



HAL
open science

Réponses des cellules de *Nicotiana tabacum* à des molécules microbiennes : événements de signalisation précoce, influence de la dynamique membranaire et flux de sucres

Carole Pfister

► To cite this version:

Carole Pfister. Réponses des cellules de *Nicotiana tabacum* à des molécules microbiennes : événements de signalisation précoce, influence de la dynamique membranaire et flux de sucres. Biologie végétale. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK001 . tel-02446570

HAL Id: tel-02446570

<https://theses.hal.science/tel-02446570v1>

Submitted on 21 Jan 2020

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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT
UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

Préparée à l'UMR Agroécologie 1347 INRA, AgroSup, UBFC, CNRS Dijon

Ecole doctorale n°554
Environnements-Santé

Par

Carole PFISTER

Doctorat en Physiologie Végétale

Réponses des cellules de *Nicotiana tabacum* à des molécules microbiennes : évènements de signalisation précoce, influence de la dynamique membranaire et flux de sucres

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 19 Janvier 2018

Composition du Jury :

J. CHONG, Professeur, Université de Haute-Alsace, Colmar

P. THULEAU, Chargé de Recherche CNRS, LRSV, Toulouse

V. PUECH-PAGES, Maître de Conférences, Université P. Sabatier, Toulouse

D. WENDEHENNE, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

N. LEBORGNE-CASTEL, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

D. WIPF, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury Julie Chong, Patrice Thuleau, Virgine Puech et David Wendehenne d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail de thèse.

Je remercie également Stéphane Bourque, Pierre-Emmanuel Courty et Doan Luu pour leurs nombreux conseils lors des comités de thèse.

Ce manuscrit concrétise ma période au sein du pôle IPM de Dijon. Cependant, il ne reflète pas l'environnement humain dont j'ai bénéficié. Je profite donc de ces lignes pour remercier toutes les personnes qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie mes directeurs de thèse Nathalie et Daniel, pour les trois années passées à vos côtés, merci à vous deux pour vos conseils et votre aide qui m'ont permis d'évoluer. Un autre merci à Jérôme, Stéphane, Cécile, Arnaud, Odile, Annick, Christophe et Karim, Diederik qui m'ont guidé, aidé, et permis d'avancer dans mon projet.

Des pensées à toutes les belles rencontres que j'ai pu faire depuis mes débuts à l'INRA !

Les copains Emilie, Anne-so et Christophe, qui savent très bien ce que veut dire le mot thèse. Cette aventure n'aurait pas été la même sans vous, merci pour tous les bons moments qu'on a passé à Dijon ces 5 dernières années.

Je ne remercierai jamais assez toute ma Famille, et particulièrement mes parents, sans qui je ne serais sans doute pas arrivée jusqu'ici...vous avez toujours été là pour moi, merci de m'avoir aidé et supporté dans tous les sens du terme. Yann et Maëlle merci aussi à vous deux pour votre soutien.

Le meilleur pour la fin, merci à l'infini à Dorian, qui m'a suivi dans cette aventure et qui m'encourage et me soutient depuis de nombreuses belles années. Merci tout simplement d'être là !

Résumé

Réponses des cellules de *Nicotiana tabacum* à des molécules microbiennes : évènements de signalisation précoce, influence de la dynamique membranaire et flux de sucres

Dans son environnement la plante est confrontée à une variété de microorganismes bénéfiques, neutres et pathogènes, qui sont fortement dépendants des ressources carbonées qu'elle libère dans le sol. Le transport de sucres, processus clé de la physiologie de la plante, est essentiel pour les interactions plantes-microorganismes et leur devenir. Au cours de l'évolution, les plantes ont acquis des mécanismes leur permettant de percevoir les signaux microbiens du milieu extérieur, et aboutissant à la transduction d'un signal spécifique puis à des réponses biologiques adaptées (défense *versus* mutualisme) à la stratégie du microorganisme. Ces réponses assurent la survie et le développement des plantes. Mes travaux de thèse, menés avec un système « d'interaction » simplifié, contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au déterminisme des interactions plantes-microorganismes. Ce système a permis d'étudier, sur des suspensions cellulaires de *N. tabacum*, les réponses cellulaires précoces déclenchées suite à la perception de molécules microbiennes provenant de microorganismes à stratégie pathogène avirulent ou à stratégie mutualiste. Nous avons mesuré des évènements de signalisation et des flux de sucres induits en réponse à ces molécules microbiennes. Nos résultats ont mis en évidence que les chitotétracosaccharides (CO4), sécrétés par les champignons mycorhiziens à arbuscules dans les stades pré-symbiotiques de l'interaction, mobilisent les mêmes évènements de signalisation précoce (H_2O_2 dépendant de la protéine rbohD, Ca^{2+} cytosolique, activation de MAPK) que la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense ; mais avec des réponses différentes en terme d'intensité et de cinétique. Les CO4 et la cryptogéine ont par ailleurs montré des impacts distincts sur les flux de sucres et l'expression de transporteurs impliqués. En complément nous avons montré un effet de la modification de la dynamique membranaire associée à la clathrine sur des évènements de signalisation déclenchés par la cryptogéine, ainsi que dans les flux entrants de sucres et l'expression de gènes de transporteurs de sucres. Enfin, l'analyse *in silico* de l'interactome de transporteurs de sucres chez la plante modèle *A. thaliana*, nous a permis d'apporter des connaissances supplémentaires quant aux évènements de régulations des transporteurs de sucres et l'identification de protéines régulatrices putatives en interaction avec ces derniers. L'ensemble de ces travaux ouvrent la voie à de nouvelles recherches visant à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place des interactions entre plantes et microorganismes.

Mots-clés : interactions plantes-microorganismes, cryptogéine, chitotétracosaccharide, transport de sucres, trafic membranaire, *Nicotiana tabacum*

Abstract

Responses of *Nicotiana tabacum* cells to microbial molecule treatments: early signaling events, influence of membrane dynamics, and sugar fluxes

In their natural environment plants are in close interaction with beneficial, neutral, or pathogenic microbes, which are highly dependent on carbon resources exuded by plant roots. Sugar transport, which is a key process of plant physiology, is essential to support the fate of plant-microbe interactions. During evolution, plants have acquired the ability to perceive microbial molecules, initiating specific signal transduction cascades and leading to adapted response for microbe lifestyles (avirulent, virulent, or benefic). Plant survival will depend on the nature of the induced mechanisms. My PhD work, carried out on a simplified experimental system, contributes to the understanding of mechanisms underlying the determinism of plant-microbe interactions. We used *Nicotiana tabacum* cells in suspension exposed to microbial molecules derived from mutualistic or avirulent microbes. Using such a simplified system, we analyzed elements of the early signaling cascade and sugar fluxes. We have shown that CO₄, which is originating from AMF, initiate early signaling components (rbohD-dependent H₂O₂, cytosolic Ca²⁺, MAPK activation) as cryptogein, a defense elicitor, but with distinct profile and amplitude. Those two molecules (CO₄ and cryptogein) are responsible of different effects on sugar fluxes and the expression of the underlying sugar transporter genes. In addition, we presented an impact of the alteration of clathrin-mediated process on early signaling events triggered by cryptogein, as well as inward sugar fluxes and expression of sugar transporter genes. Finally, *in silico* analyses of sugar transporter interactome in *Arabidopsis thaliana* has provided some possible regulation mechanisms through the identification of new candidate proteins involved in sugar transporter regulation. These information open new perspectives towards a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in plant-microbe interactions.

Keywords: plant-microbe interactions, cryptogein, chitotetrasaccharide, sugar transport, membrane trafficking, *Nicotiana tabacum*.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Préface	3
ÉTAT DE L'ART	4
I. Les interactions plantes-microorganismes telluriques	5
1. Les interactions plantes-pathogènes	6
2. La symbiose mutualiste rhizobienne.....	6
3. La symbiose mutualiste mycorhizienne.....	7
3.1 La symbiose mycorhizienne à arbuscules	7
3.1.1 Généralités	7
3.1.2 Les différents stades de développement de la symbiose MA	8
3.1.3 Les échanges de nutriments	9
3.1.4 Les intérêts de la symbiose mutualiste MA.....	10
II. La perception des molécules microbiennes et signalisation chez les plantes.....	10
1. Le devenir de l'interaction : maladie <i>versus</i> défense.....	10
1.2 La reconnaissance des agents pathogènes	11
1.2.1 Les différents types de signaux de danger.....	11
1.2.2 La perception des signaux de danger.....	12
1.3 La transduction du signal.....	15
1.4 La mise en place des réponses de défense.....	16
2. Les interactions plantes-agents mutualistes.....	18
2.1 La communication entre les partenaires : les signaux pré-symbiotiques	18
2.1.1 Les « signaux végétaux » : les strigolactones (SL).....	18
2.1.2 Les « signaux fongiques » : myc-LCO et myc-CO	19
2.1.2.1 <i>Des facteurs Nod aux facteurs Myc</i>	19
2.1.2.2 <i>Les CMA produisent des myc-CO courts, en plus des myc-LCO</i>	20
2.2 La signalisation commune aux deux endosymbioses nécessaire à la mise en place de l'interaction symbiotique	22
2.2.1 Les récepteurs des facteurs Myc, des LysM-RLK ?.....	24
2.3 Les activités biologiques des myc-LCO et myc-CO	26
3. Les relations entre la signalisation mutualiste et la défense	27
III. Le transport de sucres chez les plantes.....	30
1. La synthèse et le transport des sucres chez les plantes	30
1.1 Le sucre, une molécule essentielle chez les plantes	30
1.2 Le transport à longue distance.....	31
1.2.1 Le chargement du saccharose dans le phloème	32

1.2.2 Le déchargement du phloème.....	33
2. Les transporteurs de sucres, acteurs moléculaires de l'allocation des sucres chez les plantes.....	35
2.1 Les transporteurs de sucres membres de la Major Facilitator Superfamily (MFS).....	35
2.1.1 La famille des SUCrose Transporters (SUT).....	36
2.1.2 La famille des MonoSaccharide Transporters (MST)	38
2.2 La famille des Sugars Will Eventually be Exported Transporters (SWEET)	39
3. La dynamique membranaire pour réguler les flux de sucres à l'échelle de la cellule.....	40
IV. Les sucres, un élément essentiel à l'interface biotrophe pour le devenir des IPM.....	44
1. La régulation des flux de sucres de la plante à l'interface plante/microorganisme pathogène.....	44
2. La régulation des flux de sucres de la plante à l'interface plante/champignon mycorhizien.....	47
V. Ma contribution à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires des IPM dans les stades précoces : pourquoi (mes objectifs) et comment (mes modèles d'étude).....	48

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....50

I. Matériels biologiques et traitements51

1. Cultures cellulaires et condition de culture.....51

2. Préparation des lignées cellulaires pour les différentes expériences.....51

3. Traitements des cultures cellulaires.....52

II. Méthodes53

1. Mesures d'évènements de signalisation cellulaire53

1.1 Mesure des variations de la concentration en calcium libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$).....53

1.2 Mesure de la production d' H_2O_2

1.3 Mesure du pH et de la conductivité extracellulaire

1.4 Extraction de protéines totales solubles

1.5 Activité kinase en gel

1.6 Immuno-détection des protéines.....55

1.7 Absorption de sucres radiomarqués dans les cellules de tabac.....55

1.8 Analyse de l'endocytose par internalisation de la sonde lipidique FM4-64 par microscopie confocale à balayage laser

1.9 Mesure de l'index mitotique.....56

1.10 Mesure de la mort cellulaire

2. Méthodes de Biologie Moléculaire57

2.1 Analyses *in silico* des gènes codant les transporteurs de sucres chez le tabac

2.2 Analyses phylogénétiques

2.3 Extraction des ARNs totaux et synthèse d'ADNc.....57

2.4 Analyse de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (qPCR).....58

3. Analyses statistiques.....59

4. Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez *A. thaliana* :.....60

4.1 Recherches *in silico* des protéines interagissant avec les transporteurs de sucres.....60

4.2 Construction du réseau d'interactions transporteurs de sucre – protéines membranaires.....	60
4.3 Cartes d'expression des gènes codant les transporteurs de sucre et protéines membranaires avec classification des données en k-moyennes (« k-means »)	61

CHAPITRE I : Étude comparative des évènements de signalisation et de transport de sucres en réponse à deux types de molécules microbiennes dans des cellules de tabac63

I. Avant-propos.....64

II. Article scientifique: « Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells »65

III. Informations et résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article « Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells ».....94

1. Identification et analyse *in silico* des transporteurs de sucres putatifs chez *N. tabacum* et étude de la régulation de ces transporteurs en réponse aux molécules microbiennes94

1.1 Identification de membres de la famille NtSUT.....94

1.2 Identification de membres de la famille NtSWEET.....95

1.3 Identification de membres de la famille NtMST.....95

2. Etude de la régulation de transporteurs de sucres putatifs chez *N. tabacum* en réponse aux molécules microbiennes.....97

3. Etude des évènements de signalisation en réponse aux LCO dans des cellules Xanthi.....98

3.1 Premiers tests avec un mélange LCOmix (lot 1).....98

3.2 Analyse des 4 formes isolées de LCO et du CO4 sur cellules Xanthi (lot 2).....99

3.3 Utilisation d'un troisième lot en LCO isolés et CO4 (lot 3).....100

IV. Conclusions.....103

CHAPITRE II : Étude détaillée de réponses cellulaires, suite à l'élicitation par la cryptogéine, dans des lignées de tabac perturbées dans le trafic membranaire104

I. Avant-propos.....105

II. L'expression d'une version tronquée de la CHC, le domaine Hub, réduit l'endocytose induite par la cryptogéine dans des cellules Xanthi107

1. Les transcrits du domaine Hub sont présents dans les cellules transgéniques Hub.....107

2. Analyse de l'endocytose

3. La cryptogéine stimule l'endocytose dans les cellules Xanthi

4. L'endocytose constitutive n'est pas inhibée dans les cellules exprimant le domaine Hub.....109

5. L'endocytose induite par la cryptogéine est réduite dans les cellules exprimant le domaine Hub .109

III. Les événements de signalisation cellulaires déclenchés par la cryptogéine sont-ils perturbés dans les lignées Hub ?110

1. Production d'H₂O₂ et flux ioniques dans les lignées Hub

2. L'expression du domaine Hub impacte négativement la mort cellulaire induite par la perception de la cryptogéine.....112

3. Activation des MAPK dans les lignées Hub

4. L'index mitotique n'est pas impacté par l'expression du domaine Hub	114
5. Analyse de l'expression de gènes liés à la défense et à l'induction de la mort cellulaire	114
5.1 La lignée Hub14.11 surexprime un grand nombre de gènes en réponse à la cryptogéine.....	115
5.2 La régulation négative du gène <i>NtHD2a/b</i> en réponse à la cryptogéine est plus exacerbée dans les cellules exprimant le Hub.....	116
IV. Impact de l'expression du domaine Hub sur la réponse des cellules à l'application de la cryptogéine, en termes de flux de sucres et d'expression des gènes associés	117
1. L'expression du domaine Hub impacte de façon différentielle les flux de sucres dans les cellules Xanthi	117
2. Modifications de l'expression des transporteurs de sucres chez les cellules exprimant le domaine Hub en réponse à la cryptogéine	119
2.1 Expression des gènes <i>NtSUT</i>	120
2.2 Expression des gènes <i>NtSWEET</i>	121
2.3 Expression de <i>NtMST1</i>	122
V. Conclusions	123

CHAPITRE III : Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez <i>A. thaliana</i>	125
I. Avant-propos	126
I. Recherches <i>in silico</i> des protéines interagissant avec les transporteurs de sucres à l'aide de la base de données MIND	128
II. Étude de la régulation de l'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres possédant un ou plusieurs interactants selon la base de données MIND	130
1. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de « l'organe » et « stade de développement » de la plante.....	130
2. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de la condition « stress abiotiques ».....	133
3. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de la condition « stress biotiques ».....	135
4. Régulation globale de l'expression des transporteurs de sucres.....	136
III. Visualisation de la topologie du réseau d'interactions transporteurs de sucres – protéines interactantes	138
IV. Les protéines interactantes des transporteurs de sucres : localisations et fonctions biologiques	139
V. Recherche de protéines régulatrices putatives des transporteurs de sucres	142
1. Une t-SNARE, candidate impliqué dans la régulation de l'activité des transporteurs de sucres ...	144
2. Une rbohD, candidate impliquée dans la régulation de l'activité des transporteurs de sucres.....	145
VI. Conclusions	150

