour une réactivité propre (Stamler *et al*, 1992 ; Thomas *et al*, 2008). Parmi ces dérivés, citons par exemple le peroxydinitrite ONOO $^-$ issu du couplage entre le NO \cdot et les anions superoxydes, le radical dioxyde d'azote NO $_2\cdot$ et le trioxyde de diazote N $_2$ O $_3$ dérivés de l'interaction entre NO \cdot et l'oxygène moléculaire et enfin les nitrosothiols résultant de l'interaction entre NO $^+$ et le/les atomes de soufre de thiolates. Le NO et ses dérivés sont communément appelés espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species* ou RNS).

Chez les animaux, l'oxyde nitrique synthase (NOS) est la principale source enzymatique de NO. Cette enzyme présente trois isoformes appelées respectivement NOS neuronale (ou NOS I), NOS inductible (ou NOS II) et NOS endothéliale (NOS III) (Stuehr *et al*, 2004 ; Campbell *et al*, 2014). Les NOS I et III sont constitutives alors que la NOS II, en particulier exprimée dans les types cellulaires associés à l'immunité, est inductible. Classiquement, on attribue un rôle de molécule signalétique au NO produit par les NOS constitutives. En effet, ces dernières sont mobilisées dans des processus tels que la neurotransmission ou la relaxation musculaire (Wendehenne *et al*, 2001). Concernant le NO synthétisé par la NOS II, il joue un rôle essentiel dans l'immunité : d'une part en exerçant des activités cytotoxiques vis-à-vis des microorganismes pathogènes, d'autre part en tant que molécule de signalisation dans les macrophages et autres cellules immunitaires (Mustafa *et al*, 2009). L'étude des processus moléculaires fins par lesquels le NO exerce ses activités a été et est l'objet de nombreuses études. Les travaux pionniers

réalisés dans les années 1990 ont apporté des premiers éléments en démontrant que le NO est capable de réguler l'activité, la fonction ou bien la localisation des protéines au niveau post-traductionnel *via* trois principaux mécanismes (Hanafy *et al*, 2001 ; Schopfer *et al*, 2003 ; Gould *et al*, 2013) :

- la métal-nitrosylation : dans ce processus réversible, le NO[•] interagit avec l'atome de fer de protéines à centre fer-soufre (exemple de l'aconitase) ou possédant un noyau héminique (exemple de la guanylate cyclase soluble),
- la tyrosine nitration : dans ce cas de figure, le ONOO⁻, probablement *via* sa dégradation en NO₂[•] et radical hydroxyl (HO[•]), promeut la nitration du groupement aromatique de la chaîne latérale du résidu tyrosine, formant un résidu 3-nitrotyrosine,
- la S-nitrosylation où le NO⁺ établit un pont covalent réversible avec le thiolate d'un résidu cystéine.

Grâce à l'établissement de protocoles permettant d'identifier ces protéines tels que la méthode de *Biotin Switch* dédiée à la purification de protéines S-nitrosylées (Jaffrey *et al*, 2001), de très nombreuses protéines régulées par ces modifications post-traductionnelles ont été caractérisées. Ces caractérisations ont permis de mettre à jour des processus originaux de signalisation cellulaire et de mieux comprendre les fonctions du NO. Par exemple, il a pu être établi que le NO joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie calcique grâce à sa capacité à réguler l'activité de canaux perméables au Ca²⁺ par S-nitrosylation (Clementi, 1998).

La communauté scientifique s'intéresse aux fonctions du NO chez les plantes depuis la fin des années 1990 suite à la publication de travaux pionniers démontrant son rôle dans l'immunité (Delledonne *et al*, 1998 ; Durner *et al*, 1998). A l'image de la situation chez les mammifères, il s'avère que le NO est un médiateur physiologique impliqué dans des processus variés chez les plantes. Il joue en effet un rôle clé dans la germination, le développement des racines, la fermeture des stomates, la floraison et l'homéostasie du fer (Yu *et al*, 2014). De plus, outre son implication dans les réponses de défense des plantes (Wendehenne *et al*, 2014), il est impliqué dans la symbiose bactérienne (Meilhoc *et al*, 2011) et, plus généralement, la réponse aux stress abiotiques (Gould *et al*, 2003 ; Corpas *et al*, 2008). Là encore, sa synthèse et son mode d'action ont été et sont au cœur des activités d'un nombre croissant d'équipes de recherche. Concernant sa synthèse, des

travaux de biochimie, de génétique et de pharmacologie démontrent clairement que le nitrite (NO_2^-) est un substrat majeur du NO chez les plantes. Le NO_2^- peut en effet être réduit en NO chimiquement ou de façon enzymatique *via* la nitrate réductase (Gupta *et al*, 2011 ; Igamberdiev *et al*, 2014). D'autres substrats ont également été proposés : les polyamines et la L-arginine mais les processus associés à leur catalyse en NO n'ont pas été découverts. A ce titre, des arguments expérimentaux en faveur de l'existence d'une NOS chez les plantes ont été avancés : d'une part des activités NOS ont été mesurées dans différents tissus voire dans différents organistes cellulaires incluant le noyau et les peroxysomes ; d'autre part des inhibiteurs de NOS de mammifères se sont avérés efficaces pour réduire la synthèse de NO (Corpas *et al*, 2009). En accord avec ces données, une NOS présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires à celles des NOS animales a été identifiée chez l'algue *Ostreococcus tauri* (Foresi *et al*, 2010). Toutefois, dans le contexte d'un consortium international "The 1000 plants project" (1 KP, <http://www.onekp.com/>), mon équipe d'accueil a recherché l'existence d'une NOS dans le transcriptome de 1087 plantes terrestres et de 241 espèces d'algues. Aucun transcrit codant une NOS potentielle n'a été identifié dans les plantes terrestres et seuls 13 espèces d'algues en possèdent, incluant *Ostreococcus tauri* (Jeandroz *et al*, soumis). Ces données, confirmées par des recherches dans les génomes de plantes actuellement disponibles, remettent en cause l'existence d'une NOS chez les plantes terrestres.

Concernant le mode d'action du NO chez les plantes, des mécanismes proches de ceux inventoriés chez les animaux ont été décrits. En effet, le NO exerce une activité signalétique en combinaison avec d'autres messagers cellulaires tels que le GMP cyclique, le Ca^{2+} et les formes réactives de l'oxygène. De plus, il régule l'activité de différentes protéines, en particulier par des processus de S-nitrosylation et de tyrosine nitration. L'article de synthèse "NO signaling in plant immunity : A tale of messengers" (Trapet *et al*, 2015) présenté dans les pages suivantes décrit certaines des fonctions du NO dans les processus de signalisation cellulaire associés à l'immunité chez les plantes.

2. Ma contribution

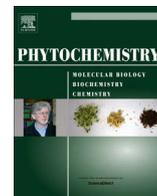
Mon équipe d'accueil a été l'une des équipes pionnières dans l'étude du rôle du NO dans l'immunité des plantes. Elle s'est particulièrement intéressée aux régulations croisées s'opérant entre la signalisation calcique et le NO et à l'identification/caractérisation fonctionnelle de protéines régulées par le NO par le

mécanisme de S-nitrosylation. Lors de sa thèse dans l'équipe, Jérémy Astier a identifié une quinzaine de protéines spécifiquement S-nitrosylées dans des cellules de tabac dont la réponse immunitaire a été élicitée par la cryptogéine (Astier *et al*, 2012a). La cryptogéine est une protéine de 10 kDa sécrétée par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* déclenchant une HR et une SAR chez le tabac. Parmi ces protéines figure un chaperonne, CDC48, maintenant bien caractérisée (Astier *et al*, 2012a ; Rosnoblet *et al*, soumis), une isoforme de calmoduline (Jeandroz *et al*, 2013) et la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse du chorismate, cible du glyphosate, la molécule active du Round Up.

J'ai réalisé mon stage de Master 2 Recherche dans l'équipe. Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'incidence fonctionnelle de la S-nitrosylation de l'EPSPS (analyse *in silico* ; production de la protéine en système bactérien hétérologue) et de CDC48 (impact de la surexpression transitoire de CDC48 non mutée et mutée au site de S-nitrosylation sur le développement de la HR conférée par la cryptogéine dans des feuilles de tabac).

J'ai partiellement poursuivi mon implication dans cette thématique lors de ma thèse en participant aux travaux relatifs à la S-nitrosylation de l'isoforme de calmoduline. Les données acquises par l'équipe ont fait l'objet d'un article intitulé "There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca²⁺ Signaling" où je suis cinquième auteur et qui est présenté dans les pages suivantes. Un résultat marquant est que le résidu cystéine S-nitrosylé est localisé dans le premier motif EF-hand de la protéine, suggérant que la S-nitrosylation pourrait avoir une incidence sur la dynamique de fixation du Ca²⁺. Mon implication s'est concrétisée par un séjour dans le Centre de Biologie Moléculaire Structurale de l'Université de Santa Catarina au Brésil dirigé par le Professeur Hernán Terenzi. Ce séjour a été financé par le programme CAPES-COFECUB (Sv785-13 "Involvement of Nitric Oxide (NO) target proteins in plants under stress"). Durant ce séjour, j'ai réalisé des expériences démontrant que la protéine recombinante est S-nitrosylée *in vitro*. De plus, j'ai initié des expériences de dichroïsme circulaire afin d'étudier si la structure secondaire de la protéine est impactée par le NO. Ces travaux sont actuellement poursuivis dans mon équipe d'accueil.

**3. Article scientifique n°3 :
NO signaling in plant immunity: A tale of messengers**



Review

NO signaling in plant immunity: A tale of messengers



Pauline Trapet^{a,e}, Anna Kulik^{b,e}, Olivier Lamotte^{c,e}, Sylvain Jeandroz^{d,e}, Stéphane Bourque^{a,e},
Valérie Nicolas-Francès^{a,e}, Claire Rosnoblet^{a,e}, Angélique Besson-Bard^{a,e}, David Wendehenne^{a,e,*}

^a Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

^b INRA, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

^c CNRS, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

^d AgroSup Dijon, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

^e ERL CNRS 6300, BP 86510, 21000 Dijon, France

This paper forms part of a special issue of *Phytochemistry* dedicated to the memory and legacy of Professor (Godfrey) Paul Bolwell, MA DSc (Oxon). (1946–2012), internationally-recognised plant biochemist and Regional Editor of *Phytochemistry* (2004–2012). He is much missed by his friends.

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 5 April 2014

Keywords:

Calcium
Calmodulin
Cell death
Nitric oxide
Reactive oxygen species
Signaling

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical gas involved in a myriad of plant physiological processes including immune responses. How NO mediates its biological effects in plant facing microbial pathogen attack is an unresolved question. Insights into the molecular mechanisms by which it propagates signals reveal the contribution of this simple gas in complex signaling pathways shared with reactive oxygen species (ROS) and the second messenger Ca^{2+} . Understanding of the subtle cross-talks operating between these signals was greatly improved by the recent identification and the functional analysis of proteins regulated through S-nitrosylation, a major NO-dependent post-translational protein modification. Overall, these findings suggest that NO is probably an important component of the mechanism coordinating and regulating Ca^{2+} and ROS signaling in plant immunity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

Introduction.....	72
Cross-talk between NO and Ca^{2+} in immune signaling.....	73
NO, a component of Ca^{2+} -dependent signaling cascades.....	73
CaM, a target of NO-induced post-translational protein modification.....	74
NO regulates the expression of Ca^{2+} signaling-related genes.....	74
The NO–ROS connection.....	75
Reciprocal influence of NO and ROS.....	75
NO and ROS as cell death mediators.....	76
Conclusions and perspectives.....	77
Acknowledgments.....	78
References.....	78

Introduction

Nitric oxide (NO) is a free radical gas produced by most, if not all organisms. The last fifteen years brought several landmarks to the field of NO functions in plant physiology. NO is now recognized to act as a ubiquitous cell signaling molecule involved in various

* Corresponding author at: Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, F-21000 Dijon, France. Tel.: +33 380693752; fax: +33 380693753.

E-mail address: wendehen@dijon.inra.fr (D. Wendehenne).

processes such as root growth, iron uptake and sequestration, flowering, pollen tube growth, stomatal closure or hormonal signaling (Besson-Bard et al., 2008b; Simontacchi et al., 2013). It has also been linked to the plant adaptive responses to pathogenic and symbiotic micro-organisms (Frederickson Matika and Loake, 2013; Puppo et al., 2013) as well to abiotic stresses (Corpas et al., 2011). Undoubtedly, research devoted to its role in plant immunity has received particular attention since the publication of pioneer works underlying the ability of plants to use NO as a signal to defend themselves from invaders (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). It is now well documented that NO produced in plant cells challenged by pathogens, MAMPs (Microbe-Associated Molecular Pattern) and DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) is integrated in signaling cascades leading to the expression of defense-related genes, the production of secondary metabolites and, ultimately, to HR (Hypersensitive Response) (Bellin et al., 2013; Gaupels et al., 2011a,b; Leitner et al., 2009). Genetic, biochemical and pharmacological studies point to nitrate reductase (NR) and a still unidentified enzyme related to mammalian nitric oxide synthase as the main enzymatic sources for NO in plant immune responses. However, how NO is indeed generated remains largely unclear and controversial (Moreau et al., 2010).

As a ubiquitous messenger, a main and still ongoing question is how the information encrypted in the pathogen-induced increases in NO concentration helps to define the outcome of the response. Emerging data highlight that NO is a component of complex but poorly understood networks of signaling compounds including reactive oxygen species (ROS), hormones and the second messengers Ca^{2+} , cyclic GMP, cyclic AMP and cyclic ADP-ribose (Courtois et al., 2008; Gaupels et al., 2011a,b; Jeandroz et al., 2013; Ma et al., 2012). Several studies also support a role for lipids and protein kinases in regulating and/or mediating NO-induced responses (Courtois et al., 2008; Mandal et al., 2012). Why does it have to be so complicated? The response probably relies on NO chemistry. Due to its redox nature, NO is capable of wide range of physiologically relevant chemical reactions. Indeed, as a free radical possessing an unpaired electron, NO reacts with species containing unpaired electrons such as superoxide (O_2^-) and with transition metals, notably iron (Stamler et al., 1992). Furthermore, through derivatives such as the nitrosonium ion (NO^+) and higher oxides of nitrogen (notably NO_2 , N_2O_3) NO reacts with thiolate or, in the case of peroxynitrite ($ONOO^-$), with tyrosine (Ferrer-Sueta and Radi, 2009; Martínez-Ruiz et al., 2013). Basically, this means that contrary to conventional signaling molecules, NO is unlikely to interact with a unique defined receptor but rather with numerous target proteins.

A central physiological NO-based protein modification appears to be effected by S-nitrosylation. This process designs the reversible incorporation of an NO moiety by covalent bonding to a reactive Cys residue (Stamler et al., 2001). Nowadays, the literature review identified more than 100 proteins putatively S-nitrosylated in plants (see for instance Lindermayr et al., 2005; Tanou et al., 2009). These proteins are involved in all key cellular functions. However, few of them were identified in biological conditions in which the influence of endogenously produced NO was investigated. Furthermore, a role for S-nitrosylated proteins in plant immunity has been ascribed for only a handful of candidates. This includes *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidase AtRBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homologue D) (Yun et al., 2011), Peroxiredoxin II E (PrXII; Romero-Puertas et al., 2007), NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related gene 1; Tada et al., 2008), the transcription factor TGA1 (TGACC sequence-specific binding protein 1) (Lindermayr et al., 2010) and SABP3 (Salicylic Acid-Binding Protein 3) (Wang et al., 2009a,b). S-nitrosylation influences the activity and function of these proteins in different ways: by impacting the binding of cofactors as reported for AtRBOHD and SABP3, by

interfering with active-site Cys residues as shown for PrXII, by promoting the formation of disulfide bonds and, consequently, the switches between the monomeric/oligomeric states in the specific case of NPR1 and, conversely, by protecting Cys residues from formation of disulfide bonds as suspected for TGA1. It might also facilitate protein translocation between subcellular compartments as well as protein interactions as shown for NPR1 and TGA1. Several recent reviews have precisely addressed the incidence of NO on the structure, activities and functions of these proteins (see for instance Astier et al., 2012; Frederickson Matika and Loake, 2013; Kovacs and Lindermayr, 2013) but, with the exception of AtRBOHD and PrXII, these aspects will not be covered here. Beside S-nitrosylation, tyrosine nitration and metal S-nitrosylation represent other NO-dependent post-translational modifications of proteins that might regulate cellular functions (Besson-Bard et al., 2008b; Jacques et al., 2013; Vandelle and Delledonne, 2011). Involvement and incidences of these processes in plant defenses have garnered less attention and, so far, are poorly understood.

As stated above, the picture that has formed indicates that the propagation and regulation of NO signaling entails cross-talk with other cell signals and, probably, with pathways involving NO-independent post-translational modifications such as phosphorylation. The purpose of this review is to summarize studies highlighting the occurrence of cross-talks operating between NO and Ca^{2+} -or ROS-based signaling in plant immunity. The potential generality and importance of S-nitrosylation in these cross-talks are also discussed.

Cross-talk between NO and Ca^{2+} in immune signaling

NO, a component of Ca^{2+} -dependent signaling cascades

Increasing evidences document the occurrence of a cross-talk between NO and Ca^{2+} signaling pathways in cells challenged by pathogen attack, MAMPs or DAMPs. First, MAMPs- and DAMPs-induced NO production has been shown to be under the control of Ca^{2+} influxes originating from the extracellular space. For instance, pharmacological inhibition of the influx of extracellular Ca^{2+} triggered by the elicitor cryptogein in tobacco cell suspensions (Lamotte et al., 2004), by endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* in grape cells (Vandelle et al., 2006) and by LPS (lipopolysaccharide) or oligogalacturonides (OGs) in *A. thaliana* leaves (Ali et al., 2007; Rasul et al., 2012) led to a significant suppression of NO synthesis. Both genetic and pharmacological data point to CNGCs (Cyclic Nucleotides-Gated ion Channel) as plant cell channels mobilized in response to pathogenic invaders or MAMPs and mediating the Ca^{2+} fluxes required for NO production (Ma and Berkowitz, 2011). Notably, using the *dnd1* (*defense no death1*) *A. thaliana* mutant that has a null mutation in the CNGC2 gene, in their pioneer work, Ali et al. (2007) linked a CNGC2-dependent plasma membrane Ca^{2+} conductance to downstream NO generation in *A. thaliana* cells responding to LPS and, more generally, undergoing HR. Further investigations favor the involvement of CaM (calmodulin) and protein kinases including MAPKs (Mitogen-Activated protein Kinases) and CDPKs (Ca^{2+} -Dependent Protein Kinases) in transducing the Ca^{2+} current to NO synthesis (reviews by Jeandroz et al., 2013; Ma and Berkowitz, 2011; see also Ma et al., 2013). More recently, a great deal of attention has been paid to the Ca^{2+} permeable channels glutamate receptors (GLR) as molecular components of the signaling processes related to plant defense responses (Kwaaitaal et al., 2011; Mousavi et al., 2013). Interestingly, animal GLR antagonists were shown to impair elicitors-induced NO synthesis in tobacco (Vatsa et al., 2011) and *A. thaliana* (Manzoor et al., 2013), thus providing evidences that GLRs could link the Ca^{2+} signal and NO generation. Manzoor et al. (2013)

further demonstrated that AtGLR3.3, one of the 20 GLRs in *A. thaliana* playing a key role in resistance against *Hyaloperonospora arabidopsidis* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Li et al., 2013), partly controls the production of NO and ROS observed in response to OGs. Accordingly, the OG-induced NO synthesis was reduced of about 20–35% in leaves of three distinct *atglr3.3* mutant lines. Taken together, these data highlight that both CNGCs and GLRs facilitate cytosolic Ca²⁺ elevation and subsequent events including NO synthesis in response to pathogen signals.

Second, NO is also recognized to account for Ca²⁺ mobilization in plant cells exposed to MAMPs. Typically, MAMPs elicit a transient increase in free cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt}) originating from extracellular spaces and/or intracellular stores (Lecourieux et al., 2006). This increase is a key step in the signaling processes leading to defense gene expression and HR (Ma and Berkowitz, 2011). Pharmacological inhibition of NO synthesis or its scavenging were found to attenuate MAMPs-triggered [Ca²⁺]_{cyt} elevation, indicating that NO is one of the factors positively regulating Ca²⁺ fluxes into the cytosol (review by Courtois et al., 2008). The Ca²⁺-mobilizing activity of NO was further confirmed by the observation that treatment of tobacco and *A. thaliana* plant cell suspensions as well as *Vicia faba* and *A. thaliana* guard cells with NO donors was accompanied by a fast and transient increase in [Ca²⁺]_{cyt} (Aboul-Soud et al., 2009; Besson-Bard et al., 2008a; Garcia-Mata et al., 2003; Lamotte et al., 2006). Initial investigations using mammalian Ca²⁺ channels inhibitors and second messengers antagonists/agonists suggest that the effects of NO on Ca²⁺ homeostasis requires the participation of cyclic GMP (cGMP) and/or cyclic ADP ribose (cADPR), a Ca²⁺-mobilizing second messenger (Durner et al., 1998; Garcia-Mata et al., 2003). Interestingly, these mechanisms resemble those described in sea urchin cells in which NO initiates a signal transduction cascade involving cGMP and cADPR and leading to the increase of [Ca²⁺]_{cyt} through the activation of intracellular Ca²⁺ channels including ryanodine receptors (RYR; Willmott et al., 1996). Studies also pointed out for a role of protein kinases in the mediation of NO action on Ca²⁺ mobilization (Sokolowski et al., 2005). Notably, Lamotte et al. (2006) identified a SnRK2 (SNF1-Related protein Kinase 2) kinase named NtOSAK (*Nicotiana tabacum* Osmotic Stress-Activated Protein Kinase) which activity was induced within minutes in tobacco cells exposed to NO donors. Interestingly, its activation preceded the increase in [Ca²⁺]_{cyt} triggered by NO, both NtOSAK activity and [Ca²⁺]_{cyt} elevation being blocked by protein kinase inhibitors. Based on this observation, it has been assumed that NtOSAK could be a signaling component linking NO and Ca²⁺ fluxes (Besson-Bard et al., 2008a). Although the tight mechanisms underlying NtOSAK activation by NO have been partly resolved (Wawer et al., 2010), a role for NtOSAK in mediating NO action on Ca²⁺ has not been confirmed yet. In contrast, experimental arguments favoring its involvement in the regulation of ROS production in plants facing cadmium exposure have been reported (Kulik et al., 2012). Therefore, the exact mechanisms of NO-induced Ca²⁺ mobilization is still an open question.