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES	152
--	------------

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160
--	------------

ANNEXES	186
Annexe 1 : chapitre de livre en français intitulé Mécanismes cellulaires et moléculaires et ingénierie écologique des mycorhizes à arbuscules	187
Annexe 2 relative au chapitre III Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez <i>A. thaliana</i>	201
Annexe 3 relative au chapitre I, version publiée de l'article : « Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells ».....	219

Liste des abréviations

2- $\Delta\Delta Ct$	Expression relative	HAT	Histone Acetyl Transferase
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	HD2	Type 2 Histone Deacetylase
ARN	Acide RiboNucléique	HDAC	Histone Desacetylase
ATP	Adénosine TriPhosphate	HMGR1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Reductase 1
ATPase	ATP-synthase	INT	Inositol Transporter
Avr	Avirulence	INV	Invertase
BAK1	Brassinosteroid Associated Kinase 1	INV-C	Invertase Cytosolique
BIK1	Botrytis-Induced Kinase 1	INV-P	Invertase Pariétale
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	INV-V	Invertase Vacuolaire
BSA	Bovine Serum Albumin	IP	Propidium Iodide
[Ca ²⁺]	Concentration en calcium	IPM	Interaction Plante Microorganisme
[Ca ²⁺] _{cyt}	Concentration en calcium cytosolique	IPP	Interaction Protéine-Protéine
[Ca ²⁺] _{nuc}	Concentration en calcium nucléaire	ISR	Résistance Systémique Induite
CCaMK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase	qPCR	PCR Quantitative
CC	Coiled Coil	LCO	LipoChitoOligosaccharide
CDPK	Calcium-Dependent Protein Kinases	LPS	LipoPolySaccharides
CEBiP	Chitin Elicitor Binding Protein	LRR	Leucine-Rich Repeat
CERK1	Chitine Elicitor Receptor Kinase 1	LYK	LysM Receptor Kinase
CHC	Clathrin Heavy Chain	LysM	motif de lysine
CLC	Clathrin Light Chain	MA	Mycorhize à Arbuscules
CMA	Champignon Mycorhizien à Arbuscules	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
CME	Clathrin-Mediated Endocytosis	MAPKK	MAPK kinase
CNGC	Cyclic Nucleotide Gated Channel	MAPKKK	MAPKK kinase
CO	ChitoOligosaccharide	MBP	Myelin Basic Protein
CO4	Chitotétrasaccharide	mbSUS	mating-based Split Ubiquitin System
CSSP	Common Symbiotic Signaling Pathway	MFS	Major Facilitator Superfamily
Ct	Threshold Cycle	MIND	Membrane-based Interactions Network Database
DAMP	Damage-associated Molecular Patterns	MST	MonoSaccharide Transporter
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	MVB	Multi Vesicular Bodies
DMI	Does not Make Infections	NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
DMSO	DiMethyl SulfOxide	NAG	polymère de N-AcétylGlucosamine
DPI	DiPhenyl Iodonium	NB	Nucleotide-Binding
EFR	EF-Tu Receptor	NB-LRR	Nucleotide-Binding - Leucine-Rich Repeat
EF-Tu	Elongation Factor-Thermo unstable	NFP	Nod Factor Perception
EGF	Epidermal Growth Factor	NFR	Nod Factor Receptor
ELR	ELicitin Receptor	NSP	Nodulation Signaling Pathway
ERD6-like	Early Responsive to Dehydration	Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
ERF19	Ethylene Response Factor 19	O ₂ ^{•-}	Anion superoxide
ETI	Effector-Triggered Immunity	OG	OligoGalacturonides
ETS	Effector-Triggered Susceptibility	pGlcT/SGB1	Plastidic Glucose
FAO	Formes Actives de l'Oxygène	PAM	Transporter/Suppressor of G protein B1
FDA	Fluorescein DiAcetate	PAMP	Peri-Arbuscular Membrane Pathogen-Associated Molecular Patterns
Flg22	Flagelline 22	PAS	Peri-arbuscular Apoplastic Space
FLS2	Flagellin Sensing 2	PCR	Polymerase Chain Reaction
FM4-64	Fei Mao 4-64	PDI	Protein Disulfide-Isomerase
GFP	Green Fluorescence Protein	PK	Protein Kinase
Gènes R	Gènes de Résistance	PLT	PoLyol Transporter
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol	PPA	Pre-Penetration Apparatus
GSE	Germinating Spore Exsudates	PR (protéine)	Pathogenesis-Related protein
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène	PRR	Pattern Recognition Receptors
HIIS	Histone IIIS	PTI	PAMP-triggered immunity

RAM	Required for Arbuscular Mycorrhization	SPP	Saccharose-Phosphate Phosphatase
Rboh	Respiratory Burst Oxidase Homolog	SPS	Saccharose-Phosphate Synthase
RE	Réticulum Endoplasmique	STP	Sugar Transport Protein
RH	Réponse Hypersensible	SUC/SUT	Sucrose Transporter
RLK	Receptor-Like Kinase	SuS	Sucrose Synthase
RLP	Receptor-Like Protein	SWEET	Sugar Will Eventually be Exported Transporter
RLU	Relative Luminescence Unit	SYMRK	SYMBiosis Receptor-like Kinase
ROC	Root Organ Culture	TCA	TriChloroacetic Acid
RSA	Résistance Systémique Acquise	TMT	Tonoplast Monosaccharide Transporter
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate	TGN	Trans-Golgi Network
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis	UDP	Uridine diphosphate
SERK	Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase	VGT	Vacuolar Glucose Transporter
SIPK	Salicylic Acid-Induced Protein Kinase	VPE	Vacuolar Processing Enzymes
SL	Strigolactones	WAK	Wall-Associated Kinase
		WIPK	Wound-Induced Protein Kinase

Préface

Les plantes sont ancrées dans le sol par leurs racines. Cette immobilité leur confère une grande plasticité d'adaptation aux changements continus de leurs environnements aériens et souterrains, en intégrant des signaux multiples et variés tout au long de leur vie. Ces changements peuvent être abiotiques, imposés par des contraintes physiques de l'environnement (hydrique, thermique, chimique, carence en nutriments...), ou biotiques créés par d'autres organismes vivants (bactéries, virus, champignons, oomycètes, nématodes, insectes,...). Au cours de l'évolution, les plantes ont acquis des mécanismes leur permettant de percevoir les informations du milieu extérieur et de répondre à ses moindres modulations par une réponse biologique adaptée (en terme de temps et d'intensité) afin d'assurer leur reproduction et leur survie. Ces mécanismes reposent sur l'enchaînement de trois étapes essentielles : (1) la perception et la reconnaissance d'un signal par les cellules, (2) la transduction du signal *via* une cascade d'évènements de signalisation intracellulaires et (3) la mise en place de réponses biologiques appropriées. Dans le cas de contraintes biotiques, si ces mécanismes ne sont pas déclenchés, ou déclenchés trop tardivement, la plante ne pourra se protéger et sera sujette à la maladie ; il est à noter que ce cas reste assez rare.

Ces étapes se déroulant au niveau cellulaire et intracellulaire, l'utilisation de systèmes biologiques simplifiés a permis de décrypter et de comprendre un certain nombre d'évènements de signalisation cellulaires et les réponses biologiques qui en résultent.

Au-delà de leur importante plasticité, ce qui différencie les plantes d'autres groupes d'êtres vivants est qu'elles sont autotrophes pour le carbone. C'est-à-dire qu'elles ont la capacité de synthétiser leur propre matière organique *via* la fixation du carbone inorganique de l'air (CO₂) et de substances minérales du sol (eau, minéraux) grâce à la photosynthèse. La libération d'une partie des photosynthétats représente une source majeure de composés organiques pour la multiplication de microorganismes du sol hétérotrophes pour le carbone. Au sein de la biodiversité tellurique, les plantes doivent « sélectionner » des microorganismes avec qui elles peuvent établir des interactions bénéfiques (champignons mycorhiziens et bactéries fixatrices d'azote) où les deux partenaires tirent profit de cette interaction, tout en se protégeant des microorganismes pathogènes qui sont compétitifs pour les ressources carbonées au détriment des plantes. Cette sélection est intimement liée à la perception/reconnaissance de signaux microbiens, à la signalisation moléculaire et aux modifications intracellulaires qui s'en suivent.

Mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent l'orientation au long du continuum mutualisme-pathogénèse est un des défis majeurs pour aller vers une meilleure gestion des interactions plantes-microorganismes (IPM) en production végétale.

ÉTAT DE L'ART

I. Les interactions plantes-microorganismes telluriques

Les plantes sont exposées à une abondante variété de microorganismes telluriques avec lesquels elles peuvent établir différents types d'interactions. Ces interactions peuvent être plus généralement appelées *symbioses*, terme provenant du grec « syn » pour ensemble et « biosis » pour vie, signifiant littéralement « vivre ensemble ». La symbiose, telle que l'a définie originellement De Bary (1879) est une association étroite entre deux organismes d'espèces différentes qui ont évolué ensemble dans le but de tirer parti de ressources du partenaire en échange, ou non, de ses propres ressources. Ainsi, la symbiose inclue le mutualisme (bénéfices réciproques entre les deux partenaires), le commensalisme (un partenaire tire bénéfice de l'interaction, sans avantage ni inconvénient pour le deuxième partenaire) et le parasitisme (un partenaire vit au dépens de l'autre) pouvant évoluer, ou non, en pathogénèse. Il est à noter que, de nos jours, le mot *symbiose* est fréquemment assimilé au mutualisme. Les conséquences de ces interactions sont variables pour le développement et la croissance de la plante hôte, certaines étant bénéfiques, d'autres neutres ou encore délétères, comme par exemple le développement d'infections ou de maladies.

La colonisation des plantes hôtes par les microorganismes est particulièrement importante dans la zone du sol entourant les racines appelée *rhizosphère*, provenant du grec « rhiza » signifiant racine et « sphere/sphaera » signifiant cercle d'influence. Cette région environnant les racines est influencée à la fois par ces dernières, le sol et les microorganismes telluriques. Dans cet espace, les plantes vont libérer des composés carbonés organiques, dont les photosynthétats, regroupés sous le terme de rhizodépôts. Ces derniers sont composés d'exsudats racinaires de natures différentes (sucres, acides aminés, acides organiques, phytohormones, vitamines), de mucilages (polysaccharides, protéines) et de cellules ou tissus racinaires sénescents (Nguyen, 2003). Par le biais de ces exsudats racinaires, la plante attire des microorganismes telluriques. Elle « met à disposition » de ses partenaires potentiels, hétérotrophes vis-à-vis du carbone, des composés carbonés, et favorise ainsi le développement de microorganismes bénéfiques. Il est à noter que ces composés sont également « prélevés » par des microorganismes pathogènes. De manière assez surprenante la diversité microbienne est néanmoins plus faible au niveau de la rhizosphère que dans le sol qui n'est pas sous l'influence de la racine (García-Salamanca *et al.*, 2013). Ceci semble révéler la capacité des plantes à « recruter » des populations particulières de microorganismes. Ce recrutement résulte d'une communication entre les plantes et les microorganismes reposant sur des relations trophiques et une signalisation moléculaire *via* les composés contenus dans les rhizodépôts (Lareen *et al.*, 2016). La libération de photosynthétats dans le sol représente un coût énergétique pour la plante, car jusqu'à 17 % du carbone net fixé lors de la photosynthèse est perdu pour la plante car libéré dans le sol (Nguyen, 2003). Toutefois, la coévolution entre les plantes et les microorganismes bénéfiques a permis que ce coût énergétique investi par la plante ait pu être compensé par un bénéfice en retour de la part de certains microorganismes dits bénéfiques pour la plante. En effet, ces microorganismes (bactéries ou champignons) participent à l'amélioration de la croissance de la plante en lui fournissant des éléments minéraux souvent peu disponibles/accessibles dans le sol (van der Heijden *et al.*, 2008). L'interaction entre les plantes et les microorganismes est donc basée sur des échanges

trophiques impliquant des coûts et des bénéfices pour chaque partenaire (Morgan *et al.*, 2005). Cet équilibre fragile d'échanges trophiques contribue au maintien de l'interaction.

Comme mentionné précédemment, la libération des photosynthétats dans le sol attire également des microorganismes pathogènes, se développant au détriment de la plante. Les cellules des plantes, au cours de l'évolution ont mené un combat permanent afin d'essayer de détecter les signaux microbiens, et ainsi de discerner et de sélectionner, parmi la multitude de microorganismes, ceux qui sont bénéfiques de ceux qui sont pathogènes. Dans les deux cas, les microorganismes sont initialement « étiquetés » comme des envahisseurs pouvant déclencher des réactions de défense de la plante. Les microorganismes bénéfiques peuvent cependant contourner/modifier et atténuer ces défenses pour entrer en interaction avec la cellule hôte, par des processus qui sont encore mal connus (Zamioudis and Pieterse, 2012).

1. Les interactions plantes-pathogènes

Contrairement aux microorganismes bénéfiques, les organismes pathogènes se développent au détriment de l'hôte en surmontant les systèmes de défense de la plante (voir paragraphe II.2.1 La communication entre les partenaires : les signaux pré-symbiotiques). Ils représentent une large diversité d'organismes vivants qui ont la capacité d'induire des maladies. Comme introduit précédemment, étant principalement hétérotrophes vis-à-vis du carbone, ils sont classés en fonction de leur mode de vie et la capacité qu'ils ont à acquérir les nutriments de l'hôte. On retrouve donc trois classes d'agents pathogènes : (1) les nécrotrophes, qui vont détruire les cellules hôtes (formation de lésions nécrotiques) pour y puiser les ressources carbonées, via la sécrétion de toxines ou d'enzymes de dégradation de la paroi ; (2) les biotrophes, qui récupèrent ces ressources détournées des tissus vivants de l'hôte sans altérer l'intégrité cellulaire, et enfin (3) les hémibiotrophes, qui combinent les deux précédents modes de développement, en ayant séquentiellement un mode de vie biotrophe au début de leur cycle, puis nécrotrophe (Laluk and Mengiste, 2010).

2. La symbiose mutualiste rhizobienne

Une symbiose endo-racinaire particulièrement étudiée est celle impliquant les plantes et des bactéries fixatrices d'azote. Ces dernières sont capables d'assimiler de l'azote atmosphérique et de produire de l'ammonium qui va être transféré à la plante, améliorant ainsi sa nutrition azotée. C'est un bénéfice fort pour la plante car l'atmosphère est la plus grande source d'azote sur terre. Cette interaction mutualiste mène à la formation d'un nouvel organe racinaire, la nodosité, au sein duquel les bactéries fixent l'azote. Plusieurs symbioses fixatrices d'azote existent et sont classées en fonction des types de bactéries impliquées : les rhizobiums, ou rhizobia (genre *Rhizobium*), les *Frankia* et des cyanobactéries (*Nostoc*, *Anabaena* ; Santi *et al.*, 2013). A ce jour, la symbiose fixatrice d'azote la plus répandue est la symbiose légumineuse (*Fabaceae*)-*rhizobium*.

3. La symbiose mutualiste mycorhizienne

L'association symbiotique entre les racines et des microorganismes bénéfiques la plus répandue est la symbiose mycorhizienne qui concerne plus de 90 % des plantes terrestres (Smith and Read, 2008). Seules quelques familles de plantes ne forment pas cette symbiose comme les Brassicacées (par exemple l'arabette, le chou, le colza, etc.) et les Chénopodiacées (par exemple l'épinard, la betterave, etc.).