CaM, a target of NO-induced post-translational protein modification

Collectively, the findings summarized here illustrate the complexity of the interplays between NO and Ca²⁺ signaling in response to pathogen signals: NO production requires Ca²⁺ and, in turn, NO acts as an agonist that can further mobilize Ca²⁺. In other words, NO appears as a step in the signaling cascade initiated by Ca²⁺ and as an amplifier of Ca²⁺ signals. Here too, this action of NO is well described in animals. For instance, in the early 90's Peunova and Enikolopov (1993) demonstrated that in the central and peripheral nervous system, the amplification of the Ca²⁺ signals by NO leads to the production of highly active transcription factors reprogramming the pattern of gene expression during neu-

rotransmission. Certainly, many questions still remain. Notably, while the Ca²⁺-related molecular actors acting upstream of NO are being discovered, an accurate explanation is still needed for how NO mediates the Ca²⁺ signals. In this regard, the possibility that NO could regulate CaM has recently emerged. CaMs form a major group of Ca²⁺ sensors possessing typically 4 helix-loop-helix EF hand motifs that bind Ca²⁺ with micromolar affinity (McCormack et al., 2005). Ca²⁺ binding triggers a conformational change affecting interactions with and activities of many target proteins. Through this mechanism, changes in cellular [Ca²⁺] perceived by CaM are transduced into a cellular response (Batistic and Kudla, 2012; Lewit-Bentley and Réty, 2000; Perochon et al., 2011). Via a proteomic approach, Astier et al. (2012) identified a dozen of proteins undergoing S-nitrosylation in tobacco cell suspensions elicited by the elicitor cryptogein. Interestingly, the corresponding list of endogenously S-nitrosylated proteins included a CaM isoform. According to Yamakawa et al. (2001), the genome of tobacco (*N. tabacum* L. cv *Samsun*) contains at least 13 CaM genes (*NtCaM1* to *NtCaM13*) encoding three distinct protein isoforms classified into three groups (group I: *NtCaM1/2*, group II: *NtCaM3* to 12 and group III represented by *NtCaM13*). The peptide identified in the mass spectrometry analysis by Astier et al. (2012) is conserved in the CaM isoforms belonging to groups I and II. It is noteworthy that this peptide corresponds to the EF-1 domain located in the N-terminal part of the protein and contains the Cys residue (Cys-27) undergoing S-nitrosylation in tobacco cells exposed to cryptogein. *In silico* structural analysis indicated that Cys-27 displays several features of S-nitrosylated residues: it is in close proximity to charged residues and its side chain is exposed in solvent accessible surface of the protein (Jeandroz et al., 2013). Importantly, this analysis also revealed a functional role for Cys-27 in Ca²⁺ binding within the EF-1 domain as its carbonyl oxygen participates in the cation coordination.

What could be the incidence of CaM S-nitrosylation? As previously mentioned, the CaM/Ca²⁺ complex regulates a variety of cellular responses by modulating the activities of target proteins involved in various cellular processes ranging from metabolism to transcriptional regulation (Batistic and Kudla, 2012). It is therefore not surprising that CaM appears as a key player in plant immune responses to pathogens (Ma and Berkowitz, 2011). For instance, transcripts encoding tobacco *NtCaM1*, 2 and 13 showed an increased accumulation during the HR triggered by tobacco mosaic virus (TMV) and in response to salicylic acid (SA) (Yamakawa et al., 2001). In a follow-on study, it has been reported that *NtCaM13* is also involved in the basal resistance to necrotrophic pathogens (Takabatake et al., 2007). Also, numerous experiments based on CaM antagonists and mutants impaired in CaM expression suggested the involvement of CaM in the pathogens-induced pathways leading to NO synthesis (see above and for instance Ma et al., 2008). Based on its involvement in Ca²⁺ coordination of the EF-1 domain, Jeandroz et al. (2013) assumed that the S-nitrosylation of Cys-27 could impact its affinity for Ca²⁺ and/or its interaction with its protein partners, thus altering the subsequent signaling cascade. If such scenario occurs, CaM S-nitrosylation could represent a feedback mechanism switching off Ca²⁺ signaling. More generally, as a presence of a Cys residue within CaM EF hand motifs is mostly found in plants CaM (McCormack et al., 2005), its S-nitrosylation could represent a plant-specific redox-based control of Ca²⁺ signaling. Therefore, such a model is quite attractive and a closer examination of the incidence of CaM S-nitrosylation might be very informative.

NO regulates the expression of Ca²⁺ signaling-related genes

Finally, a last issue of the cross-talk between NO and Ca²⁺ concerns gene expression. Microarray analyses have identified numer-

ous genes modulated in plant tissues or cells suspensions exposed to NO donors (review by Besson-Bard et al., 2009). The large panel of functions assigned to NO target genes essentially concerns all main cellular activities, including signaling. A recent study specifically focused on the identification of Ca^{2+} signaling-related genes modulated by NO produced in *A. thaliana* leaves following OG treatment (Jeandroz et al., 2013). Choice of this biological model was motivated by previous findings highlighting a key role for NO in the defense responses triggered by this DAMP (Rasul et al., 2012). Transcript accumulation of about 1400 OG-modulated genes was found to be regulated by a NO-dependent process. Amongst these ones, 25 were predicted to encode products related to Ca^{2+} signaling including GLRs, CaM-binding proteins and EF hand-containing proteins such as CaM-like (CML), CDPK and calcineurin B-like (CBL) proteins. Most of these genes were up-regulated and, for some of them such as the CaM-binding protein CBP60g (Wang et al., 2009a,b), their contribution in plant defense was previously assigned. Globally, this transcriptomic study suggests that NO also acts as a signal controlling the renewal and/or amplification of the Ca^{2+} signaling machinery in plant cells expressing defense responses.

The evidences we have reviewed document that NO and Ca^{2+} , as signals produced and/or mobilized in plant challenged by pathogens or derived eliciting compounds, interact at multiple levels (Fig. 1). Notably, NO could potentially modulate several steps in intracellular Ca^{2+} pathways by regulating Ca^{2+} fluxes, CaM activity and Ca^{2+} signaling-related genes. Numerous studies in animals support this concept and demonstrate that the cross-talks between NO and Ca^{2+} play a crucial role in both physiological and pathophysiological processes (see for instance Patel et al., 1999).

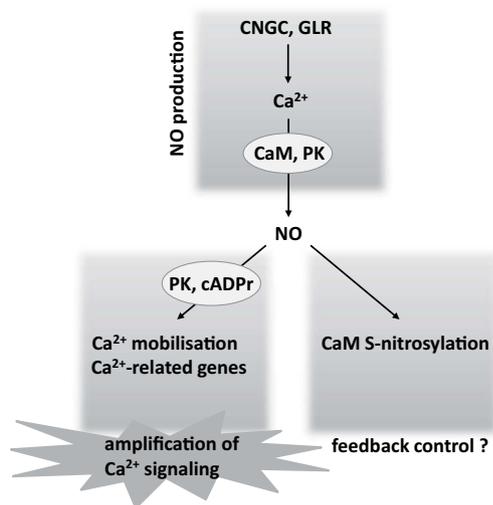


Fig. 1. Cross-talk between NO and Ca^{2+} in immune signaling. In response to pathogens or derived signals, NO production is regulated through upstream Ca^{2+} -dependent processes. Components of these processes include CaM (calmodulin), protein kinases (PK) and plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels mediating extracellular Ca^{2+} influxes. Several members of the CNGC (Cyclic Nucleotides-Gated ion Channel) and GLR (Glutamate receptor) families have been involved as key channels contributing to the Ca^{2+} fluxes leading to NO synthesis. Once produced NO amplifies Ca^{2+} signaling through (at least) two processes: first, by acting as a Ca^{2+} -mobilizing messenger promoting increases of the cytosolic free Ca^{2+} concentration. Several studies pointed out for a role of PKs and of the second messenger cyclic ADP ribose (cADPR) as intermediates of NO action. Second, by promoting the expression of genes encoding proteins related to Ca^{2+} signaling such as Ca^{2+} -sensors and GLRs. This process could also contribute to the renewal of the Ca^{2+} signaling machinery. We assume that NO might also negatively control Ca^{2+} signaling by exerting feedback control mechanisms of Ca^{2+} -sensors or other Ca^{2+} -related proteins, for instance through the S-nitrosylation of CaM.

The NO–ROS connection

It is well established that ROS and NO play a critical role in plant immune responses (Wang et al., 2013). ROS are usually considered to be damaging factors but, on the other hand, together with NO constitute important signaling species. Similarly to the situation encountered in animal, NO and ROS also exert mutual influences at multiple steps.

Reciprocal influence of NO and ROS

One common observation is that following pathogen infection, the production of NO and ROS occur in the same time windows, thus allowing cross-regulation (Asai and Yoshioka, 2009; Delledonne et al., 1998; Foissner et al., 2000; Perchepped et al., 2010). Supporting this statement, evidences that ROS control NO production and *vice versa* have been reported. For instance, the synthesis of NO induced by chitosan in *Pisum sativum* guard cells appeared to be regulated through a ROS-dependent process (Srivastava et al., 2009). Similarly, the production of NO induced by the elicitor cryptogein in tobacco cell suspensions was found to be partly under the control of a ROS-dependent pathway involving the NADPH oxidase NtRBOHD (Kulik et al., 2014). Conversely, Rasul et al. (2012) reported that NO is required for the proper production of H_2O_2 derived from AtRBOHD in *A. thaliana* leaves elicited by OGs. A similar observation was made in grape cells elicited by *B. cinerea* endopolygalacturonase 1 (Vandelle et al., 2006). Explanation for these discrepancies has not been reported yet. Besides the specificity inherent to the biological models, they may also reflect a complex signaling topology and clearly indicate that not enough signaling actors have been identified. We assume that Ca^{2+} fluxes might constitute a crucial molecular link as NO and ROS productions are typically Ca^{2+} -dependent and both species account for Ca^{2+} mobilization in plant signaling (Lecourieux et al., 2006; Fredrickson Matika and Loake, 2013). NO could also trigger an increase of ROS by down-regulating ROS-detoxifying enzymes. This view is in accordance with findings showing that S-nitrosylation decreases the activity of cytosolic ascorbate peroxidase (de Pinto et al., 2013) and catalase (Ortega-Galisteo et al., 2012). The reciprocal influence of NO and ROS should be also discussed in terms of radicals chemistry. As free radicals, NO and O_2^- react rapidly to form ONOO^- , a biological important oxidant in mammals involved in immunity and acting as a pathogenic mediator in a variety of diseases (Radi, 2013). Numerous experiments have now indicated that ONOO^- is produced by plant cells facing pathogen attack or elicitors (Gaupels et al., 2011a,b; Kulik et al., 2014; Saito et al., 2006). Furthermore, first nitrated proteins regulated at the post-translational levels through ONOO^- , a process referred as tyrosine nitration, were recently identified (Cecconi et al., 2009; Corpas et al., 2013; Vandelle and Delledonne, 2011). These proteins are involved in various cellular processes such as photosynthesis, primary metabolism, nitrate assimilation, antioxidant defenses and cellular architecture. Basically, the formation of ONOO^- might negatively regulate ROS production. Indeed, by interacting with O_2^- , NO competes with superoxide dismutase (SOD) and therefore negatively impact H_2O_2 production (Ferrer-Sueta and Radi, 2009). Consistent with this idea, impairment of NO production in leaves of *Nicotiana benthamiana* inoculated with *B. cinerea* (Asai and Yoshioka, 2009) or of oat (*Avena sativa*) infected with the crown rust fungus *Puccinia coronata* sp. *Avenae* (Tada et al., 2004) led to an increased oxidative burst. A similar statement has been made in tobacco cells exposed to cryptogein (Kulik et al., 2014). Although these data did not ascertain the involvement of ONOO^- , they underline a role for NO as a chain breaker limiting the effects incurred by ROS. An important breakthrough in understanding of

how NO could negatively regulate ROS production was accomplished by Yun et al. (2011). These authors found that in *A. thaliana*, AtRBOHD is S-nitrosylated at Cys-890 during the HR triggered by *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. S-nitrosylation of this strategic Cys-residue is thought to disrupt the side chain position of Phe-921 involved in the binding of flavin adenine dinucleotide (FAD). Therefore, the S-nitrosylation of Cys-890 diminishes FAD binding and, consequently, inhibits AtRBOHD activity. This NO-dependent regulation of AtRBOHD represents a central mechanism helping plants to control excessive ROS production and inherent effects including excessive cell death.

NO and ROS as cell death mediators

The data discussed above imply an important and interconnected function for NO and ROS in the regulation of cell death during HR. The situation is far from being simple as NO could mitigate ROS effects but also acts synergistically. This possibility has first been raised by Delledonne et al. (1998) who reported that NO potentiates the induction of HR-like cell death triggered by exogenous and endogenous ROS in soybean cells. Importantly, in contrast to the situation encountered in inflammatory cells in animals, ONOO⁻ does not act as a key essential intermediate in the cell death pathway. Rather, the activation of cell death during HR results from a combined interactions between NO and H₂O₂. More precisely, NO involvement in HR definitively requires H₂O₂ but by itself is not effective in triggering cell death. This mechanism was well exemplified by Zago et al. (2006). These authors observed that in contrast to wild-type tobacco plants, the NO donor sodium nitroprusside (SNP) was able to provoke cell death lesions in leaves of the catalase-deficient tobacco plants (CAT1AS) exposed to moderate high light stress and producing an increased level of H₂O₂. More recently, a rice mutant (*noe1* for *nitric oxide excess1*) accumulating both NO and H₂O₂ and displaying a higher rate of cell death in leaves exposed to high light was characterized (Lin et al., 2012). Completing Zago et al. (2006) investigation, the corresponding gene was identified as a catalase isoform. Here too, analysis of the cell death mechanisms occurring in the *noe1* background revealed that NO, which production was catalyzed by NR under the control of H₂O₂, acts as a signal in the process of H₂O₂-induced cell death. A similar conclusion was raised by Kulik et al. (2014) who observed that in contrast to wild type tobacco cells, the NO scavenger cPTIO was inefficient in suppressing cell death in cells impaired in the expression of *NtRBOHD*. Taken together, all these studies point out for a role of H₂O₂ in channeling NO through cell death pathway.

Although efforts have been made to identify components of the NO/ROS cell death pathway, our understanding of the underlying mechanisms is still in its infancy. Transcriptomic studies in SNP-treated CAT1AS plants under high light led to the identification of 16 genes specifically induced by the combined action of NO and H₂O₂ (Zago et al., 2006). These genes encoded proteins related to signaling, defense responses, ethylene and inositol metabolisms but did not include candidates known to participate in cell death. In our lab, we recently identified genes controlled by the concerted action of NO and H₂O₂ endogenously produced in tobacco cells elicited by cryptogein (I et al., 2014). Part of these genes encodes putative ubiquitin ligases such as the tobacco orthologues of the *A. thaliana* PUB26 (plant U-BOX 26), RHC2A (RING-H2 finger C2A) and DUF1 genes. Ubiquitin-mediated proteolysis is a key regulatory mechanism and beside our work, involvement of components of the ubiquitin pathways in the regulation of plant defense (Trujillo and Shirasu, 2010) as well as in H₂O₂-induced cell death (Vannini et al., 2012) has been already documented. Another insight into the NO/ROS cell death pathway has come from a proteomic study aiming at identifying S-nitrosylated proteins involved in H₂O₂-trig-

gered cell death the rice mutant *noe1* (Lin et al., 2012). The corresponding proteins included redox-related proteins such as cytosolic ascorbate peroxidase, glutathione reductase, thioredoxin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The identification of GAPDH is particularly relevant. Several research groups identified this enzyme as being S-nitrosylated in response to abiotic stresses and during HR (Romero-Puertas et al., 2008; Tanou et al., 2009; Wawer et al., 2010; Zaffagnini et al., 2013). Relevant investigation in mammal cells exposed to cell stressors such as endotoxins established a cell death cascade whereby S-nitrosylated GAPDH interacts with the E3 ubiquitin ligase Siah1, resulting in the translocation of the complex in the nucleus (Hara et al., 2005; Tristan et al., 2011). Once in the nucleus, Siah1 promotes the ubiquitination and degradation of nuclear proteins, thus facilitating cell death. Furthermore, through trans-S-nitrosylation, that is the transfer of an NO group from one protein to another, GAPDH triggers the S-nitrosylation of nuclear proteins such as the deacetylating enzyme sirtuin-1 and histone deacetylase-2 (Kornberg et al., 2010). Occurrence of such a GAPDH-dependent cell death pathway in plants has not been reported yet.

Beside S-nitrosylation, GAPDH could be also regulated at the post-translational level through H₂O₂-mediated oxidation (Hancock et al., 2005), strengthening the assumption that this enzyme could mediate NO/ROS pathways. In this regard, another enzyme that deserves attention is CDC48 (Cell Division Cycle protein48, also called in animals p97 or VCP for Vasolin-Containing Protein), a member of the AAA+ ATPases (ATPases associated with various cellular activities) family. CDC48 contains two ATPase domains (D1 and D2) consisting each of two Walker motifs (A and B) involved in the binding and hydrolysis of ATP, respectively. As such, this chaperone-like enzyme uses energy from ATP hydrolysis to structurally remodel ubiquitinated proteins and assists the proteasome in unfolding substrates to facilitate their degradation (Baek et al., 2013; Elsasser and Finley, 2005). CDC48 has been the subject of numerous investigations in animal research and is now known as a central component of ubiquitin-dependent protein degradation and, more generally, as a key regulator for a myriad of cellular processes including cell cycle and transcription regulation, ERAD (Endoplasmic Reticulum (ER)-Associated Degradation Pathway), immunity responses, intracellular trafficking, apoptosis or autophagy (Meyer et al., 2012). Although less studied, the available evidences indicate that similarly to its animal counterparts, the plant CDC48 plays a significant function in numerous processes such as ERAD, cell expansion and differentiation, cytokinesis and homotypic fusion of ER and Golgi membranes (Gallois et al., 2013; Marshall et al., 2008; Müller et al., 2005; O'Quin et al., 2010; Park et al., 2008). A recent investigation also implies a role for CDC48 in the antiviral response of *A. thaliana* against the TMV-related Oilseed Rape Mosaic Virus (ORMV, Niehl et al., 2012). Upon infection, CDC48 was indeed found to interact with the virus-encoded movement protein and to extract it from ER inclusions to the cytosol, thus promoting its degradation and the impairment of virus movement. The involvement of CDC48 as a host factor in antiviral immunity has also been reported in mammals (Hauler et al., 2012), thus highlighting a conserved function. In relation with NO signaling, CDC48 was found to undergo S-nitrosylation in tobacco cells elicited by cryptogein as well as *in vitro* (Astier et al., 2012). Evidence substantiated that S-nitrosylation occurs at Cys-526 located in the Walker A motif of the D2 domain involved in ATP binding and triggers a local conformational change. This process accounts for the inhibition of the ATPase activity of the enzyme. Interestingly, the same conserved Cys residue was identified as the target site for the H₂O₂-induced oxidative inhibition of CDC48 in *Drosophila* (Noguchi et al., 2005). Therefore, similarly to GAPDH, CDC48 could be regulated at the post-translational level by both NO and H₂O₂. The biological impact of CDC48

S-nitrosylation/inhibition in cryptogeiin signaling and induced-defense responses is currently unknown. Given the function of this protein in ubiquitin-dependent protein quality control and in the light of the importance of ubiquitination in plant immunity (Trujillo and Shirasu, 2010), analyzing this incidence could reveal a key function of NO and/or ROS in the (dis)regulation of the ubiquitination system. Notably, inactivation of CDC48 could result in the accumulation of polyubiquitinated proteins and, ultimately, to cell death as reported in animals and yeast (Braun and Zischka, 2008).

As stated below, the highly reactive oxidant ONOO⁻ does not appear as a mediator of cell death during HR but, instead, is considered as a radical switch that could divert the ROS-dependent cytotoxic effects toward cytoprotection. Here too, this possibility is subject to controversy (Alamillo and García-Olmedo, 2001). An important paper focused on *A. thaliana* Peroxiredoxins II (PrxII) supports the first scenario (Romero-Puertas et al., 2007). PrxII displays a ONOO⁻ reductase activity. Upon infection by the avirulent bacterial pathogen *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*), this enzyme becomes S-nitrosylated on Cys-121 involved in the active site. Consequently, PrxII loses its ONOO⁻ detoxification activity, thus leading to an increase in nitrated proteins level. Importantly, the development of HR cell death triggered by *Pst* was not altered in plants overexpressing or impaired in PrxII expression. Similarly, leaves of the T-DNA line disrupted in the *prxII E* gene infiltrated with a high concentration of ONOO⁻ showed a high level of protein nitration but no cell death symptoms. Collectively, these data minimize an involvement for ONOO⁻ as an essential component of NO/ROS-mediated cell death. They also raise the still unresolved question about its role in plant defense. Identification and functioning analysis of nitrated proteins promises to divulge information to our understanding of its function.

The flood of data described here provides lots of information about how NO and ROS are interconnected in immune signaling. As they seem partly controversial, fitting them in a simple and com-

prehensive model is a difficult task and there has been (and there's still!) a lengthy debate regarding their mutual influence and function. Conceivably, as proposed in Fig. 2, a well-orchestrated hierarchy of NO- and ROS-dependent molecular events occurs in cells facing pathogen attack (Fig. 2). Such hierarchy is definitively required for a proper cellular response.

Conclusions and perspectives

Immune signaling is mediated by a complex, integrated molecular network. In this process, NO plays a central role in controlling, transducing and probably coordinating Ca²⁺ and ROS signalings. Clearly, the knowledge produced recently by S-nitrosylation and transcriptomic studies has led to a new level of understanding of the mechanisms underlying NO functions in plant defense. The repertoire of S-nitrosylated proteins has greatly expanded and the identification/functional analysis of key NO targets such as AtRBOHD, PrxII or CaM provides a better view of how NO, ROS and Ca²⁺ are/ could be interconnected. Furthermore, the recent identification of the chaperone-like CDC48 as a NO target, together with the finding that NO and ROS commonly regulate genes encoding ubiquitin ligases, open the possibility that these species might regulate the ubiquitination system. Another issue of these studies is that while several mechanisms inherent to the interplays between NO and Ca²⁺ or ROS appear to be conserved between plant and animals, others such as the S-nitrosylation of CaM or the non-involvement of ONOO⁻ in HR cell death seem specific to the plant kingdom.

Some results reviewed here cannot be easily reconciled and an effort to connect seemingly disparate NO-dependent signaling elements into a more cohesive picture is required. How to achieve this ambitious goal? First, we should keep in mind that although the formation of NO *in vivo* should be considered as an established phenomenon, due to the difficulty of unambiguously detecting it, on occasion doubts arise regarding the biological relevance of NO-dependent processes. Therefore, there is still an authentic need for new and better methods for the detection and analysis of subcellular localization of NO and derived species such as ONOO⁻. Second, only few studies focused on the identification of proteins and genes modulated by endogenously produced NO (in combination or not with ROS). In many cases, the molecular components of NO-induced effects have been identified using exogenously applied NO. Although informative, approaches based on NO donors or applied ROS do not take into account the spatial and temporal aspects of NO signaling which, nevertheless, are key parameters of specificity. Notably, studies in animals suggest that within a complex transduction pathway NO does not antagonistically modify several components at the same time but there is a hierarchy in the flow of events (Stamler et al., 2001). Therefore, *in vivo* identification of new components of NO signaling should yield a more accurate view of how NO mediates and regulates defense responses. Third, the identification of new NO targets brings with it new challenges. We will need to define the physiological relevance of the post-translational modifications triggered by NO and to understand the function of genes of interest by mutagenesis, functional genomics and other approaches such as the search of interacting partners. Fourth, S-nitrosylation is likely networked with other modifications affecting the same Cys residue, namely oxidation and glutathionylation. This aspect is probably a fundamental criterium to take into account in our understanding of NO and ROS crosstalks. Finally, the chemistry of NO is still an unexplored field. Criteria such as the chemical nature of NO-derived species and their reactivity toward reactive oxygen intermediates, their kinetic of formation and decay, their subcellular localization and concentration as well as their diffusion within cells and across membranes are, for the most, unknown. Conceivably, the overall alteration of the cellular redox status conferred by these

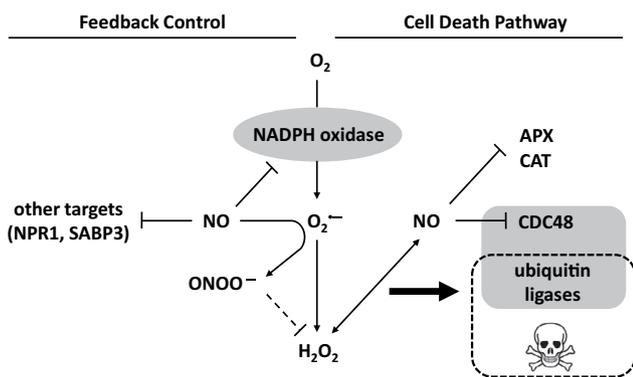


Fig. 2. The NO-ROS connection in immune signaling. The interplays between NO and ROS produced in plant cells challenged by pathogens or derived signals are complex and still poorly understood. At least two issues of these cross-talks are proposed. These issues are intimately linked. In the first one (right part), NO and ROS positively influence their respective production. Furthermore, NO amplifies the oxidative status of cells by inhibiting through S-nitrosylation catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), two main H₂O₂ degrading enzymes. NO and H₂O₂ act as key essential intermediates in the pathways leading to the expression of ubiquitin ligases and, ultimately, to cell death (dotted line). The ability of NO (and ROS) to interfere with the ubiquitination system (grey box) is further supported by the finding that the chaperone-like enzyme CDC48 is inhibited through S-nitrosylation. In the second issue, NO regulates ROS-induced effects by negatively controlling O₂⁻ and H₂O₂ levels via the production of ONOO⁻ and through the inhibition of NADPH oxidase by S-nitrosylation. More generally, thanks to its ability to inhibit key defense mediators such as NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related gene 1) or SABP3 (Salicylic Acid-Binding Protein 3), NO might be a component of the feedback mechanisms controlling the amplitude of defense responses (for further details see Tada et al., 2008; Wang et al., 2009a,b).

species is a central parameter for NO function and is awaiting further characterization.

Acknowledgments

D. Wendehenne's lab was supported by the Agence Nationale de la Recherche (program BLAN07-2_184783 PIANO), La Région de Bourgogne (PARI AGRALE 8 project, FABER project), L'Association pour la Recherche sur les Nicotianées (ARN), the University of Burgundy (Bonus Qualité Recherche project) and CAPES/COFE-CUB (Sv 785-13 Grant). P. Trapet was supported by a fellowship from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and A. Kulik by a fellowship from La Région Bourgogne.

References

- Aboul-Soud, M.A., Aboul-Enein, A.M., Loake, G.J., 2009. Nitric oxide triggers specific and dose-dependent cytosolic calcium transients in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 4, 191–196.
- Alamillo, J.M., García-Olmedo, F., 2001. Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 25, 529–540.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., von Bodman, S., Berkowitz, G.A., 2007. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19, 1081–1095.
- Asai, S., Yoshioka, H., 2009. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 619–629.
- Astier, J., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Bertoldo, J., Bourque, S., Terenzi, H., Wendehenne, D., 2012. Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogei signalling in tobacco cells. *Biochem. J.* 447, 249–260.
- Baek, G.H., Cheng, H., Choe, V., Bao, X., Shao, J., Luo, S., Rao, H., 2013. Cdc48: a Swiss army knife of cell biology. *J. Amino Acids* 2013, 183421.
- Batistič, O., Kudla, J., 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1283–1293.
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., Yoshioka, H., 2013. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 271–277.
- Besson-Bard, A., Astier, J., Rasul, S., Wawer, I., Dubreuil-Maurizi, C., Jeandroz, S., Wendehenne, D., 2009. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci.* 177, 302–309.
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A., Wendehenne, D., 2008a. Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol. Plant* 1, 218–228.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2008b. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 21–39.
- Braun, R.J., Zischka, H., 2008. Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1418–1435.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L., Delledonne, M., 2009. Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 30, 2460–2468.
- Corpas, F.J., Leterrier, M., Begara-Morales, J.C., Valderrama, R., Chaki, M., López-Jaramillo, J., Luque, F., Palma, J.M., Padilla, M.N., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Barroso, J.B., 2013. Inhibition of peroxisomal hydroxyypyruvate reductase (HPR1) by tyrosine nitration. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4981–4989.
- Corpas, F.J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci.* 181, 604–611.
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., Wendehenne, D., 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J. Exp. Bot.* 59, 155–163.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C., 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585–588.
- de Pinto, M.C., Locato, V., Sgobba, A., Romero-Puertas Mdel, C., Gadaleta, C., Delledonne, M., De Gara, L., 2013. S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 163, 1766–1775.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F., 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328–10333.
- Elsasser, S., Finley, D., 2005. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat. Cell Biol.* 7, 742–749.
- Ferrer-Sueta, G., Radi, R., 2009. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 4, 161–177.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J., 2000. *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* 23, 817–824.
- Frederickson Matika, D.E., Loake, G., 2013. Redox regulation in plant immune function. *Antioxid. Redox Signal.* (in press).
- Gallois, J.L., Drouaud, J., Lécureuil, A., Guyon-Debast, A., Bonhomme, S., Guerche, P., 2013. Functional characterization of the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein AtPUB7 in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 526, 299–308.
- García-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R., 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signalling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11116–11121.
- Gaupels, F., Kuruthukulangarakoola, G.T., Durner, J., 2011a. Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 707–714.
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D., Delledonne, M., 2011b. Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response. *Nitric Oxide* 25, 222–228.
- Hancock, J.T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan, R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J., Neill, S.J., 2005. Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 828–835.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., Sawa, A., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* 7, 665–674.
- Hauler, F., Mallery, D.L., McEwan, W.A., Bidgood, S.R., James, L.C., 2012. AAA ATPase p97/VCP is essential for TRIM21-mediated virus neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 19733–19738.
- Jacques, S., Ghesquière, B., Van Breusegem, F., Gevaert, K., 2013. Plant proteins under oxidative attack. *Proteomics* 13, 932–940.
- Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Besson-Bard, A., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Ma, W., Berkowitz, G.A., Wendehenne, D., 2013. There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Physiol.* 163, 459–470.
- Kornberg, M.D., Sen, N., Hara, M.R., Juluri, K.R., Nguyen, J.V., Snowman, A.M., Law, L., Hester, L.D., Snyder, S.H., 2010. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat. Cell Biol.* 12, 1094–1100.
- Kovacs, I., Lindermayr, C., 2013. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Front. Plant Sci.* 4, 137.
- Kulik, A., Anielska-Mazur, A., Bucholc, M., Koen, E., Szymańska, K., Żmieńko, A., Krzywińska, E., Wawer, I., McLoughlin, F., Ruszkowski, D., Figlerowicz, M., Testerink, C., Skłodowska, A., Wendehenne, D., Dobrowolska, G., 2012. SNF1-related protein kinases type 2 are involved in plant responses to cadmium stress. *Plant Physiol.* 160, 868–883.
- Kulik, A., Noirrot, E., Grandperret, V., Bourque, S., Fromentin, J., Salloignon, P., Truntzer, C., Dobrowolska, G., Simon-Plas F., Wendehenne, D., 2014. Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogei signaling. *Plant Cell Environ.*, in press. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12295>
- Kwaaitaal, M., Huisman, R., Maintz, J., Reinstädler, A., Panstruga, R., 2011. Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 440, 355–365.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2006. Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1369–1376.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legend, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D., 2004. Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogei. *Plant Physiol.* 135, 516–529.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., Pugin, A., 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171, 249–269.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., Delledonne, M., 2009. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 451–458.
- Lewit-Bentley, A., Réty, S., 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637–643.
- Li, F., Wang, J., Ma, C., Zhao, Y., Wang, Y., Hasi, A., Qi, Z., 2013. Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162, 1497–1509.
- Lin, A., Wang, Y., Tang, J., Xue, P., Li, C., Liu, L., Hu, B., Yang, F., Loake, G.J., Chu, C., 2012. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol.* 158, 451–464.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J., 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 921–930.
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., Durner, J., 2010. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 22, 2894–2907.
- Ma, W., Berkowitz, G.A., 2011. Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol.* 190, 566–572.
- Ma, W., Smigel, A., Tsai, Y.C., Braam, J., Berkowitz, G.A., 2008. Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.* 148, 818–828.
- Ma, Y., Walker, R.K., Zhao, Y., Berkowitz, G.A., 2012. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 19852–19857.
- Ma, Y., Zhao, Y., Walker, R.K., Berkowitz, G.A., 2013. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein

- kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca^{2+} signal. *Plant Physiol.* 163, 1459–1471.
- Mandal, M.K., Chandra-Shekara, A.C., Jeong, R.D., Yu, K., Zhu, S., Chanda, B., Navarre, D., Kachroo, A., Kachroo, P., 2012. Oleic acid-dependent modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 protein levels regulates nitric oxide-mediated defense signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1654–1674.
- Manzoor, H., Kelloniemi, J., Chiltz, A., Wendehenne, D., Pugin, A., Poinssot, B., Garcia-Brugger, A., 2013. Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant J.* 76, 466–480.
- Marshall, R.S., Jolliffe, N.A., Ceriotti, A., Snowden, C.J., Lord, J.M., Frigerio, L., Roberts, L.M., 2008. The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *J. Biol. Chem.* 283, 15869–15877.
- Martínez-Ruiz, A., Araújo, I.M., Izquierdo-Álvarez, A., Hernansanz-Agustín, P., Lamas, S., Serrador, J.M., 2013. Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1220–1235.
- McCormack, E., Tsai, Y.C., Braam, J., 2005. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10, 383–389.
- Meyer, H., Bug, M., Bremer, S., 2012. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* 14, 117–123.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., Klessig, D.F., 2010. NO synthesis and signaling in plants—where do we stand? *Physiol. Plant.* 138, 372–383.
- Mousavi, S.A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., Farmer, E.E., 2013. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500, 422–426.
- Müller, J., Piffanelli, P., Devoto, A., Miklis, M., Elliott, C., Ortmann, B., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R., 2005. Conserved ERAD-like quality control of a plant polytopic membrane protein. *Plant Cell* 17, 149–163.
- Niehl, A., Amari, K., Gerejge, D., Brandner, K., Mély, Y., Heinlein, M., 2012. Control of Tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiol.* 160, 2093–2108.
- Noguchi, M., Takata, T., Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S., Kakizuka, A., 2005. ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J. Biol. Chem.* 280, 41332–41341.
- O'Quin, J.B., Bourassa, L., Zhang, D., Shockey, J.M., Gidda, S.K., Fosnot, S., Chapman, K.D., Mullen, R.T., Dyer, J.M., 2010. Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 21781–21796.
- Ortega-Galisteo, A.P., Rodríguez-Serrano, M., Pazmiño, D.M., Gupta, D.K., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C., 2012. S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 63, 2089–2103.
- Park, S., Rancour, D.M., Bednarek, S.Y., 2008. In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* 148, 246–258.
- Patel, S., Robb-Gaspers, L.D., Stellato, K.A., Shon, M., Thomas, A.P., 1999. Coordination of calcium signalling by endothelial-derived nitric oxide in the intact liver. *Nat. Cell Biol.* 1, 467–471.
- Perchepeid, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., Roby, D., 2010. Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 846–860.
- Perochon, A., Aldon, D., Galaud, J.P., Ranty, B., 2011. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie* 93, 2048–2053.
- Peunova, N., Enikolopov, G., 1993. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364, 450–453.
- Puppo, A., Pauly, N., Boscarì, A., Mandon, K., Brouquisse, R., 2013. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2202–2219.
- Radi, R., 2013. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem.* 288, 26464–26472.
- Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., Wendehenne, D., Jeandroz, S., 2012. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 35, 1483–1499.
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzoli, M., Zolla, L., Roepstorff, P., Delledonne, M., 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 8, 1459–1469.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M., Perazzoli, M., Vandelle, E., Dietz, K.J., Delledonne, M., 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19, 4120–4130.
- Saito, S., Yamamoto-Katou, A., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K., 2006. Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 689–697.
- Simontacchi, M., García-Mata, C., Bartoli, C.G., Santa-María, G.E., Lamattina, L., 2013. Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep.* 32, 853–866.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., Garcia-Mata, C., Lamattina, L., Blatt, M.R., 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca^{2+} release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J.* 43, 520–529.
- Srivastava, N., Gonugunta, V.K., Puli, M.R., Raghavendra, A.S., 2009. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* 229, 757–765.
- Stamler, J.S., Lamas, S., Fang, F.C., 2001. Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* 106, 675–683.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, 1898–1902.
- Tada, Y., Mori, T., Shinogi, T., Yao, N., Takahashi, S., Betsuyaku, S., Sakamoto, M., Park, P., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S., 2004. Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 245–253.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X., 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321, 952–956.
- Takabatake, R., Karita, E., Seo, S., Mitsuhashi, I., Kuchitsu, K., Ohashi, Y., 2007. Gene-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48, 414–423.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A., Job, D., 2009. Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J.* 60, 795–804.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W., Sawa, A., 2011. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.* 23, 317–323.
- Trujillo, M., Shirasu, K., 2010. Ubiquitination in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 402–408.
- Vandelle, E., Delledonne, M., 2011. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181, 534–539.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M., Pugin, A., 2006. Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 429–440.
- Vannini, C., Marsoni, M., Cantara, C., De Pinto, M.C., Locato, V., De Gara, L., Bracale, M., 2012. The soluble proteome of tobacco Bright Yellow-2 cells undergoing H_2O_2 -induced programmed cell death. *J. Exp. Bot.* 63, 3137–3155.
- Vatsa, P., Chiltz, A., Bourque, S., Wendehenne, D., Garcia-Brugger, A., Pugin, A., 2011. Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie* 93, 2095–2101.
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J.D., Katagiri, F., Glazebrook, J., 2009a. *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog.* 5, e1000301.
- Wang, Y., Loake, G.J., Chu, C., 2013. Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Front. Plant Sci.* 4, 314.
- Wang, Y.Q., Feechan, A., Yun, B.W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F.Q., Xie, Z.S., Pallas, J.A., Chu, C.C., Loake, G.J., 2009b. S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J. Biol. Chem.* 284, 2131–2137.
- Wawer, I., Bucholc, M., Astier, J., Anielska-Mazur, A., Dahan, J., Kulik, A., Wysłouch-Cieszyńska, A., Zareba-Kozioł, M., Krzywinska, E., Dadlez, M., Dobrowolska, G., Wendehenne, D., 2010. Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem. J.* 429, 73–83.
- Willmott, N., Sethi, J.K., Walseth, T.F., Lee, H.C., White, A.M., Galione, A., 1996. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 3699–3705.
- Yamakawa, H., Mitsuhashi, I., Ito, N., Seo, S., Kamada, H., Ohashi, Y., 2001. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur. J. Biochem.* 268, 3916–3929.
- Yun, B.W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N.B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J.W., Kang, J.G., Kwon, E., Spoel, S.H., Pallas, J.A., Loake, G.J., 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478, 264–268.
- Zaffagnini, M., Morisse, S., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Festa, M., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Trost, P., 2013. Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 288, 22777–22789.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inzé, D., Delledonne, M., Van Breusegem, F., 2006. Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* 141, 404–411.

4. Article scientifique n°4 :

**There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide
Cross Talk with Ca²⁺ Signaling**

There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca²⁺ Signaling¹

Sylvain Jeandroz, Olivier Lamotte, Jérémy Astier, Sumaira Rasul, Pauline Trapet, Angélique Besson-Bard, Stéphane Bourque, Valérie Nicolas-Francès, Wei Ma, Gerald A. Berkowitz², and David Wendehenne^{2*}

AgroSup Dijon, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France (S.J.); CNRS, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France (O.L.); Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France (J.A., S.R., P.T., A.B.-B., S.B., V.N.-F., D.W.) Equipe de Recherche Labélisée CNRS 6300, BP 86510, F-21000 Dijon, France (S.J., O.L., J.A., S.R., P.T., A.B.-B., S.B., V.N.-F., D.W.); Department of Plant Biology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824 (W.M.); and Department of Plant Science and Landscape Architecture, University of Connecticut, Storrs, Connecticut 06269 (G.A.B.)

Calcium and nitric oxide (NO) are two important biological messengers. Increasing evidence indicates that Ca²⁺ and NO work together in mediating responses to pathogenic microorganisms and microbe-associated molecular patterns. Ca²⁺ fluxes were recognized to account for NO production, whereas evidence gathered from a number of studies highlights that NO is one of the key messengers mediating Ca²⁺ signaling. Here, we present a concise description of the current understanding of the molecular mechanisms underlying the cross talk between Ca²⁺ and NO in plant cells exposed to biotic stress. Particular attention will be given to the involvement of cyclic nucleotide-gated ion channels and Ca²⁺ sensors. Notably, we provide new evidence that calmodulin might be regulated at the posttranslational level by NO through S-nitrosylation. Furthermore, we report original transcriptomic data showing that NO produced in response to oligogalacturonide regulates the expression of genes related to Ca²⁺ signaling. Deeper insight into the molecules involved in the interplay between Ca²⁺ and NO not only permits a better characterization of the Ca²⁺ signaling system but also allows us to further understand how plants respond to pathogen attack.

This review covers the interplay between two important cellular messengers: nitric oxide (NO) and (intracellular) Ca²⁺ ions. Both have been shown to be critically important steps in numerous signaling cascades, for example, those leading to programmed cell death (PCD) as a component of plant immune responses to pathogens. Intriguingly, both have been hailed as paramount “drivers” of such signaling cascades (Dangl, 1998; Lecourieux et al., 2006), and both are involved in the generation of the other. Thus, we think it appropriate for readers of this article to consider the mythological two-headed animal “Pushmillyu” made famous in the early 20th century children’s book *The Story of Doctor Doolittle*. Where else but a book seeking to stimulate a child’s imagination, and also in the cytosol of cells, can we find a two-headed creature that pushes and pulls in the same, and opposite, directions!

NO is a reactive free gaseous radical. Its importance as a signaling molecule in plants is now well established. Hence, it is currently accepted to be involved in a variety of physiological processes, such as root growth, flowering, stomatal closure, iron and hormonal homeostasis, and adaptive responses to biotic (as above) and abiotic stresses (Besson-Bard et al., 2008c; Simontacchi et al., 2013). While the identities of the enzymatic sources for NO in plants are still under investigation, important progress in understanding their mode of action at the molecular level has been made during the last decade. Several effectors that mediate NO signaling have been identified, including the second messenger cyclic GMP (cGMP), protein kinases, proteins regulated through NO-dependent posttranslational modifications, and target genes (Gaupels et al., 2011; Astier et al., 2012b; Yu et al., 2012).

The possibility that NO works together with the universal second messenger Ca²⁺ in plant signaling processes has also emerged (Ma and Berkowitz, 2007; Courtois et al., 2008). The occurrence of such cross talk is well documented in the literature focused on animal biology. First, the production of NO by constitutive nitric oxide synthase (NOS) is strictly Ca²⁺/calmodulin (CaM) dependent; all (Arg-dependent) animal NOS-synthesizing (NOS) enzymes require CaM binding for activity (Stuehr, 1999). Second, NO is not only a step in the signaling cascades initiated by Ca²⁺ but also one of the key messengers governing the overall control of Ca²⁺ homeostasis (Clementi and Meldolesi, 1997). Accordingly, evidence gathered from many studies of

¹ This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. BLAN07-2_184783 PIANO), La Région de Bourgogne (PARI AGRALE 8 project to O.L.), and the U.S. National Science Foundation (grant no. 1146827).

² These authors contributed equally to the article.

* Address correspondence to wendehen@dijon.inra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: David Wendehenne (wendehen@dijon.inra.fr).