Le mot *mycorhize* définit une interaction entre des racines et des champignons (du grec « *mykós* » pour champignon et « *riza* » pour racine). On distingue deux grands types de mycorhizes :

- les ectomycorhizes où le champignon ne pénètre pas à l'intérieur des cellules racinaires. Les hyphes entourent les racines formant un manteau et se développent entre les cellules du cortex en formant le réseau de Hartig. Cette symbiose concerne 5 % des plantes terrestres dont des ligneux (résineux et *Rosopsida*) et implique des champignons appartenant aux phylums des Basidiomycètes et des Ascomycètes.
- les endomycorhizes où le champignon pénètre à l'intérieur des cellules racinaires. Il existe différents types d'endomycorhizes : (i) l'endomycorhize à pelotons ou orchidoïde impliquant des champignons Basidiomycètes en symbiose avec les orchidées, (ii) l'endomycorhize éricoïdes impliquant des champignons Basidiomycètes et Ascomycètes en symbiose avec un ordre de plantes dicotylédones, les Ericales (par exemple les myrtilles), (iii) l'endomycorhize de type arbutoïde ou ectendomycorhize qui se rencontre chez certaines Ericacées (par exemple l'arbousier) et implique des Basidiomycètes, enfin (iv) le dernier type d'endomycorhize la plus étudiée et la plus répandue est l'endomycorhize à arbuscules, ou mycorhize à arbuscules (MA). En effet, elle concerne environ 80 % des plantes terrestres (Smith and Read, 2008), dont la majorité des plantes cultivées, et implique les champignons appartenant au phylum des Glomérormycètes (Schüßler *et al.*, 2001). Cette symbiose mutualiste MA a fait l'objet de nombreux travaux, notamment au sein de notre pôle à Dijon (Gianinazzi *et al.*, 2010) et sera détaillée ci-après.

3.1 La symbiose mycorhizienne à arbuscules

3.1.1 Généralités

La symbiose MA est la plus ancienne, comme en atteste la découverte de fossiles de Glomérormycètes en association avec des plantes à l'Ordovicien (de -488 millions à -444 millions d'années ; Redecker *et al.*, 2000). La MA est d'ailleurs considérée comme ayant probablement joué un rôle essentiel dans la colonisation du milieu terrestre par les plantes.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont des biotrophes obligatoires, incapables de compléter leur cycle de vie en l'absence de la plante hôte. Les CMA sont retrouvés dans le sol sous forme de spores ou de mycélium. Comme ils sont contraints d'établir une interaction avec les racines de l'hôte pour assurer leur multiplication, ils ne présentent pas de grande spécificité d'hôte. Un même champignon peut coloniser différentes espèces de plantes et de même, une plante peut être colonisée par différentes espèces de CMA. Deux plantes voisines peuvent donc se retrouver connectées entre elles par un réseau mycélien commun, encore appelé « Food Wide Web » ou « Wood Wide Web » (Simard *et al.*, 2012).

Cette relation symbiotique se base principalement sur un échange bidirectionnel de nutriments entre les deux partenaires. La plante fournit au CMA des éléments carbonés issus de la photosynthèse (sucres) pouvant représenter jusqu'à 20 % du carbone fixé (Bago *et al.*, 2000). En retour, le CMA fournit à la plante de l'eau et des minéraux (phosphore, azote, soufre) souvent peu disponibles dans le sol. L'acquisition des nutriments du sol *via* les racines et les poils absorbants racinaires est donc complétée/amplifiée par les CMA associés aux racines de l'hôte. Ils forment, en effet, un réseau d'hyphes externes qui va permettre d'explorer un volume de sol jusqu'à 1000 fois plus important que celui de la racine seule, permettant d'avoir accès à des ressources supplémentaires (Smith and Read, 2008).

3.1.2 Les différents stades de développement de la symbiose MA

La mise en place de la symbiose MA se déroule en trois phases (Figure E.1). Un dialogue moléculaire s'installe dans la phase dite pré-symbiotique. Cette dernière est précédée par la phase asymbiotique où les spores de CMA peuvent germer spontanément et développer quelques hyphes sans la présence du partenaire végétal. Si la spore se trouve à proximité d'une racine, elle germe « réellement », les hyphes s'allongent et se ramifient de manière plus importante (Bécard *et al.*, 2004). Les phases pré-symbiotiques puis symbiotiques se mettent en place (Figure E.1).

- **la phase pré-symbiotique** débute lorsque le CMA perçoit la présence de la plante hôte, et va activer son métabolisme et sa croissance. Cette phase est caractérisée par des échanges de signaux diffusibles d'origines végétale et fongique sans contact physique entre les deux partenaires mais nécessaires pour la mise en place de la symbiose MA. Exsudées par les racines, les strigolactones (SL) vont stimuler le métabolisme du champignon, déclencher la germination des spores et la ramification des hyphes (Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006). Parallèlement, le partenaire fongique sécrète des molécules appelées facteurs-myc (Maillet *et al.*, 2011 ; Genre *et al.*, 2013). Ces facteurs Myc vont déclencher des réponses cellulaires et morphologiques (Genre *et al.*, 2005 ; Kosuta *et al.*, 2008 ; Chabaud *et al.*, 2011 ; Maillet *et al.*, 2011 ; Gutjahr and Parniske, 2013) jouant un rôle dans la « préparation » de la plante à la colonisation par le champignon. Cette phase prend fin lorsque les hyphes sont en contact avec la racine de la plante. La nature et le rôle de ces signaux symbiotiques seront abordés dans la partie II de ce même chapitre intitulée « Perception des molécules microbiennes et signalisation chez les plantes (voir paragraphe 2. Les interactions plante-symbiose mycorhizienne).

- **la phase symbiotique** débute quand les hyphes forment un hyphopode à la surface de l'épiderme qui constitue le point d'entrée du CMA vers les tissus internes de la racine. La plante met en place une nouvelle structure appelée appareil de pré-pénétration (PPA) qui correspond à un réarrangement du cytoplasme et du cytosquelette (Genre *et al.*, 2005 ; Genre *et al.*, 2008). Il forme un tunnel apoplasmique qui va guider la pénétration de l'hyphe à travers les différentes couches cellulaires jusqu'aux cellules du cortex. La formation du PPA est guidée par la migration du noyau dans la cellule. Une fois dans les cellules corticales,

l'hyphes se ramifie intensément et forme un arbuscule qui constitue le lieu d'échange des nutriments, et plus particulièrement dans l'espace péri-arbusculaire (PAS) qui sépare les membranes de la plante et celle du CMA (Figure E.1). Les arbuscules ont une durée de vie limitée d'environ 5-8 jours (Bonfante and Genre, 2010 ; Gutjahr and Parniske, 2013), et sont continuellement formés et dégénérés au cours de la symbiose. Les hyphes se retirent complètement de la cellule colonisée qui reprend son organisation naturelle. Plusieurs cellules de la racine sont colonisées de façon simultanée.

Un développement d'hyphes extracellulaires, dans le sol, va avoir lieu en parallèle de ceux qui se développent dans la racine. Ces hyphes permettent le prélèvement d'éléments minéraux et d'eau (comme expliqué précédemment), mais également la colonisation de nouvelles racines (de la même plante ou d'une plante voisine). De plus, ils peuvent aussi former une nouvelle génération de spores.

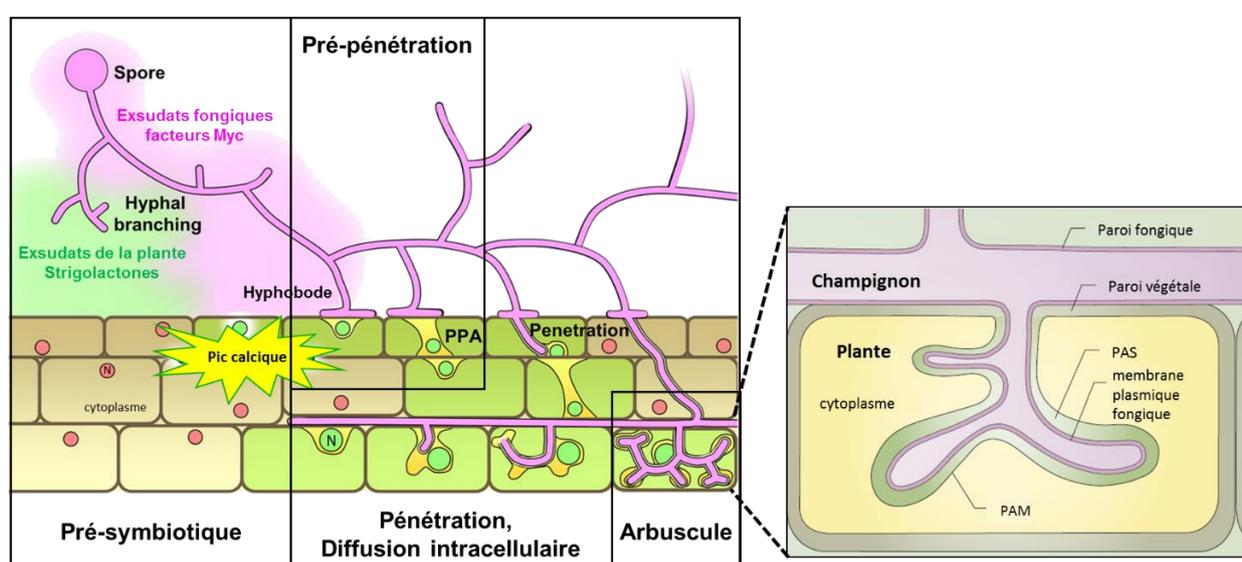


Figure E.1: Schéma des différentes étapes de la mise en place de la symbiose mutualiste MA formant un arbuscule dans une cellule racinaire corticale. Les signaux fongiques et végétaux échangés durant la phase pré-symbiotique permettent d'accroître le volume racinaire et fongique, augmentant ainsi les probabilités de contact et donc d'interaction entre les deux partenaires. Après le contact avec le partenaire végétal, les hyphes fongiques forment un hyphobode à la surface de la racine, lieu où le CMA va entrer dans la racine *via* la formation d'une nouvelle structure appelée appareil de pré-pénétration (PPA). L'hyphes pénètre dans ce PPA jusqu'aux cellules corticales où il se ramifie intensément et forme un arbuscule. C'est au niveau de cette structure que se font les échanges de nutriments entre la plante et le CMA, et plus particulièrement au niveau l'espace péri-arbusculaire (PAS) interface entre les membranes plasmiques des deux organismes. L'invagination fongique est entourée par une membrane péri-arbusculaire (PAM) issue de la membrane plasmique végétale. N : noyau. Adapté de Bonfante and Genre (2010) et de Parniske (2008).

3.1.3 Les échanges de nutriments

Les flux de nutriments et de photosynthétats entre les CMA et la plante hôte s'effectuent *via* des protéines membranaires spécifiques, appelées canaux et transporteurs, présents sur les membranes plasmiques de la plante et du CMA. Les principaux flux entrants et sortants de nutriments de l'hôte et du CMA, ainsi que les systèmes de transports et les mécanismes impliqués sont décrits dans le chapitre de livre intitulé « Mécanismes cellulaires et moléculaires et ingénierie écologique des mycorhizes à arbuscules » présenté en Annexe 1 (Drain, Pfister *et al.*, 2017).

3.1.4 Les intérêts de la symbiose mutualiste MA

La symbiose MA est essentielle pour le développement de la plante hôte à plusieurs niveaux. Au-delà de l'acquisition et l'amélioration de la nutrition minérale et hydrique de la plante grâce au partenaire fongique (Smith and Read, 2008), il est estimé qu'une plante en association avec un CMA va explorer un plus grand volume de sol qu'une plante seule avec ses propres racines. De plus elle apporte une amélioration de la tolérance des plantes aux stress abiotiques (sécheresse, salinité, polluants du sol types métaux lourds ; Al-Karaki, 2000 ; Hildebrandt *et al.*, 2002 ; Marulanda *et al.*, 2006 ; Aroca *et al.*, 2007), ainsi qu'une protection et une résistance contre les pathogènes racinaires et/ou aériens (Whipps, 2004 ; Hao *et al.*, 2012 ; Campos-Soriano *et al.*, 2012). Cette résistance pourrait être liée à une stimulation de ses réactions de défense, permettant une meilleure résistance de la plante contre de futures attaques par d'autres microorganismes pathogènes (Pieterse *et al.*, 2014). La MA n'a pas d'effet curatif mais préventif de la mise en place de la maladie.

II. La perception des molécules microbiennes et signalisation chez les plantes

Les plantes interagissent en permanence avec des microorganismes pathogènes et symbiotiques. La coévolution entre les microorganismes et les plantes a permis à ces dernières de discerner les microorganismes *via* la reconnaissance de molécules microbiennes (produites ou dérivées d'eux) par des récepteurs spécifiques de surface. Cette perception déclenche des événements de signalisation dans la cellule végétale permettant la transmission des signaux et la mise en place de réponses appropriées aux signaux perçus. La perception des signaux microbiens et/ou un contact physique constitue donc une étape cruciale qui détermine l'issue de l'interaction entre la plante et le microorganisme.

1. Le devenir de l'interaction : maladie *versus* défense

La coévolution des plantes avec les microorganismes pathogènes leur a permis de développer des stratégies de défense. En effet, les infections par ces microorganismes peuvent être dévastatrices lorsqu'elles touchent les plantes mais le développement de maladies reste cependant un phénomène peu fréquent, grâce à des mécanismes de défense élaborés par les plantes ayant pour but d'empêcher la pénétration, l'infection et/ou la multiplication de l'agent pathogène.

Une première ligne de défense des plantes est la présence de barrières constitutives physiques (cuticule, paroi pecto-cellulosique) et chimiques (production de composés antimicrobiens) qui empêchent ou retardent l'entrée et le développement du microorganisme dans la cellule végétale.

Cependant, lorsque des agents pathogènes contournent cette première ligne de défense, la plante peut : (i) ne pas être capable de percevoir l'agent pathogène, ou pas suffisamment tôt et elle n'active pas, ou trop tard, les réactions de défense. L'agent pathogène peut alors se développer, conduisant à l'apparition de la maladie :

on parle dans ce cas d'interaction *compatible*. La plante est dite sensible et l'agent pathogène virulent ; ou (ii) reconnaître rapidement l'agent pathogène et activer une deuxième ligne de réactions de défense lui permettant de bloquer la progression du pathogène voire de l'éliminer, mais également de se prémunir contre des attaques ultérieures par d'autres agresseurs : on parle d'interaction *incompatible* entre les deux partenaires. La plante est dite résistante et l'agent pathogène avirulent.

1.2 La reconnaissance des agents pathogènes

Chez les végétaux, il existe deux types de résistance induite : la résistance basale ou PTI (Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity) peu intense à large spectre, et la résistance spécifique plus forte appelée ETI (Effector-Triggered Immunity, Boller and Felix, 2009).

1.2.1 Les différents types de signaux de danger

La PTI, qui constitue le premier niveau d'induction de défense chez la plante, est déclenchée suite à la reconnaissance à la membrane plasmique de molécules de nature chimique variée : des oligosaccharides, des lipides, des peptides ou des (glyco)protéines (Boller and Felix, 2009 ; Newman *et al.*, 2013).

Ces molécules peuvent être sécrétées ou constitutives de l'organisme microbien (appelées également éliciteurs exogènes de réactions de défense) et sont regroupées sous les termes de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) lorsqu'ils dérivent des microorganismes pathogènes, ou plus généralement de MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns). Les MAMP sont essentiels pour les microorganismes et pour cette raison ils sont conservés à la fois chez les agents virulents et avirulents (Newman *et al.*, 2013). A titre d'exemples, on peut citer la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine (NAG), qui est un composant structural majeur de la paroi fongique (Felix *et al.*, 1993) ou la flagelline, une des sous-unités protéiques du flagelle, l'organe locomoteur des bactéries (Felix *et al.*, 1999). Pour ce dernier, c'est plus particulièrement un peptide de 22 acides aminés hautement conservé de la partie N-terminale de la flagelline (flg22) qui va éliciter des réactions de défense chez les plantes (Felix *et al.*, 1999). De même, la protéine EF-Tu (Elongation Factor-Thermo unstable), très abondante chez les bactéries et ayant un rôle essentiel dans la traduction des protéines, a une activité élicitrice attribuée à un peptide de 18 ou 26 acides aminés, appelé elf18 ou elf26, de la partie N-terminale de la protéine EF-Tu d'*Escherichia coli* (Kunze, 2004). Citons également les élicitines, petites protéines globulaires sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora* et de *Pythium*, oomycètes pathogènes du système racinaire (Panabières *et al.*, 1997). Ces protéines interviennent dans la captation de stérols de la membrane plasmique de cellules végétales et sont essentiels à la reproduction des oomycètes qui sont incapables d'en synthétiser (Hendrix, 1970). Ces élicitines sont désignées comme des PAMP (Du *et al.*, 2015).