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.220624

animal cells highlights the ability of NO to modulate (directly or indirectly) the gating/conductance of Ca²⁺ channels and to impact the activity of Ca²⁺ pumps as well as Ca²⁺ sensors such as Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases (Stamler et al., 2001; Takata et al., 2011). The interplay between NO and Ca²⁺ is at the heart of key physiological processes such as neurotransmission and relaxation. Consequently, dysfunction of NO/Ca²⁺ cross talk also contributes to disease progression, including hypertension and neurodegeneration (Clementi, 1998).

In this review, we will cover recent progress in the understanding of the tight interconnections between Ca²⁺ and NO signaling in plant cells facing pathogen attack. Furthermore, we will provide original data highlighting a putative role for NO in modulating CaM (at the posttranslational level) as well as the expression of genes encoding the main components of Ca²⁺ signaling.

THE ROLE OF CA²⁺ IN NO PRODUCTION DURING PLANT IMMUNE RESPONSES

Over a decade ago, Grant et al. (2000) demonstrated that the inoculation of plant leaves with a pathogen leads to a cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt}) increase and that this Ca²⁺ elevation is an important step in plant immune signaling. Exposure of plants to a Ca²⁺ channel blocker along with either pathogenic microorganisms or evolutionarily conserved essential components of these microbes (microbe-associated molecular patterns [MAMPs]) has shown that this transient pathogen-induced [Ca²⁺]_{cyt} elevation is required for a number of defense responses that impair infection (Grant et al., 2000; Yoshioka et al., 2006; Ali et al., 2007; Qi et al., 2010).

There are no canonical Ca²⁺-selective voltage-gated ion channels in higher plants (Verret et al., 2010). Candidates for genes encoding Ca²⁺-conducting ion channels at the plant cell membrane include cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGCs; Ma and Berkowitz, 2011), glutamate receptors (GLRs; Vincill et al., 2012), and, recent evidence (Laohavisit et al., 2012) also suggests, annexins. A reasonable amount of genetic evidence (for review, see Ma and Berkowitz, 2011; Cheval et al., 2013) points to CNGCs (some exceptions are noted below) as the channels involved in generating a Ca²⁺ current leading to transient [Ca²⁺]_{cyt} elevation that occurs immediately upon perception by plant cells of a pathogenic invader. CNGCs have been demonstrated to form Ca²⁺-conducting ion channels by the use of patch-clamp electrophysiological analysis of currents induced upon the expression of CNGC-coding sequences in heterologous systems as well as patch clamp of native plant cell membranes (Leng et al., 1999; Lemtiri-Chlieh and Berkowitz, 2004; Ali et al., 2006, 2007; Frietsch et al., 2007; Urquhart et al., 2007). This work includes studies demonstrating the absence of the current in native membranes of

protoplasts prepared from CNGC null mutants (Ali et al., 2007), providing strong evidence linking the translation product of CNGC genes with Ca²⁺ channel activity in plants. Varying degrees of evidence (for review, see Moeder et al., 2011) support the involvement of at least six isoforms of the 20-member Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) CNGC family as involved in pathogen defense signaling cascades. As CNGC activation by cyclic nucleotides is impaired by Ca²⁺/CaM, the elevation of [Ca²⁺]_{cyt} during this signaling cascade might allow for a feedback mechanism; CaM might block further CNGC-dependent Ca²⁺ influx (Hua et al., 2003).

A substantial body of evidence indicates that [Ca²⁺]_{cyt} elevation facilitated by CNGCs is upstream from, and required for, the generation of NO in pathogen defense signaling cascades. Plant immune defenses can involve a basal response to virulent pathogens (MAMP-triggered immunity), and when the plant has a gene product that recognizes avirulent pathogen effector proteins (effector-triggered immunity), a hypersensitive response (HR) occurs that can include PCD near the site of infection to limit spread of the pathogen within the plant (Jones and Dangl, 2006). Ca²⁺-dependent NO generation is an important component of both basal immune responses and HR (Ali et al., 2007; for review, see Lecourieux et al., 2006). Null mutations of (*Arabidopsis*) plant CNGC2 (the *dnd1* mutant) and CNGC4 (*dnd2*) have shown impaired HR to avirulent pathogens (Clough et al., 2000; Balagué et al., 2003; Jurkowski et al., 2004). Application of a NO donor to *dnd1* mutants restored their ability to undergo HR (Ali et al., 2007), supporting a strong link between CNGC-dependent [Ca²⁺]_{cyt} elevations and the downstream generation of NO as steps in the immune signaling cascade leading to HR.

Apart from the CNGC-dependent Ca²⁺ elevation that is an essential component of HR, a number of MAMPs have been shown to cause NO generation in plant cells. In these studies, the NO generation was typically shown to be downstream from the early MAMP-induced Ca²⁺ signal. Lipopolysaccharide, a MAMP present in the outer membrane of gram-negative bacteria, induced NO synthesis that requires the early Ca²⁺ signal and is impaired in *dnd1* plants (Ali et al., 2007; Sun and Li, 2012). Peptidoglycan, a MAMP associated with gram-positive bacteria, also induces plant immune signaling dependent on [Ca²⁺]_{cyt} elevation and NO generation (Gust et al., 2007). The fungal MAMPs xylanase and chitosan also cause NO generation in plants (Laxalt et al., 2007; Raho et al., 2011), as do the *Phytophthora infestans* oomycete elicitors (INF1; Asai et al., 2008) and cryptogein (Foissner et al., 2000; Lamotte et al., 2004; Besson-Bard et al., 2008b). One of the best-characterized MAMPs, in terms of plant immune responses, is the bacterial motility organ protein flagellin (flg). Of significance to this review, it should be noted that immune responses to flg require the early Ca²⁺ signal; however, CNGCs have been conclusively shown not to be involved with [Ca²⁺]_{cyt}

elevations induced by the plant cell perception of flg (Jeworutzki et al., 2010; Ma et al., 2012). Studies with inhibitors suggest that flg signaling may involve GLR-dependent Ca²⁺ signaling (Kwaaitaal et al., 2011). Published work has not yet evaluated if NO generation is important for flg signaling; however, unpublished results have demonstrated flg-dependent NO generation in Arabidopsis (Y. Zhao and G.A. Berkowitz, unpublished data).

In a fashion similar to MAMPs, endogenous plant breakdown products generated from pathogen attack, as well as specific plant signaling peptides, collectively referred to as Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs), are known to also trigger basal defense signaling in plants under assault from pathogens (Boller and Felix, 2009). A link between a CNGC2-dependent Ca²⁺ signal and downstream NO generation was demonstrated for the DAMP oligogalacturonides (OG) in Arabidopsis leaves (Rasul et al., 2012). Similarly, the Arabidopsis DAMP signaling peptides (PEP, a six-member family of peptides) have been shown to generate a CNGC2-dependent signal that contributes to both basal defense responses to pathogens as well as the PCD associated with HR (Qi et al., 2010; Ma et al., 2012). Application of Arabidopsis Pep DAMP peptides to plants also leads to the generation of NO (W. Yao and G.A. Berkowitz, unpublished data).

The involvement of CNGCs in generating the Ca²⁺ signal associated with pathogen defense leads to the question of how pathogen/MAMP/DAMP perception leads to the activation of CNGC currents. CNGCs are activated by cytosolic cyclic nucleotides (cAMP and cGMP). Elevation of plant cell cAMP in response to MAMPs and/or pathogens has been demonstrated in a number of studies (Cooke et al., 1994; Jiang et al., 2005; Ma et al., 2009). Pathogen-induced increases in cAMP have been associated with the Ca²⁺ signal (Ma et al., 2009). However, no gene encoding a bona fide cAMP-synthesizing enzyme has yet been identified in plants. In addition, cGMP-synthesizing activity has not been associated with any MAMP receptor or other protein involved in MAMP signaling cascades. However, the Pep receptor (PEPR) has been shown to have in vitro guanylyl cyclase activity (Qi et al., 2010), and application of Pep peptides to Arabidopsis plants does cause an increase in cytosolic cGMP in vivo (Ma et al., 2012). DAMP peptide signaling is linked to MAMP signaling in some unresolved manner (Ma et al., 2012); however, the specific nature of how pathogen perception is linked in general to the generation of a Ca²⁺ signal in plant cells is for the most part unresolved.

Another area of pathogen defense signaling that is fairly unresolved is how the elevation of [Ca²⁺]_{cyt} in response to pathogen detection gives rise to a NO signal. No gene encoding a NOS-type enzyme has been identified in higher plant genomes at this time, although Lamattina and colleagues (Foresi et al., 2010) have demonstrated the presence of a NOS-type enzyme encoded in the genome of the green alga

Ostreococcus tauri that displays a modest (30% inhibition of activity in the absence of CaM) Ca²⁺/CaM dependence. If the higher plant enzyme(s) responsible for NO generation during immune responses is mechanistically similar to the animal NOS enzymes, then it might also display a Ca²⁺/CaM dependence. A significant body of evidence indicates that some members of the Ca²⁺ sensor protein family of CaMs and/or some members of the large (approximately 50 members in Arabidopsis; Hashimoto and Kudla, 2011) CaM-like protein (CML) family participate in plant immune responses to pathogens. Overexpression of soybean (*Glycine max*) CaM isoforms (SCaM-4 or SCaM-5) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) results in enhanced resistance to pathogens (Heo et al., 1999). The silencing of the tobacco CaM NtCaM13 leads to the increased susceptibility to *Tobacco mosaic virus* (TMV), virulent bacteria, or fungi in tobacco (Takabatake et al., 2007). The silencing of the CML APR134 in tomato (*Solanum lycopersicum*) results in a decreased HR, and Arabidopsis overexpressing AtCML43 (the Arabidopsis ortholog of the CML APR134) results in a faster onset of HR (Bouché et al., 2005; Chiasson et al., 2005). Exposure of plant cells to the MAMP lipopolysaccharide results in Arg-dependent NO generation, which is impaired in the presence of a CaM antagonist and in the *cml24-4* Arabidopsis mutant (Zeidler et al., 2004; Ali et al., 2007; Ma et al., 2008). The CaM antagonist (which might also interfere with Ca²⁺-dependent kinase [CDPK] function) and the *cml24-4* mutant also prevented NO generation in leaves exposed to a virulent bacterial pathogen (Ma et al., 2008). NO generation induced during the development of HR or exposure to pathogen elicitors during plant immune responses displays an Arg dependence suggesting the involvement of a NOS-type enzyme (Delledonne et al., 1998; Zhang et al., 2003; Lamotte et al., 2004; Vandelle et al., 2006; Rasul et al., 2012). Numerous studies have reported that NOS activity in plant cells displays a Ca²⁺/CaM dependence (Delledonne et al., 1998; del Río et al., 2004; Ma et al., 2008; Corpas et al., 2009). This body of work, then, suggests that pathogen-associated [Ca²⁺]_{cyt} elevation could affect NO generation through the activation of CaM or CMLs. However, the specific enzymatic source of NO generation during pathogen signaling cascades is not clearly resolved. Thus, definitive delineation of a molecular mechanism linking Ca²⁺/CaM (CML) to the enzyme(s) responsible for NO generation during immune responses awaits further study.

Another possible link (i.e. an alternative to the involvement of CaM) between the Ca²⁺ signal and downstream NO generation in response to pathogen perception might be mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades. MAPK signaling is involved in MAMP and DAMP pathogen defense (Boller and Felix, 2009; Yamaguchi and Huffaker, 2011). At least some components of MAPK signaling evoked in response to pathogens involve CDPK activity upstream from MAPKs (Boudsocq et al., 2010). Asai et al.

(2008) have demonstrated the specific involvement of MAPK signaling in the generation of NO during the basal defense cascade initiated by the oomycete elicitor INF1. Thus, CDPKs could perhaps link the pathogen-induced Ca^{2+} signal to NO generation.

In summary, we can conclude that the cytosolic Ca^{2+} critical to plant immune responses is required for the generation of NO. Both messengers are critical to activation of the full array of defense responses generated during plant immune signaling. The specific molecular steps involved in the signal transduction cascade linking Ca^{2+} to downstream NO generation have not been definitively ascertained at this time. It is intriguing for us to speculate about two further points regarding Ca^{2+} and NO signaling. First, some evidence supports the notion that NO, being freely diffusible across membranes, might act as an extracellular signal during plant immune signaling cascades (Zhang et al., 2003). Thus, the two secondary messengers could contribute to plant immune responses in an interactive manner simply by Ca^{2+} elevations in the cell cytosol acting as a secondary messenger to evoke altered cell function to defeat the pathogen detected locally, and NO, generated by the localized response to pathogen perception, could act to spread the signal to neighboring cells, whereby its ability to act upstream from Ca^{2+} would provide a mechanism for the initiation of immune signaling cascades in cells not directly under assault by a pathogen. Another germane point about the cross-talk between Ca^{2+} and NO signaling is recent work demonstrating that cGMP can be nitrated by NO and that this cGMP derivative acts differently than cGMP in Ca^{2+} -dependent signaling in guard cells (Joudoi et al., 2013). The work of Joudoi et al. (2013) also demonstrated the involvement of a NO-dependent guanylyl cyclase in this signaling cascade. This recent study provides some new insights into how cGMP (acting through CNGCs) and NO could be involved in cross talk during signaling cascades.

NO, A Ca^{2+} -MOBILIZING MESSENGER

In animals, NO is recognized to regulate the activities of Ca^{2+} channels. Isoforms of most, if not all, of the Ca^{2+} channel families have been shown to be modulated by NO (Stamler et al., 2001; Lipton et al., 2002; Yoshida et al., 2006). Depending on the physiological context, NO action on these channels was shown to promote or to suppress increased $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. The inherent mechanisms are complex, and both indirect and direct processes have been reported. In the first case, NO exerts a fine-tuning of the channels via the generation of cGMP, cyclic ADP ribose (cADPR), and/or through protein kinases. In the second case, NO regulates channel activities through direct posttranslational modification. In particular, an increasing number of studies have identified important roles played by S-nitrosylation, a process corresponding to the covalent attachment of NO to a reactive Cys

residue, forming S-nitrosothiol (Hess et al., 2005). The involvement of NO in Ca^{2+} homeostasis also includes the modulation of Ca^{2+} pumps, including sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and plasma membrane Ca^{2+} pumps (autoinhibited Ca^{2+} -ATPases [ACAs]), thus promoting cytosolic Ca^{2+} -removal mechanisms (Yao and Huang, 2003).

In plants, accumulating evidence indicates that NO acts as a Ca^{2+} -mobilizing messenger. The first reports demonstrated that treatment with NO donors induced a fast and transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in tobacco and Arabidopsis cells expressing the Ca^{2+} reporter aequorin (Lamotte et al., 2004, 2006; Besson-Bard et al., 2008a, 2008c; Aboul-Soud et al., 2009). Similar observations were performed on Arabidopsis and *Vicia faba* guard cells loaded with the Ca^{2+} fluorescent indicator fura2 (Garcia-Mata et al., 2003). In contrast, the available data indicate that NO does not contribute to the changes in Ca^{2+} concentrations occurring in other organelles, including nucleus and chloroplasts (Lecourieux et al., 2005; Manzoor et al., 2012). Pharmacological experiments using Ca^{2+} channel inhibitors indicated that the Ca^{2+} ions released in the cytosol originated from the extracellular space and/or intracellular stores, depending on the study. Notably, these studies designated ryanodine-like receptors as the main facilitators of intracellular Ca^{2+} store mobilization (Garcia-Mata et al., 2003; Lamotte et al., 2006). The ability of NO to mobilize Ca^{2+} was further supported by the findings that the increases in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ triggered by biotic or abiotic stimuli, such as elicitors of defense responses or hyperosmotic stresses, were suppressed by NO scavengers (Lamotte et al., 2004, 2006).

The data summarized above raise the question of the mechanisms underlying the effects of NO on Ca^{2+} mobilization. Studies using agonists or antagonists of cGMP and cADPR suggested that these secondary cytosolic messengers have a central role in mediating NO effects on Ca^{2+} -permeable channels. For instance, in a fashion similar to the processes occurring in the sea urchin egg during fertilization (Willmott et al., 1996), a pathway in which cGMP produced in response to NO might stimulate cADPR biosynthesis to mobilize Ca^{2+} has been proposed in *V. faba* guard cells (Garcia-Mata et al., 2003). The detailed molecular mechanisms of this action are still unclear. Other processes that may allow NO-induced mobilization of Ca^{2+} include the activation of protein kinases. Accordingly, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ triggered by NO in *V. faba* guard cells or in tobacco cells was greatly reduced by protein kinase inhibitors such as staurosporine or K252A (Sokolovski et al., 2005; Lamotte et al., 2006). The possibility that the SnRK2 (for SNF1-related protein kinase2) protein kinase NtOSAK (for osmotic stress-activated protein kinase) accounts for NO effects on evoked $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevations in tobacco cell suspensions has been suggested (Lamotte et al., 2006). Supporting this assumption, both NtOSAK activity and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation were rapidly and transiently enhanced within a similar time window in cells

exposed to the NO donors. A recent study tried to elucidate the connection between NO and NtOSAK partners and the incidence of this coupling in the salt stress signaling pathway (Wawer et al., 2010). The results of this study highlighted that NO released by NO donors, or endogenously produced in response to the salt stress, does not activate NtOSAK through S-nitrosylation but rather by promoting the phosphorylation of two Ser residues located within the kinase activation loop. A search for NtOSAK protein partners was also performed. The corresponding proteins were not related to Ca²⁺ signaling but rather to metabolism, minimizing a putative role for NtOSAK in mediating NO effects on Ca²⁺ homeostasis.

CAM, A NEW PROTEIN TARGET OF NO?

As discussed above, S-nitrosylation is emerging as an important NO-dependent posttranslational protein modification. Upon S-nitrosylation, proteins display slight conformational changes, become activated or inhibited, interact with new partners, and/or are translocated to distinct cellular compartments (Hess et al., 2005). In animals, the broad spectrum of functions ascribed to proteins found to be S-nitrosylated affects essentially all major cellular activities. Notably, the list of S-nitrosylated proteins includes several types of Ca²⁺-permeable channels such as ryanodine receptors, L-type Ca²⁺ channels, store-operated Ca²⁺ channels, CNGCs, N-methyl D-Asp receptor, or transient receptor potential channels (Stamler et al., 2001; Lipton et al., 2002; Yoshida et al., 2006). All of these channels were found to be activated or inhibited through S-nitrosylation in vitro and, for some of them, in vivo. In plants, although the interest in S-nitrosylation is recent, the number of S-nitrosylated proteins has rapidly grown to well over 100 (Astier et al., 2012b). Importantly, the proteomic analyses of protein S-nitrosylation in different biological backgrounds did not lead to the identification of plant putative Ca²⁺-permeable channels. Basically, this observation suggests that the mechanisms by which NO regulates Ca²⁺ fluxes might not be strictly conserved between animals and plants. However, this conclusion remains premature, as the method used to selectively identify S-nitrosylated proteins, commonly referred to as the biotin switch assay (Astier et al., 2011), is inefficient at targeting transmembrane proteins. Furthermore, the assumption that NO modulates components of the plant Ca²⁺ signaling machinery by S-nitrosylation has been recently supported by Astier et al. (2012a). Those authors performed a proteome-wide analysis aimed at identifying S-nitrosylated proteins in tobacco cell suspensions elicited by the oomycete elicitor cryptogein. A dozen proteins undergoing a fast and transient S-nitrosylation were identified. Interestingly, among the corresponding peptides identified by mass spectrometry analysis, one corresponds to a CaM. Thirteen independent *CaM* genes, designated *NtCaM1* to

NtCaM13, were previously isolated in tobacco (Yamakawa et al., 2001). Based on their deduced amino acid sequence homology, these genes encode three distinct protein isoforms: type I isoforms encoded by *NtCaM1* and *NtCaM2*, type II isoforms encoded by *NtCaM3* to *NtCaM12*, and type III isoform encoded by *NtCaM13*. *NtCaM1* and *NtCaM2* and *NtCaM13* transcripts were shown to accumulate following TMV infection (Yamakawa et al., 2001), and, as mentioned above, a contribution for type III NtCaM to the basal resistance against TMV, bacterial, and fungal pathogens has been reported (Takabatake et al., 2007). In contrast, transcripts encoding type II NtCaM constitutively accumulate in leaves (Yamakawa et al., 2001). In terms of structure, CaM contains four Ca²⁺-binding EF hand motifs: EF-1 and EF-2 forming the N-terminal domain and EF-3 and EF-4 forming the C-terminal domain. These two domains are connected by a flexible linker (Lewit-Bentley and Réty, 2000).

The peptide identified in the mass spectrometry analysis by Astier et al. (2012a) is strictly conserved between the type I and II NtCaMs and displays the KDGDGCITTK sequence (positions 22–32; Fig. 1A). This finding warrants further attention. Indeed, this sequence belongs to the EF-1 domain (positions 21–32). Typically, these 12 residues form a canonical loop with a pentagonal bipyramidal geometry to form a Ca²⁺-binding loop (Lewit-Bentley and Réty, 2000). In this loop, Ca²⁺ is chelated through seven coordination sites involving the side chain oxygens of the first, third, fifth, and 12th residues (called X, Y, Z, and –Z, respectively), the carbonyl oxygen of the seventh residue (named –Y), and a hydrogen-bonded water molecule located at the level of the ninth residue (named –X). Residues X, Y, Z, and –Z are conserved and correspond to Asp, Asp/Asn, Asp/Asn/Ser, and Glu, respectively, while –Y and –X are more variable, although we usually find Asp/Asn/Ser at position –X. According to this model, Asp-21 (X), Asp-23 (Y), Asp-25 (Z), Cys-27 (–Y), and Glu-32 (–Z) of the EF-1 motif of type I and II NtCaM participate in Ca²⁺ coordination, the water molecule being at the level of Thr-29 (–X; Fig. 1, B–D). Residue Cys-27 was found to be S-nitrosylated in response to cryptogein treatment. Three features might explain the reactivity of this particular residue. First, this residue is flanked by basic and acidic chains (Asp-21, Lys-22, Asp-23, Asp-25, Cys-27, Lys-31, and Glu-32) within the EF-1 domain. According to several studies, the propensity of a particular Cys residue to be S-nitrosylated is partially dependent on acidic and basic residues with a close proximity (Marino and Gladyshev, 2010; Seth and Stamler, 2011). Second, the spatial proximity of uncharged H-bond donors, notably Thr residues, can favor Cys S-nitrosylation by lowering its pK_a (Marino and Gladyshev, 2012). The EF-1 motif of type I and II NtCaM contains two Thr residues spatially close to Cys-27. Third, based on proposed plant CaM structures (McCormack et al., 2005), Cys-27 is located in a solvent-accessible surface

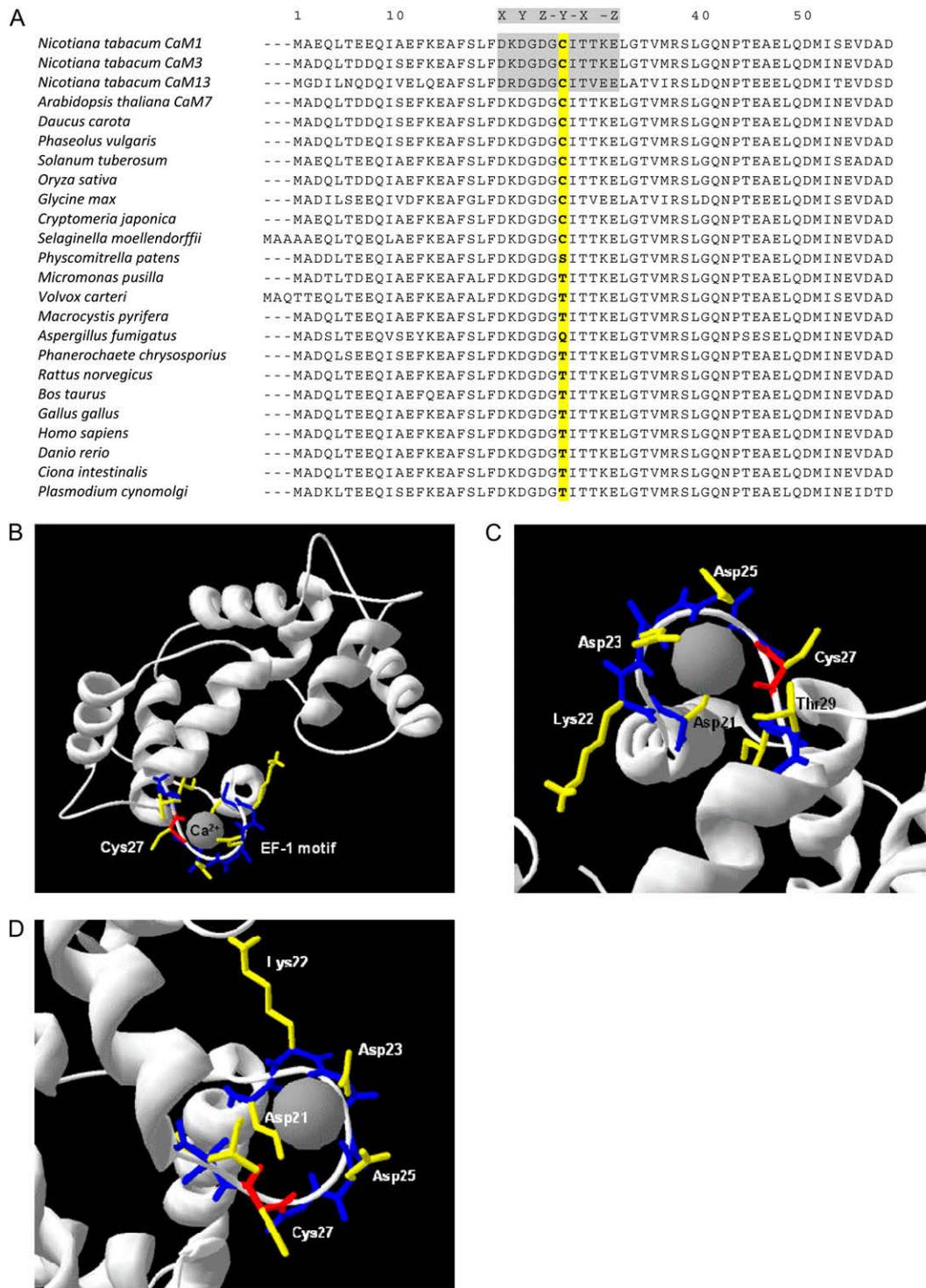


Figure 1. Primary structure and computational modeling of the EF-1 motif of type I and II NtCaMs. A, Alignment of the N-terminal region of NtCaMs type I (isoform NtCaM1), type II (NtCaM3), and type III (NtCaM13) with CaMs of other seed plants and organisms. The EF-1 motif of tobacco NtCaM is highlighted in gray. The seventh residue of the EF-1 motif (Cys-27 in tobacco NtCaM) regulated through *S*-nitrosylation is highlighted in yellow. It is conserved in seed plants as Cys-27 and, with few exceptions, replaced by a Thr residue in other organisms. B, Prediction of the three-dimensional structure of type I NtCaMs. Only the EF-1 motif is shown in its Ca²⁺-chelating structure. Cys-27 is represented in red, except for its side chain represented in yellow. The structural model of NtCaM1 was generated using the I-TASSER structure program (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) and visualized using the Swiss-Pdb Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>). Ca²⁺ ions binding in the EF-1 motif have been predicted with I-TASSER using the crystal structure of the Ca²⁺-saturated CaM-like protein

Table 1. OG-responsive genes regulated through NO and encoding proteins involved in Ca²⁺ homeostasis

Genes were gathered in three functional classes according to their putative function in Ca²⁺ signaling. Identifier refers to automatic Arabidopsis annotation according to Arabidopsis Genome Initiative number from The Institute for Genomic Research. For fold change, positive ratio indicates that the gene is induced, negative ratio indicates that the gene is repressed, and a dash indicates that the gene is not significantly modulated. Details related to the experimentation and the statistical treatments of the data are provided in "Materials and Methods."

Identifier	Fold Change in Response to OG Treatment		
	1 h	6 h	
Ca²⁺ sensors			
At1G76640	CML39	5.71	–
At3G10300	CML49	4.97	–
At3G25600	CML16	4.38	–
At3G57530	CDPK32	3.15	–
At5G42380	CML37	–	8.81
At1G51960	IQD27 (CaM-binding protein)	–	7.08
At2G26410	IQD4 (CaM-binding protein)	–	5.04
At5G26920	CBP60g (CaM-binding protein)	–	4.91
At3G47480	CML47	–	3.57
At4G26470	CML21	–	3.34
At2G41100	CML12/TCH3	–	3.17
At1G18210	CML27	–	2.49
At5G13460	IQD11 (CaM-binding protein)	–2.74	–
At3G23000	CIPK7/SnRK3.10	–3.11	–
At5G54130	Ca ²⁺ -binding EF hand protein	–3.69	–
At5G45820	CIPK20/SnRK3.6	–4.08	–
At5G25110	CIPK25/SnRK3.25	–4.58	–
At4G33000	CBL10	–4.90	–4.13
Ca²⁺ channels/pumps			
At2G29110	GLR2.8	8.29	–
At5G11210	GLR2.5	–	16.45
At3G22910	ACA13	–	4.63
At2G41560	ACA4	–	–2.27
At3G51480	GLR3.6	–	–3.66
Others			
At5G46360	KCO3	–	5.56
At5G65020	ANNAT2	–	–3.78

of the protein, another common feature of Cys residues undergoing S-nitrosylation (Fig. 1, B–D).

What could be the incidence of Cys-27 S-nitrosylation? Our current knowledge of EF-1 S-nitrosylation is too weak to allow a definitive conclusion. However, based on the literature, several scenarios are conceivable. Notably, computational investigations aimed at understanding how proteins control the reactivity of S-nitrosothiols indicate that interactions occur between S-nitrosylated Cys residues and physically close protonated basic and deprotonated acidic residues (Talipov and Timerghazin, 2013). Although the side chain of Cys-27 does not contribute to Ca²⁺ coordination, with regard to the occurrence of acidic and basic residues in its surrounding environment, we assume

that such interactions could be involved in small conformational rearrangements affecting Ca²⁺ binding or Ca²⁺ affinity for EF-1. Another possibility is that Cys-27 S-nitrosylation might influence the interaction of type I or II NtCaMs with partner proteins. More generally, it should be specified that the putative regulation of CaM by S-nitrosylation modification has not been reported to date in the published literature. This statement is partly explained by the fact that the Cys residue of the EF-1 motif is conserved among seed plant CaMs while it is rare in other organisms, where it is replaced by a Thr residue or, occasionally, by a Gln or Ser residue (Fig. 1A). According to Marino and Gladyshev (2012), because of their high reactivity and also chemical plasticity, Cys residues in proteins

Figure 1. (Continued.)

CARDIAC TROPONIN C from *Gallus gallus* as template. C and D, Enlargement of the EF-1 motif shown in two orientations. Several residues of the EF-1 motif involved in Ca²⁺ binding are specified: Asp-21, Asp-23, and Asp-25 chelating Ca²⁺ through their side chain oxygens and Cys-27 chelating Ca²⁺ through its carbonyl oxygen. Cys-27 is represented in red, except for its side chain represented in yellow. C and D show that the side chain of Cys-27 is located on the surface of the protein and, therefore, is freely accessible.

appear to be under strict evolutionary control. Whether the presence of the Cys residue in the EF-1 motif confers certain advantages to seed plants, notably in their adaptation to the nitrosative stresses due to biotic stresses, remains to be established.

NO MODULATES THE EXPRESSION OF CA²⁺ SIGNALING-RELATED GENES

During the last decade, medium- and large-scale transcriptional analyses have been performed in order to identify plant NO-responsive genes. In most of these approaches, a search for these genes has been undertaken in Arabidopsis, tobacco, or *Medicago truncatula* plantlets, roots, or cell suspensions exposed to gaseous NO or NO donors (for review, see Grün et al., 2006; Zago et al., 2006). Besson-Bard et al. (2009) provided a preliminary list of the genes commonly found in these studies. These NO-responsive genes include (Arabidopsis gene identifier numbers are provided here), among others, the Ca²⁺-sensitive phosphatase calcineurin B-like (CBL) protein1 (*At4g17615*), a member of the calcium-binding EF hand protein family (*At5G39670*), as well as a putative CaM (*At2G41410*), highlighting a putative role for NO as a component of the pathways regulating the expression of genes encoding Ca²⁺ signaling-related proteins. However, since the application of exogenous NO donors does not accurately mimic the effects of NO produced endogenously, confirmation of this assumption required an appropriate model for examining NO-dependent Ca²⁺ signaling-related genes under physiological contexts.

Hence, in this study, we performed an original genome-scale expression profiling of Arabidopsis leaves using an Arabidopsis NimbleGen Gene Expression 12x135K array covering the Arabidopsis

genome. For this purpose, 4-week-old plant leaves preinfiltrated or not with the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) were elicited with the DAMP OG with an average degree of polymerization of 25. We recently reported that OG triggers a fast NO synthesis in Arabidopsis leaves, this process being markedly suppressed by cPTIO (Rasul et al., 2012). Then, samples were collected after 1 and 4 h of OG treatment. We selected as NO target genes all genes whose regulation by OG was modulated by cPTIO.

The microarray analysis revealed that 982 and 2,003 genes displayed significant differential expression after 1 and 6 h of OG treatment, respectively. NO target genes represented a significant part of these genes (40% and 50% at 1 and 6 h of OG treatment, respectively), confirming NO involvement as a key component of the OG-induced signaling cascade leading to defense responses (data not shown). Importantly, among the NO-responsive genes, 25 genes were annotated as Ca²⁺ signaling-related genes (Table I). These genes were gathered into three main functional classes: Ca²⁺ sensors, Ca²⁺-permeable channels/Ca²⁺ pumps, and other Ca²⁺-dependent proteins (Table I). The first class encodes EF hand-containing proteins including CMLs and the CBL protein CBL10 acting as sensor relays. The first class also contains CDPK32, CBL-interacting protein kinases (CIPKs), and CaM-binding proteins. In a fashion similar to CDPKs, CIPKs mediate Ca²⁺ signaling by phosphorylating downstream targets, but their activation first requires CBL binding (Batistič and Kudla, 2012). The second class corresponds to GLRs and ACAs. Several lines of experimental evidence suggest that GLRs (notably GLR3.4) function as amino acid-gated Ca²⁺-permeable channels mediating Ca²⁺ influxes into the cytosol (Spalding and Harper 2011; Vincill et al., 2012). ACAs are

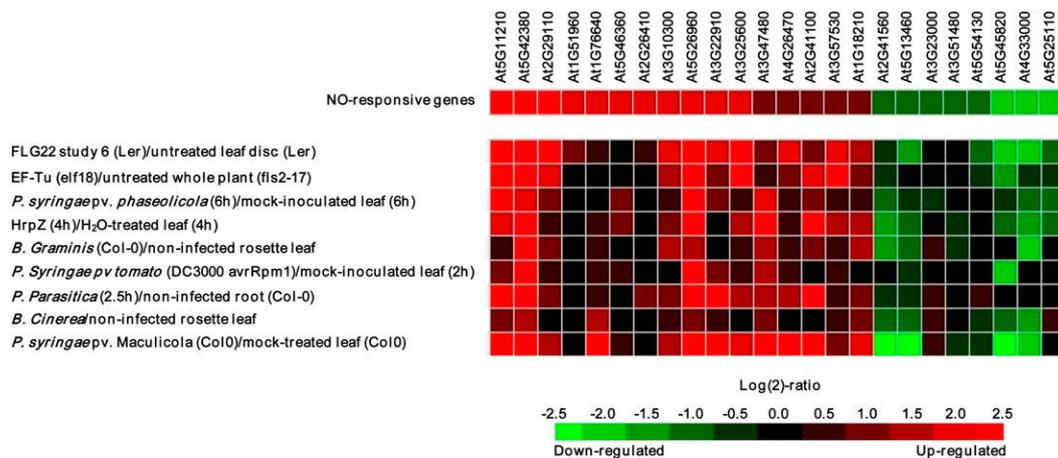


Figure 2. Biotic stimuli modulating the NO-responsive genes similarly to OGs. The search for these stimuli was performed using Genevestigator’s Signature tool screening the complete Genevestigator (Hruz et al., 2008) database to identify conditions in which a given expression signature occurs (<https://www.genevestigator.com/gv/>). Positive ratio indicates that the gene is induced (red boxes); negative ratio indicates that the gene is repressed (green boxes).

CaM-regulated Ca²⁺-ATPases thought to be involved in Ca²⁺ effluxes. The third class corresponds to genes encoding proteins with various functions, including the Ca²⁺-dependent membrane-binding protein annexin ANNAT2 and the putative K⁺ channel KCO3 displaying two EF hand motifs.

Sixty-five percent of these genes were up-regulated at 1 or 6 h post treatment. *At4g33000* encoding CBL10 was the sole gene found to be regulated by NO at both time points. Interestingly, all the genes encoding CMLs were up-regulated, while those encoding CIPKs were all repressed. As shown in Figure 2, these NO-responsive genes are similarly modulated in response to several MAMPs and microorganisms, highlighting their involvement as the molecular machinery facilitating plant defense responses to pathogens. The functions of some of these genes and/or proteins have been ascribed. For instance, the CaM-binding protein CBP60g was reported to contribute to MAMP-triggered salicylic acid accumulation and to plant resistance against *Pseudomonas syringae* (Wang et al., 2009). Using

transgenic plants expressing mutated CBP60g proteins that no longer bind CaM, the authors provided evidence that CaM binding is required for CBP60g function in disease resistance and MAMP-induced salicylic acid accumulation. Therefore, CBP60g might constitute a functional link between Ca²⁺ signaling and disease resistance. In contrast, the vacuolar Ca²⁺ pump ACA4 has been shown to negatively regulate salicylic acid-dependent PCD (Boursiac et al., 2010). Finally, as discussed previously, roles for putative GLRs in mediating MAMP-induced Ca²⁺ influx in Arabidopsis and tobacco have been proposed (Kwaaitaal et al., 2011; Vatsa et al., 2011).

Overall, the data emerging from this original transcriptomic analysis reveal that NO produced endogenously following the cellular perception of a MAMP is one of the molecular players governing the expression of genes encoding components of Ca²⁺ signaling. The physiological incidence of this process in the plant adaptive response to pathogen attack remains to be deciphered.

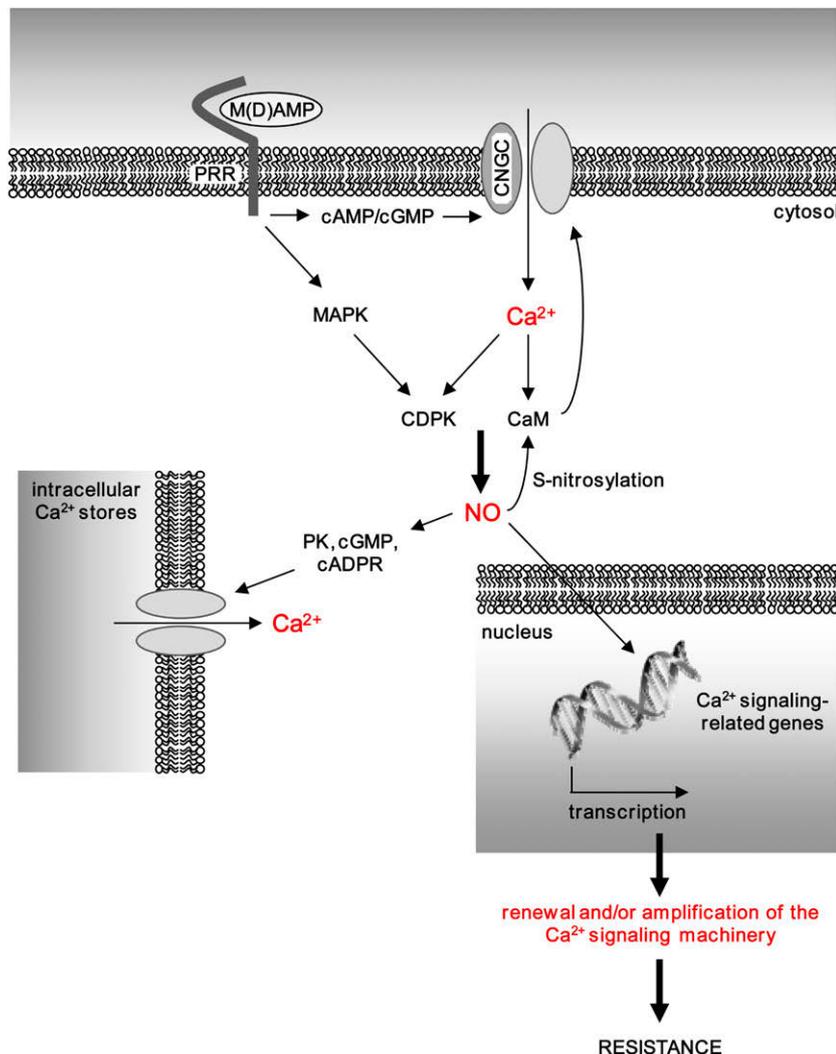


Figure 3. Interplay between NO and Ca²⁺ in PAMP/DAMP-triggered immune responses. Binding of PAMP or DAMP [referred as M(D)AMP] to their plasma membrane receptors (PRR, for pattern recognition receptors) triggers an influx of Ca²⁺ from the extracellular space. Candidates for mediating Ca²⁺ fluxes include CNGCs, which appear to be activated by cAMP and cGMP. The resulting increase in [Ca²⁺]_{cyt} modulates the activity of Ca²⁺ sensors such as CaM and CDPK. CDPK could also act downstream of the MAPK signaling cascade. These Ca²⁺ sensors are required for NO synthesis. CaM might also block further CNGC-dependent increases in [Ca²⁺]_{cyt}. Once produced, NO initiates several Ca²⁺-related pathways. First, NO amplifies the increase in [Ca²⁺]_{cyt} by mobilizing free Ca²⁺ from intracellular stores. Several arguments point to a role of protein kinases (PK) and/or of the second messengers cGMP and cADPR. Second, NO contributes to the transcriptional activation of genes encoding Ca²⁺ signaling-related proteins, including Ca²⁺ sensors, Ca²⁺-permeable channels/Ca²⁺ pumps, and other Ca²⁺-dependent proteins. This process might promote the renewal and/or amplify the Ca²⁺ signaling machinery and, ultimately, facilitate plant defense responses to pathogens. Third, NO regulates CaM at the posttranslational level through S-nitrosylation. The incidence of this mechanism is currently unknown.

CONCLUSION

In the late 1990s, Clementi and Meldolesi (1997) published a review summarizing the interplay operating between NO and Ca²⁺ in animal cells. They titled their review “The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: a story with a complex past and a promising future.” This title is well suited to our analysis of these signaling molecules in plants. What have we learned from the past 15 years? First, the production of NO occurring in response to MAMPs or pathogenic microorganisms is partly or strictly Ca²⁺ dependent; second, NO acts as a Ca²⁺-mobilizing compound by facilitating Ca²⁺ release from intracellular stores or its influx from the extracellular space; and third, NO modulates Ca²⁺ sensors through transcriptional but also posttranslational processes, as shown in this study (Fig. 3). Therefore, a bidirectional cross talk seems to operate between these two signaling compounds: NO contributes to Ca²⁺ signaling at multiple sites, while Ca²⁺ and Ca²⁺ sensors regulate its production. What are the future areas of research? Incertitude and many gaps remain, incertitude notably because of the still questionable specificity of the pharmacological tools used to investigate Ca²⁺ and NO functions. This recurrent situation, which still limits our understanding of the mechanisms underlying NO/Ca²⁺ cross talk, requires filling up a major gap, that is to say the molecular identification and the functional analysis of the components involved in these processes. The first searches for these components have borne fruits through the identification of CNGC2 and several CaMs. Furthermore, recent efforts to identify NO target proteins led to the unexpected finding that CaMs might be regulated through S-nitrosylation. Although the incidence of this mechanism remains to be investigated, it opens new concepts and gives an original view of how NO could control Ca²⁺ signaling. We also still have more to learn about the cellular and physiological incidence of the NO-dependent transcriptional regulation of Ca²⁺ homeostasis-related genes. The situation is rather complex, as NO promotes or represses the expression of genes encoding the main actors of Ca²⁺ homeostasis, including putative channels and pumps, Ca²⁺ sensors, and other Ca²⁺-binding proteins. Understanding this network will require a detailed functional analysis of the candidates of interest. Available data, such as those related to *CBP60g* and *ACA4*, confirm the importance of several of these proteins in a plant facing pathogen attack and support the need to pursue similar investigations of other candidate proteins.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) plants were cultivated in commercial soil (Jiffy-7; Puteaux) in a climate-controlled growth chamber with a 10-h-light (175 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)/14-h-dark cycle with the following settings: 20°C light, 18°C dark, 70% relative humidity in light/95% in dark.