Certains éliciteurs proviennent de la plante elle-même sous l'action de microorganismes (appelés éliciteurs endogènes) et sont regroupés sous le terme de DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns, Boller & Felix, 2009). Parmi les DAMP, l'exemple le plus connu sont les oligogalacturonides (OG), oligomères

d'acide galacturonique issus de la dégradation d'un composant majeur de la pectine des cellules végétales - l'homogalacturonane - par l'action de polygalacturonases (Ferrari *et al.*, 2013).

1.2.2 La perception des signaux de danger

Les éliciteurs exogènes et endogènes (MAMP/PAMP/DAMP) sont reconnus par des récepteurs situés sur la membrane plasmique des cellules végétales appelés récepteurs de motifs moléculaires ou PRR (Pattern Recognition Receptors ; Nürnberger and Brunner, 2002).

Les PRR appartiennent à deux familles : les récepteurs RLK (Receptor-Like Kinases) et les récepteurs RLP (Receptor-Like Proteins). Les deux familles de récepteurs possèdent un domaine extracellulaire et un domaine transmembranaire, mais diffèrent par leur domaine intracellulaire. Les RLK possèdent un domaine intracellulaire à activité protéine kinase permettant la transduction du signal qui n'est pas présent chez les RLP (Macho and Zipfel, 2014). Ces derniers doivent s'associer avec des récepteurs ayant une activité protéine kinase afin de pouvoir assurer la transduction du signal suite à la reconnaissance de l'éliciteur. Les principaux domaines extracellulaires conservés identifiés chez les PRR, permettant la liaison spécifique avec leur ligand, sont des motifs répétés de lysine (LysM), des répétitions de leucine (Leucine-Rich Repeat ; LRR), des motifs de lectine ou encore des domaines de type EGF-like (Epidermal Growth Factor, facteurs de croissance épidermique ; Figure E.2). Les OG sont reconnus par des récepteurs kinases associés à la paroi appelés WAK (Wall-Associated Kinases), qui sont des EGF-like-RLK (Brutus *et al.*, 2010).

Le paradigme du couple PRR/éliciteur le plus connu et le plus étudié est celui du récepteur FLS2 (Flagellin Sensing 2) d'*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) de la famille des LRR-RLK associé à la flg22 (Gómez-Gómez and Boller, 2002). La liaison de flg22 à FLS2 induit l'association entre le récepteur FLS2 et un autre LRR-RLK appelé BAK1 (Brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)-Associated receptor Kinase 1, Figure E.2) et également nommé SERK3 (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase). La dimérisation des deux récepteurs est essentielle à la transduction du signal déclenché par la perception de flg22 (Chinchilla *et al.*, 2007).

Un autre récepteur RLK contenant un domaine extracellulaire à motifs LysM, jouant un rôle central dans la reconnaissance de MAMP fongiques et bactériens, est CERK1 (Chitine Elicitor Receptor Kinase 1). Il permet la reconnaissance des oligosaccharides de chitine chez *A. thaliana* et le riz (*Oryza sativa*). Chez *A. thaliana*, CERK1 peut former un homodimère et percevoir lui-même la chitine (Liu *et al.*, 2012) mais un autre récepteur LysM-RLK, AtLYK5 possédant une très haute affinité pour la chitine, est nécessaire à la transduction du signal (Liu *et al.*, 2012 ; Shinya *et al.*, 2012 ; Cao *et al.*, 2014). Chez le riz, CERK1 nécessite, pour la reconnaissance de la chitine, une autre protéine LysM appelée OsCEBiP (Chitin Elicitor Binding Protein). CEBiP est la protéine de liaison à l'éliciteur mais ne possède pas de domaine protéine kinase intracellulaire (Shimizu *et al.*, 2010). Il a également été démontré que CERK1 intervient dans la reconnaissance d'un peptidoglycane (un autre éliciteur dérivé de chitines), un composant majeur des parois bactériennes. Chez *A.*

thaliana la perception de ce composant nécessite les récepteurs à domaines extracellulaires de type LysM, appelés LYM1 ou LYM3, et le récepteur CERK1 (Willmann *et al.*, 2011) (Figure E.2).

Un exemple bien étudié de PRR appartenant à la classe des RLP de type LRR, est LeEIX2 (Ethylene-Inducing Xylanase) impliqué dans la reconnaissance de l'éliciteur xylanase (EIX1) chez la tomate (Ron and Avni, 2004). Récemment, le récepteur ELR (ELicitin Receptor), également un LRR-RLP, a été découvert chez la pomme de terre sauvage *Solanum microdontum*. Sa liaison à des élicitines dont l'infestine (INF1) produite par l'oomycète *Phytophthora infestans* et la cryptogéine produite par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, a été mise en évidence (Du *et al.*, 2015). Ce récepteur ELR s'associe également avec deux co-récepteurs BAK1 et SOBIR 1, ce dernier étant un LLR-RLK avec un domaine protéine kinase cytoplasmique qui initie la signalisation cytoplasmique (Figure E.2 ; Chaparro-Garcia *et al.*, 2011 ; Du *et al.*, 2015 ; Peng *et al.*, 2015).

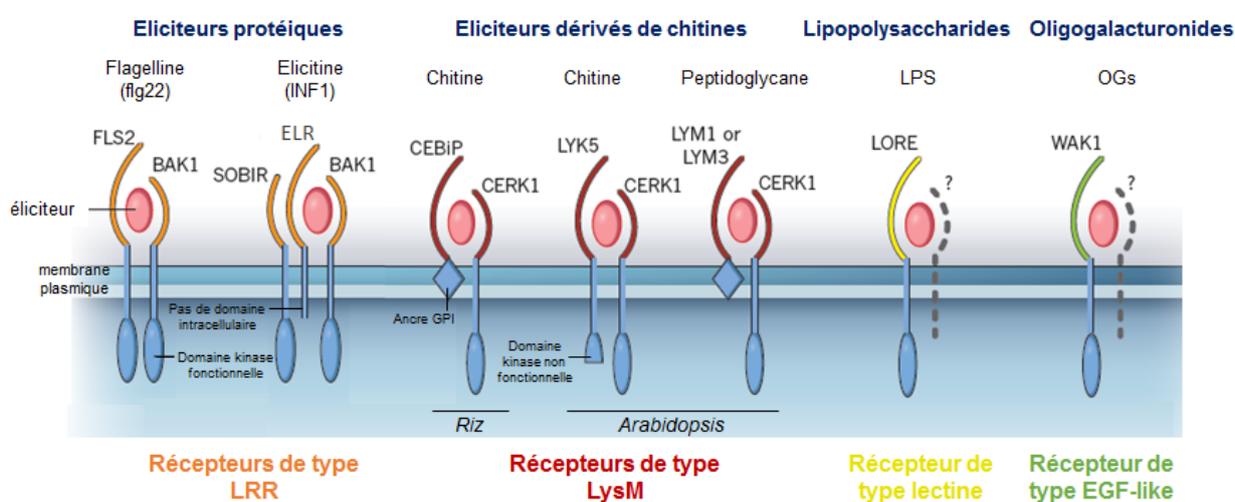


Figure E.2 : Schéma des principaux types de PRR impliqués dans la reconnaissance des signaux microbiens. En général, les éliciteurs protéiques (flg22, élicitines) sont perçus par des récepteurs avec un domaine extracellulaire de type LRR (en orange). Ces récepteurs peuvent s'associer avec un ou plusieurs co-récepteurs de type LRR (comme BAK1). Les éliciteurs constitués de polymères de NAG (chitine et peptidoglycane) sont généralement reconnus par des récepteurs avec un domaine extracellulaire de type LysM (en rouge). D'autres classes de récepteurs sont associés à la reconnaissance de lipopolysaccharides (LPS, récepteurs de type lectine en jaune) et des oligogalacturonides (OG) ayant un domaine extracellulaire de type EGF-like (en vert). Les complexes de récepteurs peuvent contenir des protéines avec au moins une kinase intracellulaire fonctionnelle (FLS2) ou non fonctionnelle (LYK5), ou bien des protéines avec un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire mais pas de domaine de signalisation intracellulaire (ELR), ou encore des protéines extracellulaires ancrées à la membrane par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) tels CEBiP, LYM1 et LYM3. Adapté de Zipfel and Oldroyd (2017).

Il est donc admis que la reconnaissance des éliciteurs par les PRR, souvent en complexe, engendre l'activation de voies de signalisation aboutissant à la première forme d'immunité, la PTI.

Cependant, certains agents pathogènes ont développé de nouvelles stratégies dans le but de contourner et d'inhiber la PTI *via* la production d'un large répertoire d'effecteurs (anciennement appelés facteurs d'avirulence nécessaires au processus infectieux) qui peuvent être extracellulaires ou libérés à l'intérieur de la cellule de l'hôte. Ces effecteurs peuvent agir en inactivant une protéine cible impliquée dans la PTI ou dans le contrôle des événements de signalisation de la plante (Jones and Dangl, 2006). Ils peuvent conduire au développement des agents pathogènes et au déclenchement de la maladie de l'hôte. On parle dans ce cas d'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Pour répondre à cette pression, la plante a acquis au cours de

l'évolution un autre système de défense basé sur la détection directe ou indirecte des effecteurs par des protéines de résistance (R ; DeYoung and Innes, 2006).

Il existe quatre différents types de protéines R, localisées dans le cytosol ou à la membrane plasmique (Figure E.3). La majorité des protéines R sont des protéines intracellulaires de type NB-LRR (Nucleotide-Binding-Leucine Rich Repeat). Le domaine NB autorise la liaison et l'hydrolyse de molécules d'ATP et permettrait, *via* des changements de conformation de la protéine R, l'activation de la transduction du signal nécessaire à la mise en place des réponses de défense. Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance du ligand. On retrouve deux types de NB-LRR qui varient dans leurs extrémités N-terminales : l'un comprenant un domaine TIR (Toll Interleukin-1 Receptor) et l'autre comprenant un domaine CC (Coiled-Coil) impliqués tous les deux dans les interactions entre protéines. On distingue donc les protéines de type TIR-NB-LRR et CC-NB-LRR qui reconnaissent leur ligand intracellulaire. Les deux autres types de protéines R correspondent à des RLK et RLP situés à la membrane plasmique permettant la reconnaissance d'effecteurs extracellulaires (van Ooijen *et al.*, 2007).

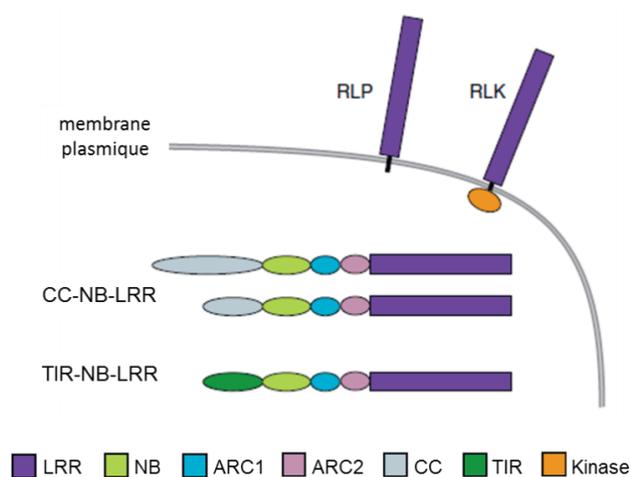


Figure E.3 : Représentation des différents types de protéines R.

La majorité des protéines R appartient aux types CC-NB-LRR et TIR-NB-LRR agissant dans la cellule. Ces protéines contiennent un domaine central commun aux deux types : NB-ARC composé d'un domaine NB et de deux domaines ARC (ARC1 et ARC2, nommés ainsi car retrouvés dans la protéine humaine APAF-1, les protéines R et la protéine CED-4 du nématode *Caenorhabditis elegans*). Le domaine NB-ARC est associé au domaine LRR. Les autres types de protéines R correspondent aux RLK et RLP situés à la membrane plasmique. Adapté de van Ooijen *et al* (2007).

La reconnaissance de ces effecteurs par les cellules végétales *via* des protéines R engendre un second niveau de défense de la plante appelé ETI (Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006). Cette résistance dite spécifique est basée selon le concept gène pour gène décrit par (Flor, 1942) selon lequel les plantes hôtes possèdent le gène R correspondant aux gènes d'avorulence (*Avr*) / d'effecteurs de l'agent pathogène. La reconnaissance du produit du gène *Avr*/effecteur par la protéine R initie l'activation de voies de signalisation cellulaire menant à la résistance de la plante. A l'inverse, l'absence ou l'altération d'un des deux gènes conduit au développement de la maladie.

Le modèle en zigzag proposé par Jones and Dangl (2006), permet de représenter les différentes stratégies mises en place par les plantes et les microorganismes pathogènes, souvent associées « à une course aux armements permanente », en tenant compte du caractère évolutif qui a lieu entre les deux acteurs (Figure E.4).

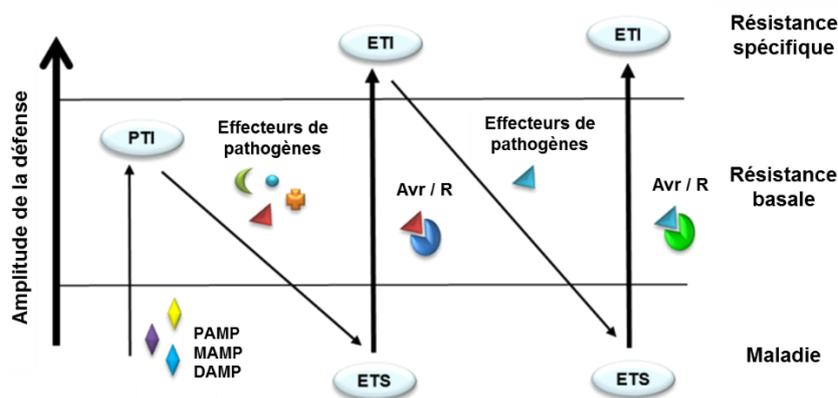


Figure E.4 : Le modèle en zig-zag illustre le système immunitaire des plantes. Dans une première phase, les plantes perçoivent des molécules microbiennes par des récepteurs membranaires PRR déclenchant la résistance basale appelée PTI. Dans une deuxième phase, certains agents pathogènes libèrent des effecteurs qui vont interférer avec la PTI et diminuer la défense ce qui aboutit à la sensibilité de l'hôte au pathogène appelée ETS. Dans une troisième phase, un effecteur de l'agent pathogène (rond rouge) est reconnu par des protéines R (Avr-R) déclenchant la résistance spécifique appelée ETI. Cette dernière est généralement plus intense que la PTI comme l'indique l'intensité des flèches. Dans une quatrième phase, les agents pathogènes peuvent contourner l'ETI en perdant les effecteurs reconnus par les protéines R, ou en acquérant de nouveaux (triangle bleu) capables de supprimer l'ETI. De nouvelles protéines R apparaissent au cours de l'évolution (rond vert) et peuvent reconnaître ces nouveaux effecteurs, entraînant à nouveau une ETI. Adapté de Jones and Dangl (2006).

1.3 La transduction du signal

Dans les deux cas de résistance (PTI et ETI), la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante va provoquer l'activation de cascades de signalisation cellulaire dans le but d'induire des réponses de défense. Les premiers événements de signalisation généralement observés suite à la perception d'un pathogène sont des flux d'ions (K^+ , Ca^{2+} , NO_3^- , Cl^-) à travers la membrane plasmique, mobilisant des transporteurs et des canaux cationiques/anioniques. Parmi ces flux d'ions, l'influx de calcium (Ca^{2+}), depuis le milieu extracellulaire et également un relargage à partir de certains organites intracellulaires, joue un rôle majeur de second messenger dans la transduction du signal, et est nécessaire à la mobilisation d'autres acteurs de signalisation. La reconnaissance d'un agent pathogène entraîne des augmentations de la concentration en Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]$) entre autres dans le cytoplasme ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) et/ou le noyau ($[Ca^{2+}]_{nuc}$), avec des caractéristiques spatio-temporelles particulières, appelées signature Ca^{2+} , qui déclenchent des réponses spécifiques en aval (Lecourieux *et al.*, 2006 ; Vadassery and Oelmüller, 2009).