OGs

OGs, a polysaccharide derived from pectin with an average degree of polymerization of 25, were obtained from GOEMAR. OGs were dissolved in water at a working concentration of 2.5 mg mL⁻¹.

Transcriptomic Analysis

Plant Treatments

Four-week-old *Arabidopsis* plants kept in growth chambers were first infiltrated with 500 μM of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO; Sigma) dissolved in water or with water. One hour later, the same leaf areas were infiltrated with 2.5 mg mL⁻¹ OGs or with water. Four treatments were performed: control (plants infiltrated with water instead of cPTIO and OGs), cPTIO control (plants first infiltrated with cPTIO and then with water instead of OGs), OGs (plants first infiltrated with water and then with OGs), and OGs + cPTIO (plants first infiltrated with cPTIO and then with OGs). Three replicates containing three plants per replicate for each treatment were collected. Three independent experiments were performed.

RNA Extraction and Complementary DNA Labeling

Total RNAs were extracted from the frozen tissues with the RNeasy Plant mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality was checked by microchips on the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Total RNAs (10 μg) were reverse transcribed using the SuperScript double-stranded complementary DNA (cDNA) synthesis kit (Invitrogen) following to the manufacturer's instructions. Then, double-stranded cDNAs were labeled with Cy3 random nonamer primers using the NimbleGen One color DNA labeling kit (Roche NimbleGen).

Array Hybridization and Scanning

Cy3-labeled cDNAs were hybridized on *Arabidopsis* Gene Expression Arrays (Roche NimbleGen) containing 24,576 gene-specific tags from *Arabidopsis*. The hybridizations were performed using a NimbleGen hybridization kit (Roche NimbleGen). The slides were scanned using a Genepix 4000B scanner (Axon).

Microarray Data Analysis

The scanned image files were analyzed using the NimbleSan software version 2.6. Normalization of the raw hybridization signal on each array was performed using the same software for a better cross-array comparison using quartile normalization. Gene calls were generated using the robust multichip average algorithm. A background correction was also performed. The quality of processing was evaluated through the signal range and the coefficient of variation of each array. Statistical comparison and filtering were performed using Partek Genomics Suite 6.5 (Partek). Pairwise comparisons were carried out by comparing each sample from one group with each sample from the other groups, and only genes showing a 2-fold modulation in all pairwise comparisons were retained.

Received May 1, 2013; accepted June 7, 2013; published June 7, 2013.

LITERATURE CITED

- Aboul-Soud MA, Aboul-Enein AM, Loake GJ (2009) Nitric oxide triggers specific and dose-dependent cytosolic calcium transients in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 4: 191–196
- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 19: 1081–1095
- Ali R, Zielinski RE, Berkowitz GA (2006) Expression of plant cyclic nucleotide-gated cation channels in yeast. *J Exp Bot* 57: 125–138
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20: 1390–1406
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, Bertoldo J, Bourque S, Terenzi H, Wendehenne D (2012a) Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogam signalling in tobacco cells. *Biochem J* 447: 249–260

- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O, Wendehenne D (2012b) Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radic Biol Med* 53: 1101–1110
- Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C, Wendehenne D (2011) S-Nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Sci* 181: 527–533
- Balagué C, Lin B, Alcon C, Flottes G, Malmström S, Köhler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D (2003) HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. *Plant Cell* 15: 365–379
- Batistic O, Kudla J (2012) Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* 1820: 1283–1293
- Besson-Bard A, Astier J, Rasul S, Wawer I, Dubreuil-Maurizi C, Jeandroz S, Wendehenne D (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci* 177: 302–309
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A, Wendehenne D (2008a) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol Plant* 1: 218–228
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F, Wendehenne D (2008b) Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogin, an elicitor of defence responses. *J Exp Bot* 59: 3470–3474
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008c) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 59: 21–39
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379–406
- Bouché N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol* 56: 435–466
- Boudsoq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464: 418–422
- Boursiac Y, Lee SM, Romanowsky S, Blank R, Sladek C, Chung WS, Harper JF (2010) Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in Arabidopsis results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. *Plant Physiol* 154: 1158–1171
- Cheval C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B (2013) Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1766–1771
- Chiasson D, Ekengren SK, Martin GB, Dobney SL, Snedden WA (2005) Calmodulin-like proteins from Arabidopsis and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Mol Biol* 58: 887–897
- Clementi E (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol* 55: 713–718
- Clementi E, Meldolesi J (1997) The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: a story with a complex past and a promising future. *Trends Pharmacol Sci* 18: 266–269
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK Jr, Bent AF (2000) The Arabidopsis dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9323–9328
- Cooke CJ, Smith CJ, Walton TJ, Newton RP (1994) Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor. *Phytochemistry* 35: 889–895
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* 184: 9–14
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J Exp Bot* 59: 155–163
- Dangl J (1998) Innate immunity: plants just say NO to pathogens. *Nature* 394: 525–527
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585–588
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783–792
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* 23: 817–824
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 22: 3816–3830
- Frietsch S, Wang YF, Sladek C, Poulsen LR, Romanowsky SM, Schroeder JI, Harper JF (2007) A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14531–14536
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11116–11121
- Gaupels F, Kuruthukulangarakoola GT, Durner J (2011) Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr Opin Plant Biol* 14: 707–714
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23: 441–450
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* 57: 507–516
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, et al (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282: 32338–32348
- Hashimoto K, Kudla J (2011) Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93: 2054–2059
- Heo WD, Lee SH, Kim MC, Kim JC, Chung WS, Chun HJ, Lee KJ, Park CY, Park HC, Choi JY, et al (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 766–771
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150–166
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747
- Hua B, Mercier RW, Zielinski RE, Berkowitz GA (2003) Functional interaction of calmodulin with a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiol Biochem* 41: 945–954
- Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anschutz U, Krol E, Elzenga JTM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J* 62: 367–378
- Jiang J, Fan LW, Wu WH (2005) Evidences for involvement of endogenous cAMP in Arabidopsis defense responses to Verticillium toxins. *Cell Res* 15: 585–592
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329
- Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, Iwai S (2013) Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 558–571
- Jurkowski GI, Smith RK Jr, Yu IC, Ham JH, Sharma SB, Klessig DF, Fengler KA, Bent AF (2004) Arabidopsis DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the “defense, no death” phenotype. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 511–520
- Kwaaitaal M, Huisman R, Maintz J, Reinstädler A, Panstruga R (2011) Ionotropic glutamate receptor (iGluR)-like channels mediate MAMP-induced calcium influx in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 440: 355–365
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic Biol Med* 40: 1369–1376
- 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 cryptogin. *Plant Physiol* 135: 516–529
- Laohavisit A, Shang Z, Rubio L, Cuin TA, Véry A-A, Wang A, Mortimer JC, Macpherson N, Coxon KM, Battey NH, et al (2012) *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells. *Plant Cell* 24: 1522–1533
- Laxalt AM, Raho N, Have AT, Lamattina L (2007) Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *J Biol Chem* 282: 21160–21168

- 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, Ranjeva R, Pugin A (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* **171**: 249–269
- Lemtiri-Chlieh F, Berkowitz GA (2004) Cyclic adenosine monophosphate regulates calcium channels in the plasma membrane of Arabidopsis leaf guard and mesophyll cells. *J Biol Chem* **279**: 35306–35312
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* **121**: 753–761
- Lewit-Bentley A, Réty S (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 637–643
- Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA (2002) Cysteine regulation of protein function: as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* **25**: 474–480
- Ma W, Berkowitz GA (2007) The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol* **9**: 2571–2585
- Ma W, Berkowitz GA (2011) Ca²⁺ conduction by plant cyclic nucleotide-gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol* **190**: 566–572
- Ma W, Qi Z, Smigel A, Walker RK, Verma R, Berkowitz GA (2009) Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 20995–21000
- Ma W, Smigel A, Tsai YC, Braam J, Berkowitz GA (2008) Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol* **148**: 818–828
- Ma Y, Walker RK, Zhao Y, Berkowitz GA (2012) Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca²⁺ elevation and downstream immune signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 19852–19857
- Manzoor H, Chiltz A, Madani S, Vatsa P, Schoefs B, Pugin A, Garcia-Brugger A (2012) Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium* **51**: 434–444
- Marino SM, Gladyshev VN (2010) Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *J Mol Biol* **395**: 844–859
- Marino SM, Gladyshev VN (2012) Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J Biol Chem* **287**: 4419–4425
- McCormack E, Tsai YC, Braam J (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* **10**: 383–389
- Moeder W, Urquhart W, Ung H, Yoshioka K (2011) The role of cyclic nucleotide-gated ion channels in plant immunity. *Mol Plant* **4**: 442–452
- Qi Z, Verma R, Gehring C, Yamaguchi Y, Zhao Y, Ryan CA, Berkowitz GA (2010) Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepRI, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 21193–21198
- Raho N, Ramirez L, Lanteri ML, Gonorazky G, Lamattina L, ten Have A, Laxalt AM (2011) Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase A and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide. *J Plant Physiol* **168**: 534–539
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **35**: 1483–1499
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**: 725–738
- Seth D, Stamler JS (2011) The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 129–136
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep* **32**: 853–866
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J* **43**: 520–529
- Spalding EP, Harper JF (2011) The ins and outs of cellular Ca²⁺ transport. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 715–720
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**: 675–683
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 217–230
- Sun A, Li Z (2012) Regulatory role of nitric oxide in lipopolysaccharides-triggered plant innate immunity. *Plant Signal Behav* **8**: 134–136
- Takabatake R, Karita E, Seo S, Mitsuhashi I, Kuchitsu K, Ohashi Y (2007) Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. *Plant Cell Physiol* **48**: 414–423
- Takata T, Kimura J, Tsuchiya Y, Naito Y, Watanabe Y (2011) Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide* **25**: 145–152
- Talipov MR, Timerghazin QK (2013) Protein control of S-nitrosothiol reactivity: interplay of antagonistic resonance structures. *J Phys Chem B* **117**: 1827–1837
- Urquhart W, Gunawardena AH, Moeder W, Ali R, Berkowitz GA, Yoshioka K (2007) The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca²⁺ dependent manner. *Plant Mol Biol* **65**: 747–761
- Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D, Bentéjac M, Alain P (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 429–440
- Vatsa P, Chiltz A, Bourque S, Wendehenne D, Garcia-Brugger A, Pugin A (2011) Involvement of putative glutamate receptors in plant defence signaling and NO production. *Biochimie* **93**: 2095–2101
- Verret F, Wheeler G, Taylor AR, Farnham G, Brownlee C (2010) Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling. *New Phytol* **187**: 23–43
- Vincill ED, Bieck AM, Spalding EP (2012) Ca²⁺ conduction by an amino acid-gated ion channel related to glutamate receptors. *Plant Physiol* **159**: 40–46
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J (2009) Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* **5**: e1000301
- Wawer I, Bucholtz M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wyslouch-Cieszyńska A, Zareba-Koziol M, Krzywinska E, Dadlez M, et al (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J* **429**: 73–83
- Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, Lee HC, White AM, Galione A (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem* **271**: 3699–3705
- Yamaguchi Y, Huffaker A (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 351–357
- Yamakawa H, Mitsuhashi I, Ito N, Seo S, Kamada H, Ohashi Y (2001) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* **268**: 3916–3929
- Yao X, Huang Y (2003) From nitric oxide to endothelial cytosolic Ca²⁺: a negative feedback control. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 263–266
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* **2**: 596–607
- Yoshioka K, Moeder W, Kang HG, Kachroo P, Masmoudi K, Berkowitz G, Klessig DF (2006) The chimeric *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell* **18**: 747–763
- Yu M, Yun BW, Spoel SH, Loake GJ (2012) A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 424–430
- Zago E, Morsa S, Dat JF, Alard P, Ferrarini A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol* **141**: 404–411
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15811–15816
- Zhang C, Czymmek KJ, Shapiro AD (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the Arabidopsis hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 962–972
- Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**: 40

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

VI. Conclusion générale - Perspectives

Les données acquises dans ce travail, résumées figure **III.5**, confirment l'existence de régulations croisées fines s'opérant entre les processus cellulaires associées à la croissance, l'immunité et l'homéostasie du fer. La balance entre ces régulations croisées est fortement impactée par l'apo-pyoverdine chez des plantes carencées en fer. De plus, ces données démontrent que les incidences physiologiques de l'apo-pyoverdine sur la physiologie de la plante diffèrent suivant la disponibilité environnementale en fer. Ce constat est un paramètre essentiel à prendre en compte dans l'optique d'utiliser des souches bactériennes productrices de pyoverdines à des fins de biocontrôle/d'amélioration de la croissance de la plante. Enfin, bien que les deux sidérophores étudiés (apo-pyoverdine et BABA) impactent l'homéostasie du fer de la plante, les conséquences sur son immunité sont différentes. Cette dernière conclusion n'est pas surprenante. D'une part, l'affinité du BABA pour le fer est moindre comparée à celle de l'apo-pyoverdine. D'autre part, le BABA potentialise les défenses de la plante *via* d'autres mécanismes probablement indépendants de son action sur l'homéostasie du fer. Enfin, la capacité du BABA à induire des événements moléculaires caractéristiques d'une carence de fer s'est révélée transitoire. Plus généralement, les points discutés ici soulèvent plusieurs interrogations :

- Comment expliquer que la réponse physiologique de la plante à un sidérophore, en particulier ses défenses, diffère suivant la nature de ce dernier ? Comme mentionné ci-dessus, l'affinité pour le fer et la disponibilité en fer de la rhizosphère sont très probablement des critères essentiels. Rajoutons à cela d'autres paramètres tels que l'assimilation ou non par la plante des sidérophores, le système d'assimilation engagé (transporteur racinaire *versus* système d'injection bactérien par exemple), leurs mobilités ou non *in planta* et leurs localisations subcellulaires qui pourraient varier selon les besoins cellulaires en fer. L'étude des effets de différentes pyoverdines sur la physiologie de la plante pourrait apporter de premiers éléments de réponse. De plus, l'identification du mécanisme moléculaire impliqué dans l'import de la pyoverdine puis l'étude de sa régulation seraient très informatives. A ce titre, nos résultats ont montré que le taux d'apo-pyoverdine assimilée par la plante ne différerait pas suivant que celle-ci soit cultivée ou non dans des conditions de carence en fer. Ainsi ce système ne serait pas inductible

VI. Conclusion générale - perspectives

par la carence mais cette conclusion n'est que préliminaire et n'exclut pas une sélectivité dans le transport de la pyoverdine suivant qu'elle soit sous forme apo-pyoverdine ou ferri-pyoverdine. En parallèle, il serait évidemment intéressant d'étudier la régulation du système d'import lors d'un processus infectieux induit par différents types de microorganismes.

- Par quels mécanismes l'apo-pyoverdine oriente-t-elle la balance croissance-défense au profit de la croissance dans les plantes carencées en fer ? Les analyses transcriptomiques associées aux analyses phénotypiques réalisées sur des plantes surexprimant ou invalidées dans l'expression de gènes d'intérêt ont donné des premiers éléments de réponse :

- D'une part, l'effet promoteur de croissance de l'apo-pyoverdine requiert l'expression d'*IRT1* et de *FRO2*. Ainsi, l'induction du système d'acquisition du fer est essentielle à la promotion de la croissance. Nous avons émis l'hypothèse que la forte accumulation des transcrits *IRT1* et *FRO2* pouvait s'expliquer par une activité chélatrice *in planta* de l'apo-pyoverdine qui activerait très fortement les processus associés à l'import de fer. La question sous-jacente concerne l'efficacité fonctionnelle de la surexpression d'*IRT1* et de *FRO2*. En d'autres termes, autorise-t-elle un import du fer résiduel présent à la surface des racines ou dans l'apoplaste ? Dans l'affirmative, le fer importé pourrait être utilisé dans les processus inhérents à la croissance observée.

- D'autre part, l'effet promoteur de croissance de l'apo-pyoverdine dans les plantes carencées s'accompagne d'une modulation de l'expression des gènes *PRE1*, *IBH1* et *HBI1* dont les produits sont des acteurs clés de l'orientation de la balance croissance-défense (Lozano-Durán & Zipfel, 2015). Les profils d'expression observés sont clairement en faveur de la croissance aux dépens de la défense, en accord avec les tests de pathogénicité. L'utilisation du surexpresseur de *HBI1* ne nous a toutefois pas permis d'étayer l'hypothèse d'un rôle de la protéine correspondante dans la promotion de la croissance *versus* la défense. Il serait donc important d'apporter des arguments expérimentaux supplémentaires afin de soutenir cette possibilité. Parmi les expériences qui pourraient être mises en œuvre, l'analyse de la capacité de l'apo-pyoverdine à induire la synthèse de BR, en particulier dans la condition de carence de fer, semble importante. De plus, l'effet antagoniste de l'apo-pyoverdine sur la résistance à *B. cinerea* des plantes carencées en fer devra être étudié dans le surexpresseur de *HBI1*. Enfin, nous avons

VI. Conclusion générale - perspectives

identifié plusieurs gènes cibles de HBI1 dont les produits concourent à ses effets tels qu'*ATEXP1* et *ATEXP8* codant des expansines. L'implication de ces dernières dans les effets de l'apo-pyoverdine pourrait être testée *via* l'utilisation de plantes surexprimant ces protéines ou invalidées dans leur expression.

- Quid des plantes de stratégie II ? Comme discuté ci-dessus, l'effet promoteur de croissance de l'apo-pyoverdine dans les plantes carencées semble fortement conditionné par l'expression d'*IRT1* et *FRO2*, deux protéines clés des plantes utilisant la stratégie I d'acquisition du fer. Cela pose la question de l'incidence de l'apo-pyoverdine chez les Graminées dont le système d'acquisition du fer est basé sur l'utilisation de phytosidérophores. Il serait donc pertinent d'analyser si les réponses phénotypiques induites par l'apo-pyoverdine dans les plantes d'*A. thaliana* carencées en fer s'observe chez des Graminées. Cette étude pourrait être étendue à d'autres plantes de stratégie I, par exemple la tomate chez laquelle les systèmes d'acquisition du fer ont été décrits. Cela permettrait notamment de vérifier si la réponse observée chez *A. thaliana* est généralisable ou pas aux plantes de stratégie I et II. Dans le cas des plantes de stratégie II, une réponse affirmative sous-entendrait que des systèmes d'acquisition du fer distincts d'*IRT1/FRO2* sont mobilisables par l'apo-pyoverdine. Dans le même raisonnement, une étude récente a montré qu'outre le système d'import *IRT1/FRO2*, la réponse adaptative d'*A. thaliana* à la carence en fer peut impliquer la sécrétion de coumarines susceptibles d'agir à la manière de phytosidérophores (Fourcroy *et al*, 2014). Ce mécanisme engage le transporteur ABC PDR9 (ABCG37). Nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de ce gène dans nos différentes conditions expérimentales. Analyser l'incidence de l'apo-pyoverdine chez des plantes surexprimant ou n'exprimant plus ce gène serait toutefois informatif afin de mieux cerner le mode d'action du sidérophore.

- Le NO est-il impliqué ? Le NO joue un rôle important dans la réponse adaptative à la carence en fer chez *A. thaliana* et la tomate. Il agit en effet comme molécule signalétique et promeut l'expression de gènes associés à l'import de fer dont *IRT1* et *FRO2*. Le fait de ne pas mesurer de production de NO lors d'un traitement par l'apo-pyoverdine est donc surprenant. Il n'est toutefois pas exclu que celui-ci soit produit en faible concentration, de façon très localisée ou dans une courte fenêtre de temps. Afin de vérifier l'implication potentielle du NO, une approche d'identification de protéines S-nitrosylées sans *a priori* pourrait être menée. L'identification de telles protéines permettrait de mieux décrypter

VI. Conclusion générale - perspectives

le mode d'action de l'apo-pyoverdine et apporterait de nouvelles perspectives de recherche. En effet, comme cela a été discuté dans cette thèse, les protéines S-nitrosylées sont des acteurs clés des effets du NO et l'analyse de l'incidence de leur S-nitrosylation permet de mettre à jour des mécanismes de régulations cellulaires particulièrement subtils.

En conclusion, nos travaux ont apporté de nouvelles données quant à l'incidence physiologique de la pyoverdine chez les plantes. La possibilité que ce sidérophore oriente la balance croissance-défense chez des plantes carencées en fer constitue le résultat le plus marquant. Comprendre ce mécanisme permettra non seulement de mieux appréhender les régulations croisées s'opérant entre les voies de signalisation cellulaires associées à la croissance, l'immunité et l'homéostasie du fer mais aussi de mieux comprendre les dialogues moléculaires entre les bactéries bénéfiques et les plantes.

ANNEXES

Annexes

1. Milieux de culture

1.1. Linsmaier & Skoog

Micro-éléments

CoCl₂, 6H₂O	0,025 mg
CuSO₄, 5H₂O	0,025 mg
Fe-Na-EDTA	36,7 mg
H₃BO₃	6,20 mg
KI	0,83 mg
MnSO₄, H₂O	16,90 mg
Na₂MoO₄, 2H₂O	0,25 mg
ZnSO₄, 7H₂O	8,6 mg

Macroéléments

CaCl₂	332,02 mg
KH₂PO₄	170 mg
KNO₃	1900 mg
MgSO₄	180,54 mg
NH₄NO₃	1650 mg

Vitamines

Myo-Inositol	100 mg
Thiamine HCl	0,40 mg

Ajuster le pH à 5,6

QSP 1 Litre.

1.2. King B

Peptone de gélatine Merck	20 g
Glycérol	12,6 g
KH₂PO₄	1,29 g
MgSO₄, 7H₂O	1,5 g
Agar	15 g

QSP 1 Litre.