Les ions Ca^{2+} agissent en amont d'autres acteurs de signalisation incluant notamment l'activation de certaines protéines kinases, dont les cascades de MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), qui chez l'ensemble des eucaryotes permettent la transmission de nombreux signaux extra- ou intracellulaires (Colcombet and Hirt, 2008). Ces cascades impliquent généralement des modules de trois protéines kinases fonctionnellement liées, une MAPK kinase kinase (MAPKKK), une MAPK kinase (MAPKK) et une MAPK. En réponse à un stimulus, la MAPKKK phosphoryle et ainsi active une MAPKK, qui à son tour phosphoryle une MAPK, ce qui l'active. Une fois la MAPK terminale activée, elle peut ensuite phosphoryler des protéines effectrices

spécifiques en aval (comme des facteurs de transcription), conduisant à l'activation des réponses cellulaires (Colcombet and Hirt, 2008). En réponse aux agents pathogènes, l'activation de cascades de MAPK joue un rôle important dans la signalisation associée aux défenses (Pitzschke *et al.*, 2009).

De plus, les ions Ca^{2+} opèrent en amont de la production précoce de formes actives de l'oxygène (FAO) observées dans les premières secondes après la perception d'un agent pathogène, appelée « burst oxydatif » (Lamb and Dixon, 1997). Les FAO sont des espèces moléculaires particulièrement instables. Par exemple la forme la plus stable est H_2O_2 (le peroxyde d'hydrogène), avec une demi-vie de 1 ms dans la cellule, et représente une molécule de signalisation agissant à l'intérieur de la cellule mais également à l'extérieur (Baxter *et al.*, 2014). L'amplitude et la durée de la production de FAO peuvent varier en fonction du type de reconnaissance de l'agent pathogène limitant son développement *via* leur activité antimicrobienne et en participant au renforcement des parois cellulaires par la formation de liaisons covalentes entre les protéines de la paroi (Bradley *et al.*, 1992 ; Mehdy, 1994). Les FAO seraient également impliquées dans la cascade de signalisation cellulaire contribuant à la mise en place d'une réponse hypersensible (RH ; Lamb and Dixon, 1997 ; Van Breusegem, 2006), caractérisée par le développement d'une zone de mort cellulaire autour du site d'infection (van Doorn *et al.*, 2011).

Parmi les sources enzymatiques de FAO, la famille des NADPH oxydases plasmalemmiques appelées rboh (respiratory burst oxidase homolog) est un des acteurs clés. Ces protéines catalysent la réduction de l' O_2 en $\text{O}_2^{\bullet-}$ (anion superoxyde) en utilisant le NADPH comme donneur d'électron. L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut être rapidement dismuté en H_2O_2 par une superoxyde dismutase. Les NADPH oxydases sont régulées par le Ca^{2+} soit directement par sa fixation sur des motifs de liaison au calcium (appelés EF hands) situés à l'extrémité C-terminale de la protéine, soit indirectement *via* des protéines kinase calcium dépendantes, les CPDK (Calcium-Dependent Protein Kinases ; Kobayashi *et al.*, 2007). Lors de l'élicitation par la cryptogéine, il a été montré également un rétrocontrôle positif du burst oxydatif sur l'influx de Ca^{2+} engendrant un deuxième pic participant à la signature Ca^{2+} de cet éliciteur (Lecourieux *et al.*, 2006).

En conclusion, l'ETI et la PTI partagent des mécanismes de signalisation communs qui sont cependant utilisés de manière différente. En effet, la PTI est plutôt associée à une réponse transitoire et plus faible alors que l'ETI est généralement plus intense, robuste et durable dans le temps et est souvent associée à une RH localisée au site d'infection du pathogène (Jones and Dangl, 2006 ; Tsuda and Katagiri, 2010).

1.4 La mise en place des réponses de défense

L'induction des défenses implique une reprogrammation rapide de l'expression de nombreux gènes de défense (terme désignant l'ensemble des gènes exprimés lors des réactions de défense). Cette modulation de l'expression génique est commune à la PTI et l'ETI (Tsuda and Katagiri, 2010). Elle permet le renforcement de la paroi tel que des dépôts de callose ou de lignine au niveau du site d'infection (Hückelhoven, 2007), la synthèse de protéines de la voie de biosynthèse de molécules ayant une activité antimicrobienne comme les

phytoalexines (Hammerschmidt, 1999) ou certaines protéines PR (Pathogenesis-Related, Tableau E.1). Ces dernières sont dotées d'activités enzymatiques variées telles que les glucanases, les chitinases qui dégradent la paroi des agents pathogènes (van Loon *et al.*, 2006). Bien que certaines protéines PR n'aient pas de fonction connue à ce jour, comme la protéine PR-1a, chez le tabac elle contribuerait au renforcement de la paroi et à la lutte contre le pathogène *Phytophthora parasitica* en contrôlant l'activité de glucanases extracellulaires (Rivière *et al.*, 2008).

Tableau E.1 : Les différentes familles de protéines PR chez les plantes où elles ont été mises en évidence avec la fonction associée à chaque famille. Extrait de Loon *et al.* (2006).

Famille	Membre de la famille	Propriétés
PR-1	PR-1a de tabac	Inconnue
PR-2	PR-2 de tabac	β -1,3-glucanase
PR-3	P, Q de tabac	Chitinase de types I, II, IV, V, VI, V I
PR-4	'R' de tabac	Chitinase de types I, II
PR-5	S de tabac	Thaumatine-like
PR-6	Inhibiteur I de tomate	Inhibiteur de protéinase
PR-7	P69 de tomate	Endoprotéinase
PR-8	Chitinase de concombre	Chitinase de type III
PR-9	« Lignin-forming peroxidase » de tabac	Peroxydase
PR-10	« PR1 » de persil	Ribonucléase-like
PR-11	« Class V » chitinase de tabac	Chitinase, type I
PR-12	Rs-AFP3 de radis	Défensine
PR-13	THI2.1 d'Arabidopsis	Thionine
PR-14	LTP4 d'orge	Protéine de transfert de lipides
PR-15	OxOa (germin) d'orge	Oxalate oxydase
PR-16	OxOLP d'orge	Oxalate-oxydase-like
PR-17	PRp27 de tabac	Inconnue

En plus de la reprogrammation de l'expression génique, la plante va également se défendre en déclenchant une RH (van Doorn *et al.*, 2011), qui se caractérise par une réaction nécrotique, c'est-à-dire par l'apparition de la mort des cellules et de lésions brunes au niveau du site d'infection (Heath, 2000). Cette RH empêche, en général, les agents pathogènes de se développer dans l'organisme, comme par exemple les pathogènes biotrophes et hémibiotrophes en les privant de nutriments.

Au-delà de la résistance au site d'infection, une résistance dite systémique se développant dans des tissus n'ayant pas été en contact avec le pathogène ou l'éliciteur peut se mettre en place. Cette résistance appelée RSA (Résistance Systémique Acquise) se met en place dans l'ensemble de la plante, la protégeant de futures attaques par des agents pathogènes pendant plusieurs semaines (Durrant and Dong, 2004).

2. Les interactions plantes-agents mutualistes

L'interaction entre la plante et les CMA va débiter par un dialogue moléculaire entre les deux partenaires leur permettant une reconnaissance mutuelle et préparant la plante hôte à accueillir son symbiote (voir paragraphe I.3.1 La symbiose mycorhizienne à arbuscules). Bien que les symbioses rhizobienne et MA diffèrent sur de nombreux points, les étapes précoces de ces interactions présentent certaines similitudes.

Les Gloméromycètes sont des biotrophes obligatoires avec une faible spécificité d'hôte, une génétique encore mal comprise et une transformation génétique stable impossible. Par contre, la possibilité de cultiver les bactéries *Rhizobium* et les connaissances sur leur génétique ont permis de progresser plus rapidement dans l'étude de cette symbiose rhizobienne par rapport à la symbiose MA. De plus, les analyses génétiques sur les légumineuses ont permis l'identification de nombreux éléments de la voie de signalisation déclenchée par les rhizobia, qui ont servi à la compréhension de la signalisation de la symbiose MA (Oldroyd, 2013).

2.1 La communication entre les partenaires : les signaux pré-symbiotiques

Au cours de l'interaction légumineuse-rhizobium, les rhizobia sécrètent des molécules appelées facteurs Nod en réponse aux flavonoïdes produits par la plante dans la rhizosphère (Roche *et al.*, 1991). Ces facteurs Nod sont des LipoChitoOligosaccharides (LCO), formés d'une suite de 4 unités de NAG liées par des liaisons β ,1-4. Ces molécules participent au dialogue moléculaire, première étape indispensable à l'initiation de la symbiose. La reconnaissance des facteurs Nod par la plante hôte va permettre la mise en place des étapes d'infection et d'organogénèse pour accueillir les bactéries dans la racine *via* le déclenchement d'une voie de signalisation permettant l'activation de gènes de nodulation entraînant la formation de nodosités dans les racines (Oldroyd *et al.*, 2011).

Tout comme dans la symbiose rhizobienne, les échanges de signaux sont essentiels pour l'établissement de la MA. Les signaux fongiques et végétaux échangés durant la phase pré-symbiotique permettent d'accroître le volume des racines mais également la germination et la ramification des hyphes fongiques, augmentant ainsi les chances de contact entre les deux partenaires et donc d'une interaction « opérationnelle ».

2.1.1 Les « signaux végétaux » : les strigolactones (SL)

Différents auteurs ont découvert la présence de molécules capables de stimuler la croissance et la ramification de CMA dans les exsudats racinaires de plantes mycorhizotrophes (Bécard and Piché, 1989 ; Giovannetti *et al.*, 1993 ; Giovannetti *et al.*, 1996 ; Nagahashi and Douds, 2004). Ceci souligne l'importance de signaux émis par la plante dans la mise en place de la MA. Par la suite, les travaux de Buee et collaborateurs (2000) et Nagahashi and Douds (2000) ont montré l'induction de ramifications intenses d'hyphes de CMA en réponse à une fraction purifiée d'exsudats de racines de carotte, similaire à celle mise en place lors de la présence d'une racine hôte. Ce test a permis d'isoler le facteur de ramification produit par les racines (Buee *et al.*, 2000) et de l'identifier par des travaux conjoints à partir de fractions d'exsudats de racines de sorgho (*Sorghum bilocor*) et du lotier (*Lotus japonicus* ; Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006). Il s'agit d'une

classe d'hormones, les SL, qui peuvent stimuler le métabolisme du champignon et provoquer une augmentation de son activité mitochondriale aboutissant à la ramification des hyphes de différents CMA (*Gigaspora margarita* et *G. gigantea*), mais aussi la germination des spores de *Rhizophagus irregularis* et de *Glomus mosseae* (Akiyama *et al.*, 2005 ; Besserer *et al.*, 2006 ; Besserer *et al.*, 2009). Ceci a été confirmé chez des mutants de pois (*Pisum sativum*), défectueux dans la production de SL, présentant un taux de colonisation plus faible par rapport aux plantes sauvages. De plus, l'ajout exogène du GR24, un analogue de synthèse des SL, a permis de restaurer le phénotype mycorhizien (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).

Au-delà de leur rôle dans l'interaction avec les CMA, les SL sont des molécules « signal » de la classe des « phytohormones » agissant à plusieurs niveaux dans la physiologie des plantes. Elles activent la germination de graines de plantes parasites (telles que les *Striga* ou les *Orobanche*) qui puisent dans les racines de plantes voisines les ressources nécessaires à leur croissance (Cook *et al.*, 1966). Elles contrôlent la ramification des tiges en inhibant le développement des bourgeons axillaires (Gomez-Roldan *et al.*, 2008 ; Umehara *et al.*, 2008) et aussi l'architecture des racines en réprimant la formation des racines latérales et la croissance de la racine primaire, tout en promouvant l'élongation des poils absorbants (Brewer *et al.*, 2013 ; Waldie *et al.*, 2014).

2.1.2 Les « signaux fongiques » : myc-LCO et myc-CO

2.1.2.1 Des facteurs Nod aux facteurs Myc

Des expériences utilisant une co-culture de *Medicago truncatula* et de CMA (*G. rosea*, *G. gigantea*, *G. margarita* et *R. irregularis*) séparés par une membrane perméable, ont démontré l'existence de signaux fongiques diffusibles perçus par la plante. Ces signaux fongiques élicitent l'expression du gène de nodulation *ENOD11* dans les racines de l'hôte, tandis que des agents pathogènes (*Phytophthora medicaginis*, *Phoma medicaginis* et *Fusarium solani*) n'induisent pas l'expression de ce gène (Kosuta *et al.*, 2003). D'autres auteurs ont montré des résultats analogues, où l'expression de gènes initialement identifiés dans la symbiose rhizobienne était induite dans les racines de la plante hôte en réponse à ces signaux diffusibles et/ou lors de la MA (Journet *et al.*, 2001 ; Chabaud *et al.*, 2002 ; Weidmann *et al.*, 2004).

En parallèle, ces signaux diffusibles, provenant du CMA *G. margarita*, sont capables de développer la formation de racines latérales de *M. truncatula*, tout comme les facteurs Nod. De façon plus surprenante, un traitement avec les facteurs Nod sur les racines de cette même plante hôte a montré que la colonisation racinaire par le CMA était augmentée (Oláh *et al.*, 2005).

D'autres études physiologiques ont dévoilé que ces signaux fongiques, ainsi que les CMA, pouvaient induire des variations périodiques de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et/ou de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$, connus sous le terme d'oscillations de la $[Ca^{2+}]$, dans les cellules végétales (Navazio *et al.*, 2007; Kosuta *et al.*, 2008; Chabaud *et al.*, 2011). Les oscillations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ induites par les exsudats fongiques sont équivalentes à celles observées dans les cellules racinaires sous les hyphopodes, le point de contact par l'hyphes du CMA (Chabaud *et al.*, 2011). Ces variations

de la $[Ca^{2+}]$ ont été également observées dans des racines *M. truncatula* lors de la symbiose rhizobienne (Miwa *et al.*, 2006 ; Kosuta *et al.*, 2008 ; Sieberer *et al.*, 2009 ; Chabaud *et al.*, 2011).

Enfin, l'utilisation de mutants de gènes impliqués dans la voie de signalisation Nod (détaillée plus bas), ayant perdu la capacité de pénétration des bactéries et de formation des nodosités racinaires, présentent aussi des « phénotypes mycorhiziens » tel un de la pénétration ou de colonisation de la plante hôte par le CMA (Catoira *et al.*, 2000 ; Kistner *et al.*, 2005). L'implication de ces gènes est donc essentielle à la mise en place des deux endosymbioses. De plus, les facteurs Nod bactériens ont une structure comprenant un squelette chitinique, alors que la chitine est un composant de la paroi fongique. Toutes ces observations ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la voie de signalisation Nod serait une adaptation plus récente (datant d'environ 65 millions d'années) de la voie de signalisation mycorhizienne beaucoup plus ancienne (environ 450 millions d'années), suggérant l'existence d'une voie symbiotique commune de signalisation (Oldroyd, 2013). A partir de tests ayant permis la caractérisation des facteurs Nod, Maillet et collaborateurs (2011) ont identifié la nature de ces signaux fongiques après purification de fractions d'exsudats mycorhiziens issus de cultures *in vitro* de racines de carotte mycorhizées par *R. irregularis* et de spores fongiques germées. Ils ont montré que le CMA *R. irregularis* produisait des LCO. Ces molécules sont constituées d'un tétramère (forme majoritaire) ou/et d'un pentamère (forme minoritaire) de NAG. Ils peuvent être sulfatés ou non sur le sucre réducteur, et portent sur la fonction amine du résidu NAG non réducteur un acide oléique (acide gras en C18) ou un acide palmitique (acide gras en C16) saturé ou non (Figure E.5). Ces molécules sont structurellement très proches des facteurs Nod et ont été appelées facteurs Myc.