1.3. SM succinate medium

K₂HPO₄	6 g
KH₂PO₄	3 g
(NH₄)₂SO₄	1 g

MgSO₄, 7H₂O	0,2 g
Acide succinique	4 g

Ajuster à pH 7
QSP 1 Litre.

1.4. Potato Dextrose Agar

Amidon de pomme de terre (infusion)	4 g
Dextrose	20 g
Gélose	15 g

QSP 1 Litre.

1.5. Solution nutritive

Ca(NO₃)₂	0,25 mM
KH₂PO₄	1 mM
KNO₃,	0,5 mM
MgSO₄,	1 mM
H₃BO₃	50 µM
MnCl₂,	19 µM
ZnSO₄	10 µM
CuSO₄	1 µM
Na₂MoO₄	0,02 µM
Fe-Na-EDTA	25 µM

1.6. Potato Dextrose Broth

Amidon de pomme de terre (infusion)	4 g
Dextrose	20 g

QSP 1 Litre.

Références

Références

- Adesina M f., Lembke A, Costa R, Speksnijder A & Smalla K (2007) Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biol. Biochem.*
- Albrecht C, Boutrot F, Segonzac C, Schwessinger B, Gimenez-Ibanez S, Chinchilla D, Rathjen JP, de Vries SC & Zipfel C (2012) Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 303–308
- Alcázar R & Parker JE (2011) The impact of temperature on balancing immune responsiveness and growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **16**: 666–675
- Alström S (1991) Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 495–501
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F & Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis* AtFer1 ferritin gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**: 23579–23588
- Arnon DI (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1–15
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, Bertoldo J, Bourque S, Terenzi H & Wendehenne D (2012a) Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogeiin signalling in tobacco cells. *Biochem. J.* **447**: 249–260
- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O & Wendehenne D (2012b) Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? *Free Radic. Biol. Med.* **53**: 1101–1110
- Attaran E, Zeier TE, Griebel T & Zeier J (2009) Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 954–971
- Aznar A, Chen NWG, Rigault M, Riache N, Joseph D, Desmaële D, Mouille G, Boutet S, Soubigou-Taconnat L, Renou J-P, Thomine S, Expert D & Dellagi A (2014) Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *Plant Physiol.* **164**: 2167–2183
- Aznar A & Dellagi A (2015) New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J. Exp. Bot.* **66**: 3001–3010
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D & Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 642–650
- Bai M-Y, Fan M, Oh E & Wang Z-Y (2012a) A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4917–4929
- Bai M-Y, Shang J-X, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T & Wang Z-Y (2012b) Brassinosteroid, gibberellin, and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **14**: 810–817

Références

- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233–266
- Bashir K, Inoue H, Nagasaka S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S & Nishizawa NK (2006) Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* **281**: 32395–32402
- Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, Nagasaka S, Fujimoto M, Takanashi H, Tsutsumi N, An G, Nakanishi H & Nishizawa NK (2011) The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat. Commun.* **2**: 322
- Beckers GJM, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S & Conrath U (2009) Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 944–953
- Belkhadir Y, Jaillais Y, Epple P, Balsemão-Pires E, Dangl JL & Chory J (2012) Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 297–302
- Belkhadir Y, Yang L, Hetzel J, Dangl JL & Chory J (2014) The growth–defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends Biochem. Sci.* **39**: 447–456
- Beneduzi A, Ambrosini A & Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* **35**: 1044–1051
- Bereczky Z, Wang H-Y, Schubert V, Ganai M & Bauer P (2003) Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *J. Biol. Chem.* **278**: 24697–24704
- Berendsen RL, Pieterse CMJ & Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**: 478–486
- Berg G & Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**: 1–13
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A & Wendehenne D (2008a) Nitric Oxide in Plants: Production and Cross-talk with Ca²⁺ Signaling. *Mol. Plant* **1**: 218–228
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J-P, Pugin A & Wendehenne D (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* **149**: 1302–1315
- Besson-Bard A, Pugin A & Wendehenne D (2008b) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 21–39
- Boller T & Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406
- 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 Phytol.* **192**: 127–139
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

Références

- utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254
- Briat J-F, Curie C & Gaymard F (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 276–282
- Briat J-F, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F & Gaymard F (2010) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Ann. Bot.* **105**: 811–822
- Brillet K, Ruffenach F, Adams H, Journet L, Gasser V, Hoegy F, Guillon L, Hannauer M, Page A & Schalk IJ (2012) An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **7**: 2036–2045
- Bron PA, van Baarlen P & Kleerebezem M (2012) Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 66–78
- Brumbarova T, Bauer P & Ivanov R (2015) Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends Plant Sci.* **20**: 124–133
- Budzikiewicz H (2004) Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (Fluorescent and Non-Fluorescent *Pseudomonas* spp.). In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Herz PW, Falk PH & Kirby PGW (eds) pp 81–237. Springer Vienna Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-0581-8_2 [Accessed June 9, 2015]
- Campbell MG, Underbakke ES, Potter CS, Carragher B & Marletta MA (2014) Single-particle EM reveals the higher-order domain architecture of soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 2960–2965
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S & Dong X (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57–63
- Carson KC, Meyer J-M & Dilworth MJ (2000) Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 11–21
- Cézard C, Farvacques N & Sonnet P (2015) Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr. Med. Chem.* **22**: 165–186
- Chaturvedi R, Krothapalli K, Makandar R, Nandi A, Sparks AA, Roth MR, Welti R & Shah J (2008) Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **54**: 106–117
- Chen C-C, Chien W-F, Lin N-C & Yeh K-C (2014) Alternative functions of *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like3: from metal translocation to pathogen defense. *PLoS One* **9**: e98008
- Chen Q, Sun J, Zhai Q, Zhou W, Qi L, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang H, Qi J, Li X, Palme K & Li C (2011) The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3335–3352
- Chen WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T & Zheng SJ (2010) Nitric Oxide Acts Downstream of Auxin to Trigger Root Ferric-Chelate Reductase Activity in Response to Iron Deficiency in *Arabidopsis*1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* **154**: 810–819

Références

- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G & Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500
- Chinen T & Rudensky AY (2012) The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses. *Immunol. Rev.* **245**: 45–55
- Choi E-Y, Kim E-C, Oh H-M, Kim S, Lee H-J, Cho E-Y, Yoon K-H, Kim E-A, Han W-C, Choi S-C, Hwang J-Y, Park C, Oh B-S, Kim Y, Kimm K-C, Park K-I, Chung H-T & Jun C-D (2004) Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**: 7069–7077
- Choi E-Y, Park Z-Y, Choi E-J, Oh H-M, Lee S, Choi S-C, Lee K-M, Im S-H, Chun J-S & Jun C-D (2007) Transcriptional regulation of IL-8 by iron chelator in human epithelial cells is independent from NF-kappaB but involves ERK1/2- and p38 kinase-dependent activation of AP-1. *J. Cell. Biochem.* **102**: 1442–1457
- Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, Slavinskaya Z & Vogel HJ (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **23**: 601–611
- Clementi E (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 713–718
- Cobessi D, Celia H, Folschweiller N, Schalk IJ, Abdallah MA & Pattus F (2005) The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* **347**: 121–134
- Colangelo EP & Guerinot ML (2004) The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response. *Plant Cell Online* **16**: 3400–3412
- Connolly EL, Nathan H, Campbell, Grotz N, Charis L, Prichard & Guerinot ML (2003) Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control. *Plant Physiol.*: 1102
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L & Mauch-Mani B (2006) Priming: Getting Ready for Battle. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**: 1062–1071
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG & Jaskiewicz MR (2015) Priming for Enhanced Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**: 97–119
- Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1637–1645
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA & Barroso JB (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1711–1722
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA & Barroso JB (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* **184**: 9–14
- Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G & Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere

Références

- community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 236–249
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P & Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann. Bot.* **103**: 1–11
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF & Walker EL (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346–349
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK & Scheible W-R (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**: 5–17
- Darbani B, Briat J-F, Holm PB, Husted S, Noeparvar S & Borg S (2013) Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. *Biotechnol. Adv.* **31**: 1292–1307
- De Bruyne L, Höfte M & De Vleeschauwer D (2014) Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Mol. Plant* **7**: 943–959
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat J-F, Gaymard F & Expert D (2005) Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **43**: 262–272
- Dellagi A, Segond D, Rigault M, Fagard M, Simon C, Saindrenan P & Expert D (2009) Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiol.* **150**: 1687–1696
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA & Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588
- Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM & Dekker J (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* **1**: 254–268
- De Vleeschauwer D, Djavaheri M, Bakker PAHM & Höfte M (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol.* **148**: 1996–2012
- De Vleeschauwer D, Van Buyten E, Satoh K, Balidion J, Mauleon R, Choi I-R, Vera-Cruz C, Kikuchi S & Höfte M (2012) Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. *Plant Physiol.* **158**: 1833–1846
- DeYoung BJ & Innes RW (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* **7**: 1243–1249
- DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB & Walker EL (2004) Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. *Plant J.* **39**: 403–414
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X & Wang S (2008) Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *Plant Cell* **20**: 228–240
- Dong X (2001) Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 309–314

Références

- Drake EJ & Gulick AM (2011) Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis. *ACS Chem. Biol.* **6**: 1277–1286
- Durner J, Wendehenne D & Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 10328–10333
- Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wirén N, Soll J & Philippar K (2007) PIC1, an Ancient Permease in Arabidopsis Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *Plant Cell* **19**: 986–1006
- Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z & Lugtenberg B (2008) High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ. Microbiol.* **10**: 1–9
- Eparvier A, Lemanceau P & Alabouvette C (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **86**: 177–184
- Escolar L, Pérez-Martín J & de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**: 6223–6229
- Fagundes CT, Amaral FA, Teixeira AL, Souza DG & Teixeira MM (2012) Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses. *Immunol. Rev.* **245**: 250–264
- Fan M, Bai M-Y, Kim J-G, Wang T, Oh E, Chen L, Park CH, Son S-H, Kim S-K, Mudgett MB & Wang Z-Y (2014) The bHLH Transcription Factor HBI1 Mediates the Trade-Off between Growth and Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Arabidopsis[W][OPEN]. *Plant Cell* **26**: 828–841
- Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, van der Helm D & Deisenhofer J (2002) Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295**: 1715–1719
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G & Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**: 3816–3830
- Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, Savirón M, Reyt G, Gaymard F, Abadía A, Abadía J, Alvarez-Fernández A & Briat J-F (2014) Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* **201**: 155–167
- Franza T, Mahé B & Expert D (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* **55**: 261–275
- Franza T, Sauvage C & Expert D (1999) Iron Regulation and Pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: Role of the Fur Repressor Protein. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12**: 119–128
- Fu ZQ & Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 839–863
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N & Dong X (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232

Références

- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadí D & Blázquez MA (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 13446–13451
- Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson LA & Dixon RA (2011) Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 20814–20819
- Garbeva P, van Elsas JD & van Veen JA (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* **302**: 19–32
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D & Pugin A (2006) Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**: 711–724
- García MJ, Lucena C, Romera FJ, Alcántara E & Pérez-Vicente R (2010) Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **61**: 3885–3899
- Gasser V, Guillon L, Cunrath O & Schalk IJ (2015) Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *J. Inorg. Biochem.* **148**: 27–34
- Giehl RFH, Lima JE & von Wirén N (2012) Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *Plant Cell* **24**: 33–49
- Gómez-Gómez L & Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* **5**: 1003–1011
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A & Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**: 1851–1862
- Gould N, Doulias P-T, Tenopoulou M, Raju K & Ischiropoulos H (2013) Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **288**: 26473–26479
- Grandperret V, Nicolas-Francès V, Wendehenne D & Bourque S (2014) Type-II histone deacetylases: elusive plant nuclear signal transducers. *Plant Cell Environ.* **37**: 1259–1269
- Graziano M, Beligni MV & Lamattina L (2002) Nitric Oxide Improves Internal Iron Availability in Plants. *Plant Physiol.* **130**: 1852–1859
- Graziano M & Lamattina L (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **52**: 949–960
- Grillet L, Mari S & Schmidt W (2014) Iron in seeds – loading pathways and subcellular localization. *Plant Nutr.* **4**: 535
- Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inzé D, Gheysen G & Goossens A (2009) Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep.* **10**: 923–928
- Gruszka D (2013) The brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 8740–8774
- Guerinot ML (2001) Improving rice yields—ironing out the details. *Nat. Biotechnol.* **19**: 417–418

Références

- Guerinot ML & Yi Y (1994) Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol.* **104**: 815–820
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM & van Dongen JT (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* **16**: 160–168
- Hanafy KA, Krumenacker JS & Murad F (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **7**: 801–819
- Harris WR, Sammons RD & Grabiak RC (2012) A speciation model of essential trace metal ions in phloem. *J. Inorg. Biochem.* **116**: 140–150
- Hay B, Dixon D, Vargas R, Garza J & Raymond K (2001) Structural criteria for the rational design of selective ligands. 3. Quantitative structure-stability relationship for iron(III) complexation by tris-catecholamide siderophores. *Inorg. Chem.* **40**: 3922–3935
- Heinrich M, Hettenhausen C, Lange T, Wünsche H, Fang J, Baldwin IT & Wu J (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **73**: 591–606
- Hentrich M, Böttcher C, Düchting P, Cheng Y, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Medina J & Pollmann S (2013) The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **74**: 626–637
- Hider RC & Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 637–657
- Hindt MN & Guerinot ML (2012) Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 1521–1530
- Hohnadel D & Meyer JM (1988) Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* **170**: 4865–4873
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y & Yu H (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884–894
- Huot B, Yao J, Montgomery BL & He SY (2014) Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol. Plant* **7**: 1267–1287
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A & Métraux J-P (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **16**: 851–858
- Igamberdiev AU, Ratcliffe RG & Gupta KJ (2014) Plant mitochondria: source and target for nitric oxide. *Mitochondrion* **19 Pt B**: 329–333
- Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S & Nishizawa NK (2009) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J. Biol. Chem.* **284**: 3470–3479
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S & Nishizawa NK (2006) Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J.* **45**: 335–346
- Jacques P, Ongena M, Bernard F, Fuchs R, Budzikiewicz H & Thonart P (2003) Fluorescent *Pseudomonas* mainly produce the dihydroform of pyoverdine at low specific growth rate. *Letts. Appl. Microbiol.* **36**: 259–262
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P & Snyder SH (2001) Protein S-

Références

- nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* **3**: 193–197
- Jaillais Y & Vert G (2012) Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nat. Cell Biol.* **14**: 788–790
- Jain A & Connolly EL (2013) Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3764374/> [Accessed June 10, 2015]
- Jakobek JL, Smith JA & Lindgren PB (1993) Suppression of Bean Defense Responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **5**: 57–63
- Jakoby M, Wang H-Y, Reidt W, Weisshaar B & Bauer P (2004) FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **577**: 528–534
- Jasid S, Simontacchi M & Puntarulo S (2008) Exposure to nitric oxide protects against oxidative damage but increases the labile iron pool in sorghum embryonic axes. *J. Exp. Bot.* **59**: 3953–3962
- Jaskiewicz M, Conrath U & Peterhänsel C (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* **12**: 50–55
- Jeandroz S, Lamotte O, Astier J, Rasul S, Trapet P, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francès V, Ma W, Berkowitz GA & Wendehenne D (2013) There's More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca²⁺ Signaling. *Plant Physiol.* **163**: 459–470
- Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL & Guerinot ML (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 10619–10624
- Jeong J & Guerinot ML (2009) Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 280–285
- Jin CW, Ye YQ & Zheng SJ (2014) An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Ann. Bot.* **113**: 7–18
- Jones AM & Wildermuth MC (2011) The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Has Three High-Affinity Iron-Scavenging Systems Functional under Iron Limitation Conditions but Dispensable for Pathogenesis. *J. Bacteriol.* **193**: 2767–2775
- Jones JDG & Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Kachroo A & Robin GP (2013) Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 527–533
- Kidd BN, Kadoo NY, Dombrecht B, Tekeoglu M, Gardiner DM, Thatcher LF, Aitken EAB, Schenk PM, Manners JM & Kazan K (2011) Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **24**: 733–748
- Kieu NP, Aznar A, Segond D, Rigault M, Simond-Côte E, Kunz C, Soulie M-C, Expert D & Dellagi A (2012) Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*: Plant iron deficiency and resistance to pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 816–827
- Kim SA [b1] (analytic), Punshon T [b1] (analytic), Lanzirrotti A [b2] (analytic), LIANGTAO LI [b3] (analytic), Alonso JM [b4] (analytic), Ecker JR [b5] (analytic),

Références

- Kaplan J [b3] (analytic) & Guerinot ML [b1] (analytic) (2006) Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1 (English). *Sci. Wash DC* **314**: 1295–1298
- Kim SA & Guerinot ML (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett.* **581**: 2273–2280
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301–307
- Kloepper J w. & Schroth MN (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In pp 879–882. France, Angers
- Kobayashi T, Nagasaka S, Senoura T, Itai RN, Nakanishi H & Nishizawa NK (2013) Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Commun.* **4**: 2792–2792
- Kobayashi T & Nishizawa NK (2012) Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 131–152
- Kobayashi T & Nishizawa NK (2014) Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **224**: 36–43
- Koen E (2012) Acteurs de l'homéostasie du fer : caractérisation fonctionnelle de la nicotianamine synthase et implications dans la résistance aux micro-organismes pathogènes.
- Koen E, Besson-Bard A, Duc C, Astier J, Gravot A, Richaud P, Lamotte O, Boucherez J, Gaymard F & Wendehenne D (2013a) Arabidopsis thaliana nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure. *Plant Sci.* **209**: 1–11
- Koen E, Lamotte O, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francès V, Jeandroz S & Wendehenne D (2013b) [Nitric oxide is a major player in plant immune system]. *Médecine Sci. MS* **29**: 309–316
- Koen E, Szymańska K, Klinguer A, Dobrowolska G, Besson-Bard A & Wendehenne D (2012) Nitric oxide and glutathione impact the expression of iron uptake- and iron transport-related genes as well as the content of metals in *A. thaliana* plants grown under iron deficiency. *Plant Signal. Behav.* **7**: 1246–1250
- Koen E, Trapet P, Brulé D, Kulik A, Klinguer A, Atauri-Miranda L, Meunier-Prest R, Boni G, Glauser G, Mauch-Mani B, Wendehenne D & BESSON-BARD A (2014) β -aminobutyric acid (BABA)-induced resistance in Arabidopsis thaliana: link with iron homeostasis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-05-14-0142-R> [Accessed July 31, 2014]
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Tanaka J, Kudo Y & Nagano T (1998) Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport* **9**: 3345–3348
- Kruger C, Berkowitz O, Stephan UW & Hell R (2002) A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* **277**: 25062–25069
- Kulik A, Noirot E, Grandperret V, Bourque S, Fromentin J, Salloignon P, Truntzer C, Dobrowolska G, Simon-Plas F & Wendehenne D (2014) Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. *Plant Cell Environ.*: n/a–n/a
- Kumar AS, Lakshmanan V, Caplan JL, Powell D, Czymmek KJ, Levia DF & Bais HP (2012)

Références

- Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **72**: 694–706
- Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, De Rycke R, Engler G, Stephan UW, Lange H, Kispal G, Lill R & Van Montagu M (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* **13**: 89–100
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB & Patrick JW (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environ.* **26**: 37–56
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI & Vasil ML (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7072–7077
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H & Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by *AtNRAMP3* and *AtNRAMP4* is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* **24**: 4041–4051
- Leeman M (1995) Induction of Systemic Resistance Against *Fusarium* Wilt of Radish by Lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **85**: 1021
- Lee S, Chiecko JC, Kim SA, Walker EL, Lee Y, Guerinot ML & An G (2009a) Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.* **150**: 786–800
- Lee S-W, Han S-W, Sririyanum M, Park C-J, Seo Y-S & Ronald PC (2009b) A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science* **326**: 850–853
- Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY & Zheng SJ (2014) Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in *Arabidopsis*: Abscisic acid alleviates iron deficiency. *Plant Cell Environ.* **37**: 852–863
- Lemanceau & Alabouvette (1991) Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Prot.*
- Lemanceau P, Bakker PA, De Kogel WJ, Alabouvette C & Schippers B (1993) Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 74–82
- Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM & Briat J-F (2009) Chapter 12 Role of Iron in Plant–Microbe Interactions. In *Advances in Botanical Research*, L.C. Van Loon (ed) pp 491–549. Academic Press Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229609510129> [Accessed June 26, 2014]
- Lemanceau P, Samson R & Alabouvette C (1988) Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie* **8**: 243–249
- Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, Potuschak T, Fink-Straube C, Blondet E, Genschik P & Bauer P (2011) Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1815–1829
- Ling H-Q, Bauer P, Bereczky Z, Keller B & Ganai M (2002) The tomato *fer* gene

Références

- encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 13938–13943
- Linsmaier EM & Skoog F (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **18**: 100–127
- Lin Y-F, Liang H-M, Yang S-Y, Boch A, Clemens S, Chen C-C, Wu J-F, Huang J-L & Yeh K-C (2009) Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytol.* **182**: 392–404
- Liu G, Greenshields DL, Sammynaiken R, Hirji RN, Selvaraj G & Wei Y (2007) Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *J. Cell Sci.* **120**: 596–605
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE & Benfey PN (2010) The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in Arabidopsis Roots. *Plant Cell Online* **22**: 2219–2236
- van Loon LC, Bakker PAHM, van der Heijdt WHW, Wendehenne D & Pugin A (2008) Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**: 1609–1621
- Loper JE & Henkels MD (1997) Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 99–105
- Lozano-Durán R, Macho AP, Boutrot F, Segonzac C, Somssich IE & Zipfel C (2013) The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* **2**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875382/> [Accessed July 4, 2015]
- Lozano-Durán R & Zipfel C (2015) Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* **20**: 12–19
- Lu C & Koppenol WH (2005) Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **10**: 732–738
- Luna E, van Hulten M, Zhang Y, Berkowitz O, López A, Pétriacq P, Sellwood MA, Chen B, Burrell M, van de Meene A, Pieterse CMJ, Flors V & Ton J (2014) Plant perception of β -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 450–456
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ & Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**: 399–403
- Maliandi MV, Busi MV, Turowski VR, Leaden L, Araya A & Gomez-Casati DF (2011) The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J.* **278**: 470–481
- Malinovsky FG, Batoux M, Schwessinger B, Youn JH, Stransfeld L, Win J, Kim S-K & Zipfel C (2014) Antagonistic Regulation of Growth and Immunity by the Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor HOMOLOG OF BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION2 INTERACTING WITH INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH11[W][OPEN]. *Plant Physiol.* **164**: 1443–1455
- Martin-Magniette M-L, Aubert J, Cabannes E & Daudin J-J (2005) Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **21**: 1995–2000
- Martin M, Colman MJR, Gómez-Casati DF, Lamattina L & Zabaleta EJ (2009) Nitric oxide accumulation is required to