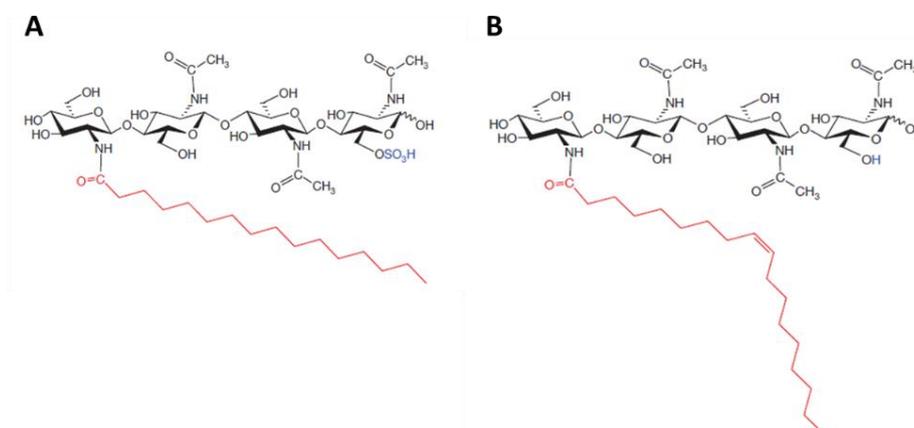


Figure E.5 : Structure chimique des myc-LCO majoritaires.

A. Structure d'un myc-LCO tétramérique sulfaté portant un acide palmitique saturé : LCO-IV(C16:0) **S.** **B.** Structure d'un myc-LCO tétramérique non sulfaté portant un acide oléique insaturé : LCO-IV (C18:1). Extrait de Maillet *et al.*, 2011.

2.1.2.2 Les CMA produisent des myc-CO courts, en plus des myc-LCO

Les travaux de Chabaud et collaborateurs (2011), utilisant des cultures de racines (root organ cultures ; ROC) de *M. truncatula* et de carotte exprimant une sonde spécifique du Ca^{2+} libre dans le noyau, ont montré que les exsudats de spores germées (GSE, Germinating Spore Exsudates) provenant du CMA *G. margarita* déclenchaient des oscillations de la $[Ca^{2+}]$ non régulières comparées à celles induites par les facteurs Nod (Sieberer *et al.*, 2009). Auparavant, il avait déjà été rapporté que les facteurs Nod et les CMA déclenchaient

des signatures Ca^{2+} cytosoliques différentes dans les cellules rhizodermiques de *M. truncatula* (Kosuta *et al.*, 2008). Les ROC représentent des systèmes simplifiés particulièrement intéressants car ils peuvent être colonisés par des CMA (Boisson-Dernier *et al.*, 2001), mais ne peuvent pas s'associer avec les rhizobiums (Akashi *et al.*, 2003), ni déclencher d'oscillations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ après contact avec les rhizobiums (Chabaud *et al.*, 2011), suggérant l'implication de molécules « signal » différentes entre les deux symbioses.

En utilisant ce système de culture simplifié, Genre et collaborateurs (2013) ont montré, comme initialement exposé par Chabaud et collaborateurs (2011), l'induction de réponses Ca^{2+} irrégulières en réponse à des GSE de différents CMA (*G. margarita*, *G. rosea* et *R. irregularis*) alors que les GSE du pathogène biotrophe *Colletotrichum trifolii* étaient incapables de déclencher des réponses Ca^{2+} . Ils se sont interrogés sur la nature chitinique du signal, qui s'est révélée positive, puisqu'un pré-traitement par des chitinases des GSE de *G. margarita* a supprimé les oscillations de la $[\text{Ca}^{2+}]$ initialement déclenchées par le CMA. De plus, un mélange de CO (ChitoOligosaccharides) commerciaux de tailles variables (CO4 à 6) a montré l'induction de réponses Ca^{2+} analogues à celles déclenchées par le traitement de GSE des CMA. Un traitement individuel de CO commerciaux (CO3, 4, 5, 6 et 8) sur les cellules épidermiques a révélé que les CO courts (CO4 et CO5) étaient les plus actifs, alors que les CO à chaînes longues, comme le CO8, connu comme étant un éliciteur chitinique de réactions de défense (Shimizu *et al.*, 2010; Hayafune *et al.*, 2014), n'induisent pas d'oscillations de la $[\text{Ca}^{2+}]$.

Après avoir étudié la composition des GSE, les auteurs ont démontré que les CMA produisaient en plus des LCO (Maillet *et al.*, 2011) des chaînes courtes de chitines, les CO4 et CO5 (Figure E.6) étant majoritaires (Genre *et al.*, 2013). Ces derniers induisent les plus fortes réponses Ca^{2+} dans les cellules épidermiques de *M. truncatula* et de carotte, analogues à celles induites par les CMA. Cependant, ces oscillations possèdent des variations dans la période et sont de plus faibles amplitudes que celles induites par les facteurs Nod (Kosuta *et al.*, 2008 ; Chabaud *et al.*, 2011 ; Genre *et al.*, 2013). En complément, une augmentation importante de la concentration en CO4 et CO5 dans les GSE a été observée lorsque des spores de *R. irregularis* ont été traitées avec le GR24 (Genre *et al.*, 2013).

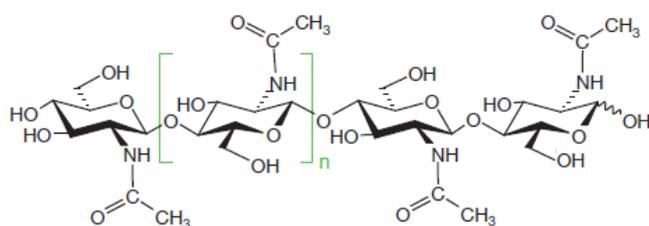


Figure E.6 : Structure chimique des myc-CO courts. $n = 1$ ou 2 . Modifié de Maillet *et al.*, 2011.

L'ensemble de ces travaux démontrent que les CMA produisent donc des molécules chitiniques appelées myc-LCO et myc-CO à chaînes courtes, mais l'existence d'autres facteurs myc n'est toutefois pas à exclure.

2.2 La signalisation commune aux deux endosymbioses nécessaire à la mise en place de l'interaction symbiotique

Des études de génétique inverse chez les légumineuses *M. truncatula* et *L. japonicus* ont permis l'identification de différents gènes impliqués dans la perception et la transduction du signal des facteurs Nod (Catoira *et al.*, 2000). Plusieurs de ces gènes sont également essentiels à l'établissement de la symbiose MA, montrant l'existence d'une voie de signalisation symbiotique commune aux deux symbioses (CSSP, Common Symbiotic Signaling Pathway ; Catoira *et al.*, 2000 ; Kistner *et al.*, 2005 ; Parniske, 2008).

Dans un premier temps, je présenterai les composants de la signalisation lors de la symbiose rhizobienne, afin d'effectuer un parallèle avec les connaissances actuelles de celle impliquée dans la MA.

Les composants de la voie de signalisation déclenchée par les facteurs Nod comprennent premièrement des récepteurs kinases situés à la membrane plasmique qui perçoivent les facteurs Nod (Figure E.7). Ces récepteurs sont de type LysM-RLK nommés chez *L. japonicus* NFR1 (Nod Factor Receptor 1) et NFR5 (sans domaine protéine kinase intracellulaire fonctionnel). Leurs équivalents chez *M. truncatula* sont nommés LYK3 (LysM Receptor Kinase 3) et NFP (Nod Factor Perception ; Amor *et al.*, 2003 ; Madsen *et al.*, 2003 ; Smit *et al.*, 2007 ; Radutoiu *et al.*, 2007). Ces récepteurs fonctionnent en complexe avec un récepteur de type LRR-RLK, appelé chez *L. japonicus* SYMRK (SYMBiosis Receptor-like Kinase ; Stracke *et al.*, 2002) et chez *M. truncatula*, DMI2 (Doesn't Make Infection 2 ; Endre *et al.*, 2002). Le domaine cytoplasmique de SYMRK se lie à l'enzyme HMGR1 (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Reductase 1) activant la synthèse du mévalonate dans le cytosol (Kevei *et al.*, 2007). Le mévalonate a une fonction de second messenger vers le noyau et semble diffuser à travers les pores nucléaires (Venkateshwaran *et al.*, 2015). Il participerait à l'activation (directe ou indirecte) des canaux potassiques (Kevei *et al.*, 2007 ; Venkateshwaran *et al.*, 2015). En aval des récepteurs, la signalisation intracellulaire repose sur l'activation d'oscillations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$, mettant en jeu différentes protéines situées sur l'enveloppe nucléaire (Figure E.7) : (1) des nucléoporines (NUP85, NUP133, et NENA uniquement caractérisées chez *L. japonicus*, non représentées sur la Figure E.7 ; Kanamori *et al.*, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2007 ; Groth *et al.*, 2010) même si leur rôle dans la transduction du signal et leur connexion fonctionnelle avec les autres protéines de la CSSP est incertain, (2) des canaux potassiques MtDMI1 (Ané *et al.*, 2004) ou LjCASTOR/LjPOLLUX (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005 ; Miwa *et al.*, 2006) fonctionnant en tandem avec (3) des canaux perméables au calcium récemment identifiés chez *M. truncatula*, CNGC15 (Cyclic Nucleotide Gated Channels 15 a, b et c ; Charpentier *et al.*, 2016) et enfin (4) une pompe Ca^{2+} ATPase-MCA8 (Cao *et al.*, 2011) qui jouerait un rôle dans le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} au niveau du nucléoplasme.

Au niveau du noyau, un module de décodage des oscillations de la $[Ca^{2+}]$ fait intervenir une protéine kinase activée par le calcium et la calmoduline, LjCCaMK (Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase) /MtDMI3 (Lévy *et al.*, 2004 ; Mitra *et al.*, 2004 ; Tirichine *et al.*, 2006). L'activation de la CCaMK va permettre la phosphorylation de la protéine LjCYCLOPS/MtIPD3 (Messinese *et al.*, 2007 ; Yano *et al.*, 2008), qui est un activateur transcriptionnel permettant la régulation de l'expression des gènes symbiotiques (Figure

E.7). CYCLOPS peut également réguler l'expression de gènes de symbiose en formant un complexe avec des facteurs de transcriptions tels que NSP1, NSP2 (Nodulation Signalling Pathway ; Kaló *et al.*, 2005 ; Smit *et al.*, 2005) ou DELLA (Jin *et al.*, 2016).

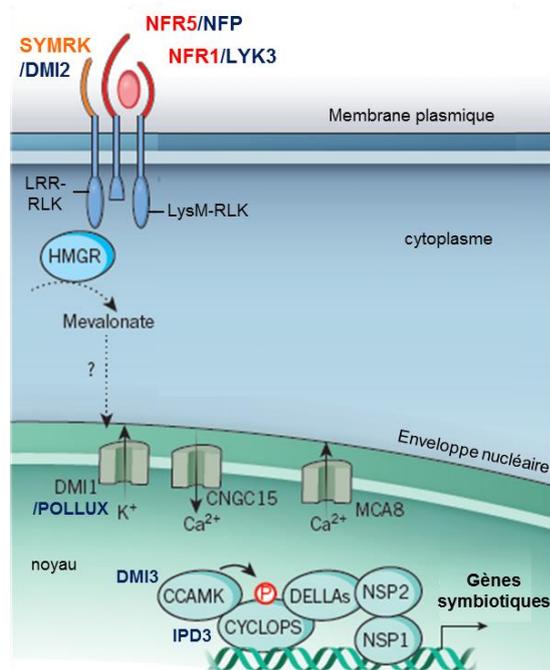


Figure E.7 : Cascade de signalisation cellulaire déclenchée par les facteurs Nod.

La perception des facteurs Nod à la membrane plasmique fait intervenir des récepteurs de type LysM-RLK (*NFR1* et *NFR5* chez *L. japonicus* et leurs orthologues *LYK3* et *NFP* chez *M. truncatula*), qui forment un complexe avec *LjSYM/RK/MtDMI2*. Le domaine protéine kinase de cette protéine interagit avec HMGR pour la synthèse de mévalonate qui va jouer un rôle de second messager dans la cascade de signalisation. La perception des facteurs Nod induit rapidement une réponse Ca^{2+} dans le noyau. Un ensemble de protéines positionnées en amont de ce signal Ca^{2+} sont nécessaires à sa formation. Une protéine kinase dépendante du calcium et d'une calmoduline *LjCCaMK/MtDMI3* contribue au décodage du signal Ca^{2+} et *LjCYCLOPS/MtIPD3* peut réguler l'expression de gènes de la symbiose directement ou interagir avec les facteurs de transcription DELLA, NSP1 et NSP2. Les gènes retrouvés chez *M. truncatula* sont représentés en bleu. Adapté de Zipfel & Oldroyd (2017).

La plupart des gènes impliqués dans la CSSP en réponse aux facteurs Nod sont essentiels dans l'établissement de la symbiose MA. Les facteurs Myc sont perçus *via* la voie CSSP qui comprend sans doute un ou plusieurs récepteurs candidats de la famille des LysM-RLK (partie détaillée plus bas), en plus du récepteur LRR-RLK membranaire SYMRK qui possède la même fonction que dans la signalisation Nod. La transduction du signal est relayée également par les protéines de l'enveloppe nucléaire et du noyau. Les oscillations $[Ca^{2+}]_{nuc}$ ou en périphérie du noyau sont induites très précocement en présence des deux endosymbiotes ayant un rôle important dans la transduction du signal symbiotique. Différents auteurs ont suggéré que la différence de périodicité et d'amplitude des oscillations pourraient permettre de discriminer les signaux CMA de ceux des rhizobia (Kosuta *et al.*, 2008 ; Genre *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2015). La CCaMK est un régulateur clé dans la symbiose MA ou rhizobienne *via* le décodage des oscillations de la $[Ca^{2+}]$ induites par les deux symbiotes. Toutefois, la fixation de la calmoduline à CCaMK n'est pas nécessaire à son activité lors de la MA mais essentielle pour la symbiose rhizobienne, suggérant que la CCaMK peut être activée de manière différente durant la perception des signaux mycorhiziens ou rhizobiens (Shimoda *et al.*, 2012).

CYCLOPS une fois phosphorylée peut interagir avec d'autres protéines et réguler l'expression de gènes impliqués dans la symbiose. A ce jour, peu de gènes impliqués dans la voie de transduction spécifique du signal mycorhizien sont connus. Gobbato et collaborateurs (2012) ont identifié un facteur de transcription spécifique de la mycorhization appelé RAM1 (Required for Arbuscular Mycorrhization 1) qui, lorsqu'il est muté, bloque la colonisation du CMA chez *M. truncatula*. De plus, RAM1 régule l'expression de RAM2, une glycérol-3-phosphate acyltransférase, qui favorise la biosynthèse de cutine permettant d'améliorer la

formation des hyphopodes (Gobbato *et al.*, 2012). Les auteurs ont observé que RAM1 interagissait avec NSP2. L'activation de la voie MA pourrait être déterminée par la formation du complexe NSP2/RAM1, alors que le complexe NSP1/NSP2 interviendrait dans les réponses spécifiques de la voie Nod (Oldroyd, 2013).

Récemment, il a été montré que le complexe CCaMK-CYCLOPS-DELLA active la transcription du gène *RAM1* par interaction de la protéine DELLA avec un facteur de transcription non identifié qui se lie au promoteur de *RAM1* (Pimprikar *et al.*, 2016).

2.2.1 Les récepteurs des facteurs Myc, des LysM-RLK ?

Les myc-LCO ayant une structure similaire à celle des facteurs Nod, et sachant que des composants de la CSSP sont communs aux deux endosymbioses, différents auteurs ont proposé que les signaux symbiotiques provenant des CMA pourraient également être perçus par des récepteurs de type LysM-RLK (Maillet *et al.*, 2011 ; Maillet *et al.*, 2011 ; Oldroyd, 2013).