Références

- protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient Arabidopsis plants. *FEBS Lett.* **583**: 542–548
- Maurer F, Müller S & Bauer P (2011) Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* **49**: 530–536
- Maurer F, Naranjo Arcos MA & Bauer P (2014) Responses of a Triple Mutant Defective in Three Iron Deficiency-Induced BASIC HELIX-LOOP-HELIX Genes of the Subgroup Ib(2) to Iron Deficiency and Salicylic Acid. *PLoS ONE* **9**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053374/> [Accessed July 18, 2014]
- Mazurier S, Corberand T, Lemanceau P & Raaijmakers JM (2009) Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to Fusarium wilt. *ISME J.* **3**: 977–991
- Mazurier S, Lemunier M, Siblot S, Mougél C & Lemanceau P (2004) Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 455–467
- Meilhoc E, Boscari A, Bruand C, Puppo A & Brouquisse R (2011) Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **181**: 573–581
- Meyer JM (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* **174**: 135–142
- Meyer J-M (2010) Pyoverdine Siderophores as Taxonomic and Phylogenetic Markers. In *Pseudomonas*, Ramos JL & Filloux A (eds) pp 201–233. Springer Netherlands Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-3909-5_7 [Accessed July 29, 2015]
- Meyer JM & Abdallah MA (1978) The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 319–328
- Meyer J-M, Geoffroy VA, Baysse C, Cornelis P, Barelmann I, Taraz K & Budzikiewicz H (2002) Siderophore-mediated iron uptake in fluorescent *Pseudomonas*: characterization of the pyoverdine-receptor binding site of three cross-reacting pyoverdines. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 179–183
- Meyer J-M, Gruffaz C, Tulkki T & Izard D (2007) Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2543–2556
- Meyer JM & Hornsperger JM (1978) Role of PyoverdinePf, the Iron-binding Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in Iron Transport. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 329–331
- Meziane H, VAN DER Sluis I, VAN Loon LC, Höfte M & Bakker PAHM (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 177–185
- Micallef SA, Shiaris MP & Colón-Carmona A (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.* **60**: 1729–1742
- Miethke M & Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **71**: 413–451
- Miethling R, Wieland G, Backhaus H & Tebbe CC (2000) Variation of Microbial Rhizosphere Communities in Response

Références

- to Crop Species, Soil Origin, and Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb. Ecol.*: 43
- Mita S, Murano N, Akaike M & Nakamura K (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* **11**: 841–851
- Mori S (1999) Iron acquisition by plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 250–253
- Mou Z, Fan W & Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944
- Mudgett MB (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 509–531
- Murgia I, Delledonne M & Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **30**: 521–528
- Mustafa AK, Gadalla MM & Snyder SH (2009) Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.* **2**: re2
- Mutka AM, Fawley S, Tsao T & Kunkel BN (2013) Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **74**: 746–754
- Nadal-Jimenez P, Koch G, Reis CR, Muntendam R, Raj H, Jeronimus-Stratingh CM, Cool RH & Quax WJ (2014) PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **196**: 2681–2690
- Nagata T, Oobo T & Aozasa O (2013) Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 686–690
- Nairz M, Haschka D, Demetz E & Weiss G (2014) Iron at the interface of immunity and infection. *Front. Pharmacol.* **5**: 152
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C & Zeier J (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–5141
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP & Jones JDG (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol. CB* **18**: 650–655
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O & Jones JDG (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436–439
- Neal A, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J (2012) Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas putida* to the Rhizosphere. *PLOS ONE* **7**:
- Nouet C, Motte P & Hanikenne M (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* **16**: 395–404
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H & Nishizawa NK (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* **286**: 5446–5454
- Oh E, Zhu J-Y & Wang Z-Y (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* **14**: 802–809

Références

- Olsen R.A., Clark R.B. & Bennett J.H. (1981) The enhancement of soil fertility by plant roots. *Am. Sci.*
- Palmer C & Gueriot M (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 333–340
- Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, Clemens S & Gueriot ML (2013) MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet.* **9**: e1003953
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S & Klessig DF (2007) Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* **318**: 113–116
- Peer R van (1991) Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* **81**: 728
- Peng Z, Han C, Yuan L, Zhang K, Huang H & Ren C (2011) Brassinosteroid enhances jasmonate-induced anthocyanin accumulation in Arabidopsis seedlings. *J. Integr. Plant Biol.* **53**: 632–640
- Petit JM, Briat JF & Lobréaux S (2001) Structure and differential expression of the four members of the Arabidopsis thaliana ferritin gene family. *Biochem. J.* **359**: 575–582
- Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G & Schmidt W (2001) Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* **213**: 967–976
- Pierson L s. I & Pierson E a. (2007) Roles of Diffusible Signals in Communication Among Plant-Associated Bacteria. *Phytopathology*
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S & Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 308–316
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM & Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**: 347–375
- Pieterse CM, van Wees SC, Hoffland E, van Pelt JA & van Loon LC (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225–1237
- Pieterse CM, van Wees SC, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ & van Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1571–1580
- Poole K & McKay GA (2003) Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **8**: d661–686
- Po-Wen C, Singh P & Zimmerli L (2013) Priming of the Arabidopsis pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 58–70
- 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
- Raaijmakers J m., Leeman M, Oorschot MMP van, Sluis I van der, Schippers B & Bakker P a. h. m. (1995) Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. USA*

Références

- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C & Moënne-Loccoz Y (2008) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321**: 341–361
- Ramirez L, Simontacchi M, Murgia I, Zabaleta E & Lamattina L (2011) Nitric oxide, nitrosyl iron complexes, ferritin and frataxin: a well equipped team to preserve plant iron homeostasis. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **181**: 582–592
- Ran LX, Li ZN, Wu GJ, Loon LC van & Bakker P a. HM (2005) Induction of Systemic Resistance Against Bacterial Wilt in Eucalyptus urophylla by Fluorescent Pseudomonas spp. *Eur. J. Plant Pathol.* **113**: 59–70
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat J-F, Gaymard F & Cellier F (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **57**: 400–412
- Raymond KN, Dertz EA & Kim SS (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 3584–3588
- Ren C, Han C, Peng W, Huang Y, Peng Z, Xiong X, Zhu Q, Gao B & Xie D (2009) A leaky mutation in DWARF4 reveals an antagonistic role of brassinosteroid in the inhibition of root growth by jasmonate in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **151**: 1412–1420
- Rezzonico F, Binder C, Défago G & Moënne-Loccoz Y (2005) The type III secretion system of biocontrol Pseudomonas fluorescens KD targets the phytopathogenic Chromista Pythium ultimum and promotes cucumber protection. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **18**: 991–1001
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL & Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694–697
- Roschzttardtz H, Séguéla-Arnaud M, Briat J-F, Vert G & Curie C (2011) The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* **23**: 2725–2737
- Samira R, Stallmann A, Massenbourg LN & Long TA (2013) Ironing out the issues: integrated approaches to understanding iron homeostasis in plants. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **210**: 250–259
- Santi S & Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytol.* **183**: 1072–1084
- Schalk IJ (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J. Inorg. Biochem.* **102**: 1159–1169
- Schalk IJ & Guillon L (2013a) Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **44**: 1267–1277
- Schalk IJ & Guillon L (2013b) Pyoverdine biosynthesis and secretion in Pseudomonas aeruginosa: implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* **15**: 1661–1673
- Schalk IJ, Hannauer M & Braud A (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**: 2844–2854
- Schalk IJ, Hennard C, Dugave C, Poole K, Abdallah MA & Pattus F (2001) Iron-free pyoverdin binds to its outer membrane receptor FpvA in

Références

- Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol. Microbiol.* **39**: 351–360
- Schopfer FJ, Baker PRS & Freeman BA (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* **28**: 646–654
- Schuler M & Bauer P (2011) Heavy Metals Need Assistance: The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the Arabidopsis NAS Gene Family. *Front. Plant Sci.* **2**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355620/> [Accessed June 8, 2015]
- Schuler M, Keller A, Backes C, Philippar K, Lenhof H-P & Bauer P (2011) Transcriptome analysis by GeneTrail revealed regulation of functional categories in response to alterations of iron homeostasis in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol.* **11**: 87
- Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, Abadía J & Bauer P (2012) Nicotianamine Functions in the Phloem-Based Transport of Iron to Sink Organs, in Pollen Development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis[C][W]. *Plant Cell* **24**: 2380–2400
- Segond D, Dellagi A, Lanquar V, Rigault M, Patrit O, Thomine S & Expert D (2009) NRAMP genes function in Arabidopsis thaliana resistance to Erwinia chrysanthemi infection. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **58**: 195–207
- Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin JW & Long TA (2015) Iron-Binding E3 Ligase Mediates Iron Response in Plants by Targeting Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Plant Physiol.* **167**: 273–286
- Shirley M, Avoscan L, Bernaud E, Vansuyt G & Lemanceau P (2011) Comparison of iron acquisition from Fe–pyoverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany* **89**: 731–735
- Siddiqui IA & Shahid Shaukat S (2003) Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biol. Biochem.* **35**: 1615–1623
- Sivitz AB, Hermand V, Curie C & Vert G (2012) Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS One* **7**: e44843
- Smith EE, Sims EH, Spencer DH, Kaul R & Olson MV (2005) Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 2138–2147
- Somers E, Vanderleyden J & Srinivasan M (2004) Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**: 205–240
- Song J, Durrant WE, Wang S, Yan S, Tan EH & Dong X (2011) DNA repair proteins are directly involved in regulation of gene expression during plant immune response. *Cell Host Microbe* **9**: 115–124
- Spence C & Bais H (2015) Role of plant growth regulators as chemical signals in plant-microbe interactions: a double edged sword. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 52–58
- Spoel SH & Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 89–100
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X & Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates

Références

- cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760–770
- Stacey MG, Koh S, Becker J & Stacey G (2002) AtOPT3, a member of the oligopeptide transporter family, is essential for embryo development in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 2799–2811
- Stamler JS, Singel DJ & Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898–1902
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang Z-Q, Wei C-C & Adak S (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* **279**: 36167–36170
- Sun J, Chen Q, Qi L, Jiang H, Li S, Xu Y, Liu F, Zhou W, Pan J, Li X, Palme K & Li C (2011) Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the Arabidopsis PIN2 protein. *New Phytol.* **191**: 360–375
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K & Li C (2009) Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* **21**: 1495–1511
- Sun T-P (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr. Biol. CB* **21**: R338–345
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J & Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952–956
- Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T & Ichinose Y (2010) The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J. Bacteriol.* **192**: 117–126
- Tarantino D, Morandini P, Ramirez L, Soave C & Murgia I (2011) Identification of an Arabidopsis mitoferrinlike carrier protein involved in Fe metabolism. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* **49**: 520–529
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M & Smeekens S (2005) Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. *Plant Physiol.* **139**: 1840–1852
- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD & Wink DA (2008) The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 18–31
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI & Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **34**: 685–695
- Ton J, Flors V & Mauch-Mani B (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **14**: 310–317
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Métraux J-P & Mauch-Mani B (2005) Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 987–999
- Ton J & Mauch-Mani B (2004) Beta-aminobutyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **38**: 119–130

Références

- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Francès V, Rosnoblet C, Besson-Bard A & Wendehenne D (2015) NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* **112**: 72–79
- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, Turnbull C & Grant M (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 1075–1080
- Turowski VR, Busi MV & Gomez-Casati DF (2012) Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant* **5**: 1001–1010
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moëne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F & Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* **4**: 356
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CMJ & Ton J (2009) Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytol.* **183**: 419–431
- Van der Ent S, Verhagen BWM, Van Doorn R, Bakker D, Verlaan MG, Pel MJC, Joosten RG, Proveniers MCG, Van Loon LC, Ton J & Pieterse CMJ (2008) MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **146**: 1293–1304
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD & Van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* **11**: 296–310
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria - Springer. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243–254
- Vansuyt G, Robin A, Briat J-F, Curie C & Lemanceau P (2007) Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**: 441–447
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC & Pieterse CMJ (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **17**: 895–908
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F & Curie C (2002) IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* **14**: 1223–1233
- Viollet A, Corberand T, Mougél C, Robin A, Lemanceau P & Mazurier S (2011) Fluorescent pseudomonads harboring type III secretion genes are enriched in the mycorrhizosphere of Medicago truncatula. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 457–467
- Visca P, Imperi F & Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30
- Vos IA, Pieterse CMJ & van Wees SCM (2013) Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathol.* **62**: 43–55
- Voulhoux R, Filloux A & Schalk IJ (2006) Pyoverdine-Mediated Iron Uptake in Pseudomonas aeruginosa: the Tat System Is Required for PvdN but Not for FpVA Transport. *J. Bacteriol.* **188**: 3317–3323
- Wang C, El-Shetehy M, Shine MB, Yu K, Navarre D, Wendehenne D, Kachroo A &

Références

- Kachroo P (2014a) Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Rep.* **7**: 348–355
- Wang D, Amornsiripanitch N & Dong X (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* **2**: e123
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH & Dong X (2007) Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Curr. Biol.* **17**: 1784–1790
- Wang H, Wang J, Jiang J, Chen S, Guan Z, Liao Y & Chen F (2014b) Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid Arabidopsis. *Sci. Rep.* **4**: 6781
- Wang S, Durrant WE, Song J, Spivey NW & Dong X (2010) Arabidopsis BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 22716–22721
- Waters BM, Chu H-H, Didonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE & Walker EL (2006) Mutations in Arabidopsis yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.* **141**: 1446–1458
- van Wees SC, Luijendijk M, Smoorenburg I, van Loon LC & Pieterse CM (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**: 537–549
- Wei G, Kloepper J w. & Tuzun S (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol. USA*
- Weller DM (2007) Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology* **97**: 250–256
- Wendehenne D, Gao Q, Kachroo A & Kachroo P (2014) Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**: 127–134
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF & Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**: 177–183
- Wild M, Davière J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P & Achard P (2012) The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**: 3307–3319
- Wintz H, Fox T, Wu Y-Y, Feng V, Chen W, Chang H-S, Zhu T & Vulpe C (2003) Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 47644–47653
- Wirth C, Meyer-Klaucke W, Pattus F & Cobessi D (2007) From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J. Mol. Biol.* **368**: 398–406
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V & Després C (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* **1**: 639–647
- Xia Y, Gao Q-M, Yu K, Lapchyk L, Navarre D, Hildebrand D, Kachroo A & Kachroo P (2009) An intact cuticle in distal tissues

Références

- is essential for the induction of systemic acquired resistance in plants. *Cell Host Microbe* **5**: 151–165
- Yang D-L, Yao J, Mei C-S, Tong X-H, Zeng L-J, Li Q, Xiao L-T, Sun T, Li J, Deng X-W, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z & He SY (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: E1192–1200
- Yang S & Hua J (2004) A haplotype-specific Resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1060–1071
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J & Speed TP (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* **30**: e15
- Yang YH & Thorne NP (2003) Normalization for two-color cDNA microarray data. In *Institute of Mathematical Statistics Lecture Notes - Monograph Series* pp 403–418. Beachwood, OH: Institute of Mathematical Statistics Available at: <http://projecteuclid.org/euclid.lnms/1215091155> [Accessed April 13, 2015]
- Yeterian E (2010) Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*.
- Yeterian E, Martin LW, Guillon L, Journet L, Lamont IL & Schalk IJ (2010a) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**: 1447–1459
- Yeterian E, Martin LW, Lamont IL & Schalk IJ (2010b) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**: 412–418
- Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D & Ling H-Q (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* **18**: 385–397
- Yu M, Lamattina L, Spoel SH & Loake GJ (2014) Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol.* **202**: 1142–1156
- Zamioudis C, Hanson J & Pieterse CMJ (2014) β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *New Phytol.* **204**: 368–379
- Zamioudis C & Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **25**: 139–150
- Zhang Y, Du B-H, Jin Z, Li Z, Song H & Ding Y-Q (2011) Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages. *Plant Soil*
- Zhang Y, Goritschnig S, Dong X & Li X (2003) A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell* **15**: 2636–2646
- Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y & He Z (2007) Dual Regulation Role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signaling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae Interaction. *Plant Physiol.* **145**: 450–464
- Zhu Y, Qian W & Hua J (2010) Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS Pathog.* **6**: e1000844

Références

Zimmerli L, Métraux J-P & Mauch-Mani B (2001) β -Aminobutyric Acid-Induced Protection of Arabidopsis against the Necrotrophic Fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **126**: 517–523

Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 414–420

Abstract

Siderophores are strong iron chelators produced by bacteria under iron deficiency conditions. In the present work, we studied the impact of the siderophore pyoverdine, produced by the plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* C7R12, on plant physiology from phenotypic to molecular effects with a specific focus on plant growth, immune response and iron homeostasis. Based on our analysis of the mode of action of the non-protein amino acid β -aminobutyric acid (BABA), a priming inducer in plants, we studied more specifically the functional link between iron homeostasis and plant immunity.

Under iron deficiency, *P. fluorescens* excretes the iron free form of pyoverdine (apo-pyo) in the soil. Once chelated with iron (ferri-pyo), the complex is internalized by the bacteria. We demonstrated that *Arabidopsis thaliana* plants treated by apo-pyo in a medium containing or not iron (Fe 25 or Fe 0) also internalize pyoverdine. Moreover, we observed that under iron deficiency, pyoverdine treated plants did not display the growth reduction induced by iron deficiency. In accordance with this phenotype, a microarray analysis revealed that the expression of genes related to growth and development was induced, as well as genes related to iron uptake and transport *in planta*. In contrast, the down regulation of the expression of genes related to defense was observed. Correspondingly, we demonstrated that the growth improvement induced by apo-pyo under iron deficiency depends on the expression of *IRT1* and *FRO2*, two major genes involved in iron uptake mechanisms. Of interest, the resistance to *Botrytis cinerea* conferred by iron deficiency was lost following apo-pyo treatment. The overexpression of the HB11 transcription factor, known to be involved in the growth-defense tradeoff, can be linked to the above observations. These apo-pyo effects were not observed after treatment of plants under sufficient iron conditions, indicating that in *A. thaliana* apo-pyo effects are dependent on the plant iron status.

In the same time, the analysis of the mode of action of BABA that potentiates plant defense responses demonstrated that BABA is a powerful iron chelator. BABA treatment in *A. thaliana* triggered a transient iron deficiency response. Based on this assessment, we assume that iron deficiency response and priming of defense may be connected. In accordance with this hypothesis, we showed that plants cultivated under iron deficiency and BABA treated plants both displayed resistance to *B. cinerea* and produced secondary metabolites associated to defense. Hence, the BABA priming effects on plant defense may be due to the induction of transient iron deficiency.

To conclude, this work draws first explications on pyoverdine effects on plant physiology and presents an original mode of action contributing to the priming effects of BABA. In a larger view, this work supports the recent concept of the existence of a cross-regulation between growth, immunity and iron homeostasis in plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdine, iron, growth, defense reactions, acid β -aminobutyric, nitric oxide

Résumé

Ce travail s'inscrit dans l'étude de l'incidence de sidérophores sur la physiologie de la plante. Il décrit plus précisément, à l'échelle phénotypique et moléculaire, l'impact de la pyoverdine produite par la souche bactérienne bénéfique *Pseudomonas fluorescens* C7R12 sur la croissance, la réponse immunitaire et l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*. Le lien fonctionnel entre immunité et homéostasie du fer a été abordé de façon plus spécifique via l'analyse du mode d'action de l'acide β -aminobutyrique (BABA), un potentialisateur des réponses de défense de la plante.

En conditions de fer limitantes, afin de pourvoir à la carence, *Pseudomonas fluorescens* libère la pyoverdine dans le sol sous sa forme non chélatée (apo-pyo). Le complexe fer-pyoverdine (ferri-pyo) est ensuite internalisé par la bactérie. Nous avons vérifié que l'apo-pyo est assimilée par des plantes d'*A. thaliana* cultivées dans un milieu contenant ou non du fer. De façon remarquable, l'apo-pyo restaure le phénotype de croissance des plantes carencées en fer. Une analyse transcriptomique a révélé que chez ces dernières, l'apo-pyo induit fortement l'expression de gènes associés à la croissance, l'import et la redistribution du fer *in planta*. En revanche, une répression de l'expression de gènes de défense s'opère. De façon concordante, l'effet promoteur de croissance de l'apo-pyo chez les plantes carencées est strictement dépendant de l'expression des gènes *IRT1* et *FRO2* codant deux protéines majeures de l'import de fer. De plus, une moindre résistance de ces plantes à *Botrytis cinerea* a été relevée. L'incidence négative de l'apo-pyo sur les défenses s'accompagne d'une surexpression du facteur de transcription HBI1 jouant un rôle clé dans la régulation de la balance croissance/défense. L'ensemble de ces événements n'a pas été observé chez les plantes cultivées dans un milieu enrichi en fer, démontrant que les effets de l'apo-pyo chez *A. thaliana* sont conditionnés par le statut en fer de la plante.

En parallèle, l'étude du mode d'action du BABA a indiqué que ce potentialisateur de l'immunité est un chélateur très efficace du fer. En conséquence, appliqué à des plantes d'*A. thaliana*, le BABA déclenche une carence en fer transitoire. Nous avons émis l'hypothèse que cette carence pourrait constituer un signal plaçant la plante en veille défensive. En accord avec cette assumption, les plantes carencées en fer présentent une résistance accrue à *B. cinerea* et produisent des métabolites secondaires associés aux défenses dont l'accumulation est également induite par le BABA. Ainsi, la carence en fer transitoire occasionnée par le BABA pourrait constituer l'une des composantes de son effet potentialisateur sur l'immunité.

En conclusion, ce travail apporte des premiers éléments explicatifs quant à l'incidence de la pyoverdine sur des traits physiologiques de la plante et rapporte un mode d'action original du BABA. Plus généralement, il renforce le concept encore naissant de l'existence de régulations croisées entre les voies de signalisation associées à la croissance, l'immunité et l'homéostasie du fer chez les plantes.

Mots-clés : *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdine, fer, croissance, réactions de défense, acide β -aminobutyrique, monoxyde d'azote