Le premier récepteur appartenant à la famille des LysM-RLK proposé comme récepteur candidat aux signaux fongiques est un récepteur NFP-like. En effet, les myc-LCO stimulent la croissance des racines latérales de *M. truncatula*, et chez les mutants *nfp* cette réponse est largement diminuée (Maillet *et al.*, 2011). Une étude comparative utilisant des mutants symbiotiques a montré une reprogrammation transcriptionnelle en réponse aux myc-LCO, de manière dépendante au récepteur MtNFP, et également à MtDMI3 (Czaja *et al.*, 2012). Ce qui indique que les réponses des myc-LCO passent bien par la CSSP, comme montré initialement par Maillet et collaborateurs (2011). Les travaux de Sun et collaborateurs (2015) ont également montré que les myc-LCO induisaient des oscillations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ dépendantes de la présence de MtNFP. De plus, lors de la symbiose entre la plante non légumineuse *Parasponia andersonii* (seule plante non légumineuse qui peut réaliser une symbiose fixatrice d'azote) et les rhizobia, le récepteur PaNFP, orthologue de MtNFP, joue un rôle important dans la formation des nodosités et des arbuscules (Op den Camp *et al.*, 2011) comme le récepteur LYK10 de tomate (orthologue de MtNFP) dans la symbiose MA (Buendia *et al.*, 2016). Toutefois, bien que le récepteur NFP joue un rôle dans les réponses de l'hôte aux myc-LCO, il a été montré comme non essentiel pour la mycorhization, puisque les mutants *nfp* et *nfr5* ne sont pas affectés dans la colonisation (Amor *et al.*, 2003 ; Radutoiu *et al.*, 2007 ; Maillet *et al.*, 2011), suggérant l'intervention d'autres récepteurs candidats. De manière intéressante, MtNFP intervient dans les défenses contre des pathogènes car les mutants *Mtnfp* sont plus sensibles au champignon pathogène *C. trifolii* et à l'oomycète *Aphanomyces euteiches*, et une surexpression du récepteur augmente la résistance des plantes (Rey *et al.*, 2013). Ces résultats soulignent le double rôle du récepteur NFP dans la symbiose (par la perception des facteurs Nod et Myc-LCO) mais aussi dans l'immunité, suggérant que NFP contrôle la perception de différents signaux et l'activation de différentes voies de signalisation en aval.

En outre, NFP possèdent des gènes paralogues chez *M. truncatula* nommés LYR1 et LYR3 qui seraient également des candidats potentiels de récepteurs des myc-LCO. LYR1 est surexprimé durant la mycorhization même si son implication dans la perception des LCO reste encore à démontrer (Gaude *et al.*, 2012). LYR3 exprimé dans les racines et les nodosités fixe les LCO avec une haute affinité. De plus, LYR3

semble interagir avec LYK3 (le récepteur des facteurs Nod) en réponse à des LCO, suggérant que LYR3 peut représenter un co-récepteur dans la perception des LCO (Fliegmann *et al.*, 2013 ; Fliegmann *et al.*, 2016).

Parallèlement, les autres récepteurs LysM-RLK des facteurs Nod, LjNFR1/MtLYK3, semblent également être impliqués dans la symbiose MA, puisque les mutants *lyk3* et *nfr1* sont altérés dans l'infection mycorhizienne (Zhang *et al.*, 2015), soulignant encore une fois l'implication d'autres récepteurs dans la perception des signaux fongiques. Un orthologue de ces deux récepteurs chez le riz est CERK1. Ce dernier semble avoir une bi-fonctionnalité car il joue un rôle dans l'initiation de la symbiose AM et est également essentiel dans les réponses de défense déclenchées par la chitine (voir paragraphe II.1.2.2). En effet, les mutants *Oscerk1* sont altérés dans la pénétration du CMA dans les racines, mais également dans les réponses de défense chez le riz (Miyata *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015). OsCERK1 est un orthologue proche d'AtCERK1, un récepteur de la chitine impliqué dans les réponses immunitaires (Figure E.8) (Miya *et al.*, 2007). Le rôle de NFR1/LYK3 et CERK1 dans la signalisation symbiotique serait en lien avec la présence d'un motif de 3 acides aminés YAQ/R dans le domaine protéine kinase du récepteur, qui n'est pas présent chez AtCERK1 (Nakagawa *et al.*, 2011 ; Miyata *et al.*, 2014). Par contre les mécanismes régulant des réponses opposées d'OsCERK1 (défense *versus* symbiose) ne sont pas encore connus.

Les PRR agissent généralement en complexe en s'associant avec d'autres récepteurs afin de permettre la transduction du signal. Une possible explication à la bi-fonctionnalité d'OsCERK1 pourrait être liée à son récepteur partenaire, qui pourrait être déterminant dans la fonction d'OsCERK1 permettant soit la symbiose soit la défense. Le premier récepteur partenaire putatif proposé a été OsCEBIP mais des plantes mutantes *Oscebip* ayant perdu la capacité de répondre à la chitine ne sont pas altérées dans l'établissement de la symbiose MA (Miyata *et al.*, 2014). Ces résultats indiquent que le complexe récepteurs OsCERK1/OsCEBiP qui assure la transduction du signal en réponse aux oligomères de chitine (Shinya *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016) n'intervient pas dans la symbiose MA (Figure E.8). Afin de déterminer la présence d'un autre complexe avec OsCERK1 permettant l'induction des réponses symbiotiques, Miyata et collaborateurs (2016) se sont intéressés à OsNFR5/OsRLK2, l'unique orthologue de LjNFR5/MtNFP chez le riz, dont l'expression augmente lors de la colonisation par *R. irregularis*. Toutefois, contrairement à ce que les auteurs avaient envisagé, la colonisation du mutant *Osnfr5* par *R. irregularis* n'est pas affectée et il n'y a pas d'hétérodimérisation entre OsCERK1 et OsNFR5. OsNFR5 ne semble donc pas essentiel à l'établissement de la MA. Toutefois, certains gènes marqueurs de la symbiose MA sont affectés chez le mutant indiquant qu'il existe peut-être d'autres gènes de type LysM codant une protéine fonctionnellement redondante à OsNFR5 pouvant être le partenaire de OsCERK1 en plus de, ou de manière indépendante à OsNFR5 (Miyata *et al.*, 2016). De nouvelles études seront nécessaires pour établir leurs rôles dans la reconnaissance des signaux mycorhiziens.

Les recherches s'intéressant à la perception des myc-CO courts sont moins avancées. Les premières études ont montré que cette perception semblent être indépendante de NFP (Genre *et al.*, 2013 ; Sun *et al.*, 2015).

Par contre très récemment, les travaux de Carotenuto et collaborateurs (2017) ont montré que le récepteur OsCERK1 serait nécessaire à la perception/transduction du signal engendré par des myc-CO courts. En effet, les plantes mutantes *Oscerk1*, exprimant une sonde spécifique du Ca²⁺ libre dans le noyau, ne sont plus capables d'engendrer des réponses Ca²⁺ en réponse à des traitements par des GSE de *G. margarita* et/ou par du CO₄. Ces expériences montrent pour la première fois l'importance d'OsCERK1 dans la perception de myc-CO courts (Figure E.8). Dans la même étude, les auteurs ont montré qu'OsCEBiP et OsNFR5 ne semblent pas intervenir dans la perception/transduction des signaux mycorhiziens (Carotenuto *et al.*, 2017). Ceci s'appuie également sur les travaux de Miyata et collaborateurs (2016) décrits précédemment suggérant que chez le riz, les CO courts sont probablement les signaux principaux, au lieu des myc-LCO, pour la mise en place de la MA.

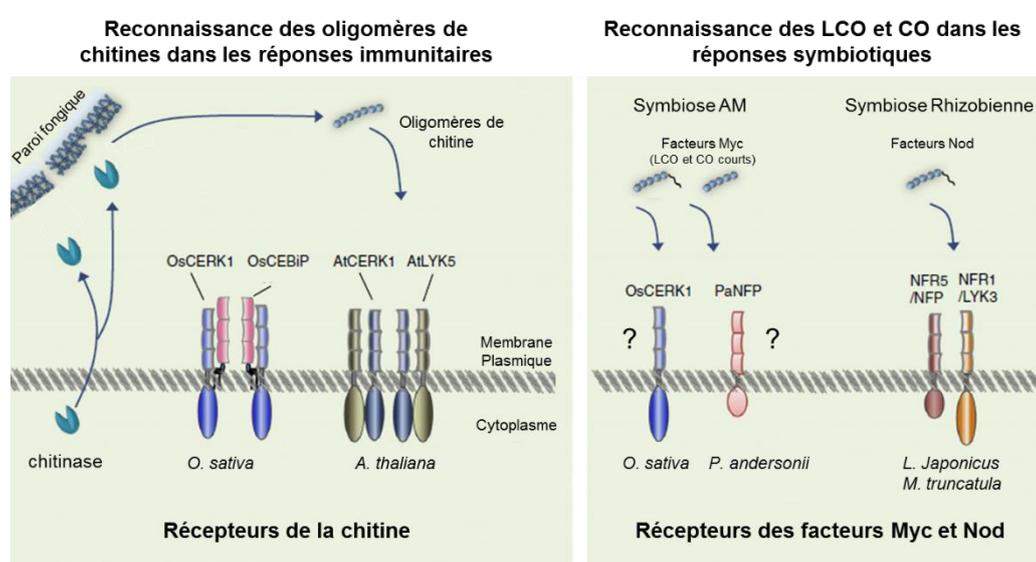


Figure E.8 : Représentation simplifiée de la perception des molécules de chitine dans les réponses immunitaires et symbiotiques chez les plantes. Les plantes reconnaissent les oligomères de chitine dérivés de la paroi de champignon et initie la PTI *via* la reconnaissance de ces molécules par des complexes de récepteurs membranaires de type LysM (à gauche). Des molécules contenant un squelette chitinique sécrétées par les CMA ou les rhizobia appelés respectivement facteurs Myc et facteurs Nod, sont également reconnus par des PRR de type LysM et initie la CSSP aboutissant à la symbiose MA et à la symbiose légumineuse-rhizobium (droite). Adapté de Shinya *et al.* (2015).

Ce chapitre montre que (i) les CMA produisent différentes formes de LCO et également des CO courts (et peut-être d'autres non identifiés) pouvant être plus ou moins importants en fonction des plantes et que (ii) les récepteurs LysM-RLK peuvent avoir un rôle bi-fonctionnel dans l'immunité et dans l'établissement la symbiose, aussi bien chez des plantes légumineuses que non légumineuses, ce qui rend l'identification des récepteurs des facteurs Myc complexe.

2.3 Les activités biologiques des myc-LCO et myc-CO

Lors de la découverte des myc-LCO, Maillet et collaborateurs, (2011) ont montré que ces molécules stimulaient la mycorhization de plusieurs espèces de plantes y compris des non légumineuses, ainsi que la croissance racinaire latérale de *M. truncatula* *via* plusieurs gènes de la voie CSSP (Maillet *et al.*, 2011).

Depuis, d'autres études de génétique et de transcriptomique ont montré que les réponses aux myc-LCO semblent être dépendantes des protéines NFP, DMI, NSP1 et NSP2 (Maillet *et al.*, 2011 ; Czaja *et al.*, 2012 ; Delaux *et al.*, 2013 ; Camps *et al.*, 2015).

A l'instar des LCO, les CO4 et CO5 sécrétés par les CMA, déclenchent des oscillations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ qui semblent être dépendantes de la présence de DMI1 et DMI2 (Genre *et al.*, 2013), et les CO4 sont actifs chez le riz, *M. truncatula* et le lotier (Zhang *et al.*, 2015 ; Carotenuto *et al.*, 2017) mais pas chez *Arabidopsis* (Genre *et al.*, 2013).

Les myc-LCO semblent être plus actifs sur les légumineuses, car ils induisent des oscillations de la $[Ca^{2+}]_{nuc}$ des cellules épidermiques chez le lotier, *M. truncatula* mais pas chez le riz. Alors qu'un mélange de LCO avec de CO4 semble être nécessaire à l'activation de réponse Ca^{2+} dans les cellules épidermiques. De plus, les LCO et le CO4 permettent le développement de racines latérales chez le riz, cette réponse étant dépendante de la présence de DMI3. Par contre le CO4, n'a pas d'effet sur le développement des racines latérales de *M. truncatula* (Sun *et al.*, 2015).

Ces résultats semblent illustrer que les molécules LCO et CO4 peuvent activer une variété de réponses dans des plantes légumineuses et non légumineuses qui ne perçoivent pas de façon similaire les facteurs Myc.

3. Les relations entre la signalisation mutualiste et la défense

Le système de défense des plantes est activé en réponse à des agents pathogènes, mais également en réponse à des microorganismes mutualistes. Après la reconnaissance des signaux symbiotiques, le système de défense est atténué/supprimé, dans le but de permettre la colonisation de la plante hôte par les symbiotes (Zamioudis and Pieterse, 2012). Cependant, les mécanismes de signalisation qui régissent la symbiose mutualiste sont encore mal connus.

Les oligomères de chitines représentant des MAMP provenant d'agents pathogènes potentiels, servent aussi de signaux symbiotiques produits par les rhizobia et les CMA. Ces molécules possèdent des structures relativement proches mais leur reconnaissance déclenche des réactions opposées chez les plantes. Comme vu précédemment, les récepteurs kinase à domaine extracellulaire LysM ont un rôle bi-fonctionnel selon le type de molécules chitiniques reconnues permettant l'établissement de la symbiose ou l'activation des défenses des plantes. Les recherches sur l'identification des récepteurs à domaine LysM permettront d'apporter des éléments de réponses concernant les mécanismes mis en place par les plantes pour discriminer les signaux symbiotiques et pathogènes.

Suite à la perception de ces MAMP, la transmission des signaux en aval des complexes de récepteurs conduit à une série d'évènements cellulaires (flux de Ca^{2+} , production de FAO, activation de protéines kinases ou modifications transcriptionnelles) qui peuvent être similaires entre les voies de signalisation de l'immunité et de la symbiose mutualiste (Lopez-Gomez *et al.*, 2012 ; Zipfel and Oldroyd, 2017). Même si la majorité des études de signalisation mutualiste se sont concentrées sur l'étude des flux de Ca^{2+} , ainsi que la régulation de l'expression des gènes symbiotiques, des parallèles ont pu être établis avec la signalisation de l'immunité. En

effet, l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire chez les plantes représente un évènement de signalisation très précoce et universel lors des interactions pathogènes et mutualistes. Comme introduit précédemment, la signature Ca^{2+} engendrée suite à un signal donné est caractérisée par son amplitude, sa durée, sa fréquence et sa localisation, qui permettra après décodage du signal par des protéines en aval, de contribuer à la mise en place de réponses physiologiques spécifiques (Vadassery and Oelmüller, 2009).

La production de FAO, une étape cruciale dans la mise en place des réponses de défense de la plante au cours des interactions avec des agents pathogènes (Lamb and Dixon, 1997), est également générée dans les premiers stades de la symbiose rhizobienne et mycorhizienne (Salzer *et al.*, 1999 ; Rubio *et al.*, 2004 ; Fester and Hause, 2005). Suite à la perception des facteurs Nod, la production de FAO dans les racines est fortement diminuée, permettant la déformation des poils absorbants, la colonisation et l'initiation de la symbiose (Shaw and Long, 2003 ; Lohar *et al.*, 2007). Dans la symbiose mycorhizienne, des résultats contradictoires indiquent que la production de FAO semble être fondamentale pour la croissance des hyphes et à la différenciation cellulaire des CMA (Takemoto *et al.*, 2007) alors qu'une autre étude semble proposer une régulation négative des FAO dans la colonisation racinaire (Arthikala *et al.*, 2013).

Peleg-Grossman et collaborateurs (2012) ont montré que l'accumulation de FAO dans le cytosol était capable de réprimer l'expression des gènes codant les protéines PR, gènes relatifs à la défense au cours de l'interaction symbiotique rhizobienne. D'autres évènements semblent indiquer une relation proche entre les réponses de défenses entre les microorganismes symbiotiques et pathogènes. L'interaction symbiotique entre *Rhizobium meliloti* et la luzerne s'accompagne d'une RH, qui est un mécanisme de défense observé lors des interactions plantes-pathogènes incompatibles. Les auteurs ont proposé que ce mécanisme pourrait permettre à la plante de réguler l'infection (Vasse *et al.*, 1993). En effet, une forte co-expression des récepteurs des facteurs Nod déclenche également une RH au niveau des feuilles chez *Nicotiana benthamiana* (Madsen *et al.*, 2011 ; Pietraszewska-Bogiel *et al.*, 2013).

Une réponse systémique peut également se mettre en place suite à l'interaction avec des microorganismes mutualistes (rhizobia ou CMA). En effet, une résistance systémique induite (ISR, Induced systemic resistance) confère une meilleure résistance à la plante contre de futures attaques par des microorganismes pathogènes ou des herbivores (Pieterse *et al.*, 2014), tout comme la résistance systémique acquise (SAR, systemic acquired resistance) déclenchée en réponse à des pathogènes (paragraphe II.1.4).

L'immunité des plantes semble être un élément crucial dans l'établissement et le maintien de la symbiose. La colonisation des plantes hôtes par des microorganismes nécessite la régulation/répression du système immunitaire (Figure E.9). Dans les interactions plantes-pathogènes, cette régulation se fait par l'intermédiaire des effecteurs qui ont la capacité de supprimer la PTI. De tels effets ont également été rapportés lors de l'établissement d'associations symbiotiques (Bartsev *et al.*, 2004 ; Klopfolz *et al.*, 2011 ; Plett *et al.*, 2017).

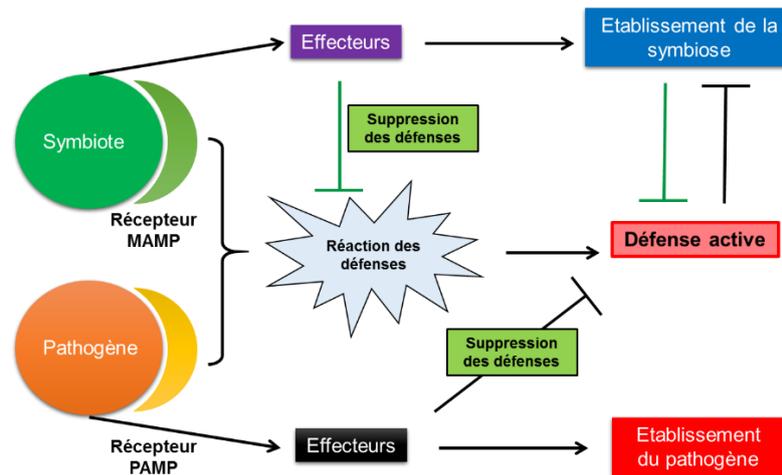


Figure E.9: Représentation des réponses des plantes aux microorganismes mutualistes et pathogènes. Les cellules végétales perçoivent les signaux symbiotiques et issus d'agents pathogènes et déclenchent des événements de signalisation cellulaire aboutissant à des réactions de défense qui peuvent être communes entre les deux types de microorganismes. Ceux-ci peuvent sécréter des effecteurs capables de supprimer les réponses immunitaires des plantes. Dans le cas de microorganismes symbiotiques, les défenses des plantes sont supprimées permettant l'établissement de la symbiose. Cependant, l'activation des réponses de défense, généralement transitoires dans ce cas, retarde l'établissement de relations symbiotiques, permettant à la plante de contrôler la colonisation des symbiotes. Adapté de Zogli and Libault (2017).

Les CMA produisent des effecteurs qui vont court-circuiter les réponses de défenses des plantes, favorisant *in fine* leur colonisation et leur développement dans la plante hôte. Klopffholz et collaborateurs (2011) ont montré que *R. irregularis* sécrète l'effecteur SP7 dans le PAS, qui va pénétrer dans le cytosol de la cellule végétale puis être adressé au noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS). Dans le noyau, il va interagir avec le facteur de transcription lié à la défense ERF19 (ethylene-responsive factor 19), afin de bloquer le programme de transcription contrôlé par ERF19 supprimant ainsi les réponses de défense, et permettant le développement du CMA (Figure E.10). Un fait intéressant est que le rôle de protéines effectrices produites par certaines espèces de rhizobia (*Bradyrhizobium* du soja) ne se limiterait pas à la régulation des réponses de défense dans la plante, mais permettrait également d'activer la nodulation en absence de reconnaissance des facteurs Nod activant la signalisation symbiotique (Okazaki *et al.*, 2013).

Parallèlement à la suppression du système immunitaire par les symbiotes, les plantes peuvent également jouer un rôle dans la régulation de leurs propres défenses suite à la reconnaissance des microorganismes symbiotiques. Dans des racines de lotier traitées pendant 24 h avec des GSE de *G. margarita*, une surexpression d'un pool de gènes, dont 1/3 représentent des gènes de défense, a été observée suivie d'une forte diminution de leur expression après 48 h de traitement (Giovannetti *et al.*, 2015). Ceci souligne une régulation des réponses de la plante suite à la reconnaissance des signaux symbiotiques. Des résultats similaires lors de l'interaction rhizobienne (traitement avec les rhizobia et/ou mimée par les facteurs Nod) ont montré une forte surexpression transitoire de gènes liés à la défense dans les 24 h (Gourion *et al.*, 2015). Cette suppression directe de l'immunité suite à la reconnaissance des signaux symbiotiques (LCO et CO4)

pourrait être liée à une diminution des récepteurs de ces molécules au niveau de la membrane plasmique (Liang *et al.*, 2013). Ces auteurs ont montré que la perception des LCO et CO4 supprimait les réponses de défense induite par flg22, chez des plantes légumineuses et non légumineuses. Cette désensibilisation des cellules par diminution des récepteurs à la membrane pourrait impliquer leur endocytose active.

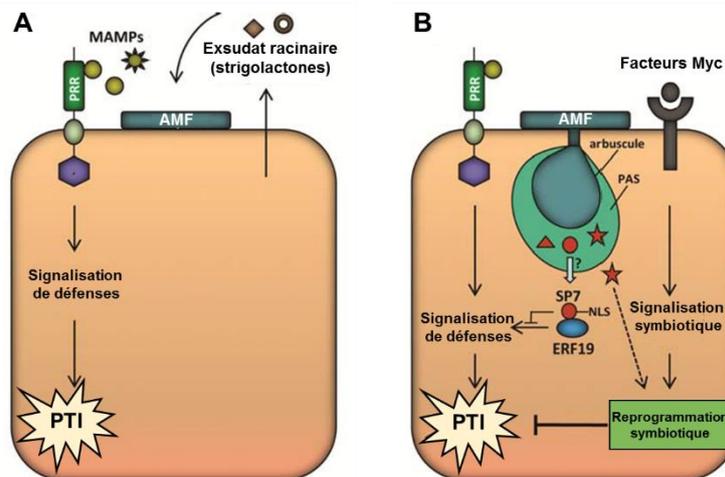


Figure E.10 : Modèle de la modulation du système immunitaire des cellules végétales par les champignons mycorhiziens à arbuscules. A. Les exsudats racinaires comprenant les SL, molécules « signal » essentielles dans la mise en place de la MA, permettent le recrutement des CMA, les préparant pour l'interaction. Les plantes hôtes perçoivent les CMA (MAMP) comme des envahisseurs potentiels, *via* des PRR à la membrane plasmique aboutissant à l'activation de la PTI. B. Une fois que la plante a reconnu le CMA au stade pré-symbiotique le CMA va sécréter les facteurs myc, permettant aux cellules végétales d'activer le programme symbiotique et d'initier l'interaction en contrecarrant les réponses de défense par des mécanismes qui sont encore inconnus. Les CMA sécrètent des effecteurs (SP7) qui vont interagir avec un facteur de transcription lié à la défense (ERF19), supprimant ainsi la PTI et permettant l'établissement de la symbiose MA. Adapté de Zamioudis and Pieterse (2012).

Tous ces résultats illustrent l'étroite imbrication entre les voies de signalisation plantes-microorganismes mutualistes et pathogènes. Une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance de différents signaux et des réponses cellulaires, impliquant des complexes de récepteurs variés ainsi que le déchiffrement des voies de signalisation en aval, permettront de déterminer comment la plante arrive à discerner les différents types de microorganismes. Les relations trophiques, notamment par le biais des photosynthétats, étant à la base des IPM et de leur devenir, nous sommes intéressés à ces molécules actrices dans ces interactions.

III. Le transport de sucres chez les plantes

1. La synthèse et le transport des sucres chez les plantes

1.1 Le sucre, une molécule essentielle chez les plantes

Les plantes terrestres, ainsi que les algues et les cyanobactéries, ont la capacité de produire de l'énergie chimique à partir de l'énergie lumineuse, leur permettant ainsi de synthétiser leur propre matière organique sous formes initiales de sucres ; ce processus de photosynthèse se déroule principalement chez les plantes dans des organites spécifiques des cellules du mésophylle foliaire, les chloroplastes. Dans les plantes le

carbone fixé par la photosynthèse est soit directement métabolisé afin de pourvoir la cellule en énergie et en squelette carboné pour sa croissance, soit exporté sous forme de saccharose vers d'autres organes pour permettre leur croissance. Les sucres sont aussi essentiels comme éléments de base dans la formation des réserves (exemple amidon), des structures cellulaires (exemple cellulose des parois), et comme squelette carboné dans la synthèse d'autres métabolites (exemple acides aminés ou métabolites secondaires).

Les organes de la plante peuvent être divisés en deux catégories suivant la balance import/export des photosynthétats (Ho, 1988). On distingue, les organes *sources* et les organes *puits*. Les organes sources représentent les parties de la plante dites photosynthétiquement actives (feuilles matures qui ne se développent plus) qui produisent des composés carbonés en quantité supérieure à leurs besoins, et qui exportent les photoassimilats *via* le phloème. Les organes puits sont ceux qui soit ne font pas de photosynthèse ou ceux qui sont des importateurs nets tels les organes végétatifs (tiges en croissance, pointes des racines, jeunes feuilles, bourgeons), les organes reproducteurs (fleurs, fruits) et les organes de réserves (bulbes, rhizomes, racines ou tubercules). L'allocation des ressources au sein de la plante est dépendante de la demande/activité des organes puits (Ho, 1988). Ces besoins n'étant pas similaires en fonction des organes puits, un phénomène de compétition des ressources carbonées a lieu entre eux. Le facteur déterminant le sens du transport est la force du puits, définie comme la capacité à accumuler des photoassimilats et à les métaboliser (Waring and Patrick, 1975). Ainsi, plus la demande est élevée, plus la force du puits est importante et plus les ressources qui lui sont allouées sont élevées. Bien entendu, différents paramètres peuvent influencer la force du puits, comme le stade de développement de l'organe et les facteurs environnementaux (Lemoine *et al.*, 2013).

Les sucres sont également une molécule de signalisation impliquées dans la physiologie et le développement de la plante, ainsi que dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Rolland *et al.*, 2006). Dans les IPM, ils sont essentiels pour apporter l'énergie nécessaire à la mise en place des mécanismes de défense et servent de signaux pour la régulation des gènes de défense (IPM de type pathogènes ; Ehness *et al.*, 1997 ; Roitsch *et al.*, 2003 ; Bolton, 2009), ou sont essentiels aux bons échanges avec les microorganismes (IPM de type stratégie mutualiste ; Smith and Read, 2008 ; Doidy, *et al.*, 2012a).

1.2 Le transport à longue distance

Les produits de la photosynthèse sont les trioses phosphates utilisés soit pour la production d'amidon dans les chloroplastes où ils sont synthétisés, soit convertis en saccharose dans le cytoplasme (Figure E.11). Le saccharose est un disaccharide non-réducteur, relativement insensible au métabolisme, qui est catabolisé uniquement par l'intervention d'enzymes (Figure E.11). Sa nature non réductrice lui confère une forte stabilité, représentant ainsi la forme de sucre majoritairement transportée dans le phloème chez les plantes (Lemoine, 2000). Le saccharose est synthétisé dans le cytoplasme des cellules mésophylliennes par l'intervention de deux enzymes, la saccharose-phosphate synthase (SPS) et la saccharose-phosphate phosphatase (SPP ; Figure E.11). La SPS utilise le fructose-6-phosphate et l'UDP-glucose pour produire le

saccharose-6-phosphate. Ce substrat est ensuite utilisé par la SPP pour produire le saccharose (Ruan, 2014). Ce dernier est clivé uniquement par l'intervention de deux types d'enzymes, la saccharose synthase cytosolique (SuS) et les invertases. La SuS catalyse le clivage du saccharose en UDP-glucose et en fructose, et les invertases clivent directement le saccharose en glucose et fructose (Figure E.11). Une fois synthétisé, le saccharose peut être stocké temporairement dans les vacuoles des cellules mésophylliennes, ou être transporté *via* le phloème vers les organes puits. Ce transport à longue distance se fait selon l'hypothèse de Münch (1930) grâce aux différences de pression osmotique entre les hautes pressions créées au niveau du chargement du phloème, à partir des organes sources, et les basses pressions au niveau du déchargement dans les organes puits (Knoblauch and Peters, 2010).

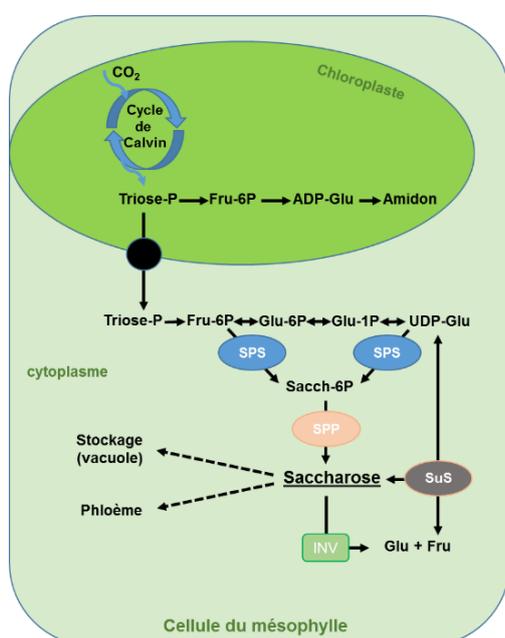


Figure E.11 : Schéma simplifié de la production de photosynthétats et du métabolisme du saccharose dans les cellules mésophylliennes.

SPS, saccharose-phosphate synthase ; SPP, saccharose-phosphate phosphatase ; SuS, saccharose synthase cytosolique ; INV, invertase. Adapté de Ruan (2014).

1.2.1 Le chargement du saccharose dans le phloème

Le saccharose peut être chargé dans le phloème, à partir des cellules mésophylliennes, par voies symplasmiques ou apoplasmiques. Dans la voie symplasmique, le saccharose diffuse à travers les plasmodesmes en suivant le gradient de concentration du saccharose, jusqu'au complexe conducteur du phloème, composé des cellules compagnes/cellules criblées. Ce chargement du saccharose est appelé chargement passif car le saccharose diffuse vers les tissus conducteurs sans consommation d'énergie (Figure E.12 ; Turgeon, 2010).

Dans le modèle du chargement apoplasmique, le saccharose est d'abord exporté des cellules mésophylliennes vers l'apoplasme avant d'être importé dans les cellules compagnes/cellules criblées par un transport actif faisant intervenir des transporteurs de saccharose (SUC/SUT ; SUCROSE TRANSPORTER). La concentration en saccharose dans les cellules du phloème étant plus élevée que celle retrouvée au niveau des cellules de l'apoplasme, un transport actif est nécessaire pour le passage du saccharose vers le phloème (Sauer, 2007 ; Turgeon, 2010 ; Lemoine *et al*, 2013). Récemment chez *Arabidopsis*, il a été proposé que l'étape permettant

l'export du saccharose des cellules mésophylliennes vers l'apoplasme est accomplie par deux transporteurs membranaires d'efflux du saccharose appartenant à la famille des SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters), nommés SWEET11 et SWEET12 (Chen *et al.*, 2012). Le saccharose est ensuite chargé dans le complexe conducteur par des transporteurs de la famille SUT qui utilisent la force protomotrice fournie par une pompe membranaire à protons (H^+)/ATPase (Sauer, 2007), pour permettre l'import des molécules de saccharose dans le phloème contre leur gradient de concentration (Figure E.12). Une fois dans les cellules compagnes, le saccharose diffuse par les plasmodesmes jusqu'aux tubes criblés, puis est transporté et déchargé au niveau des organes puits.

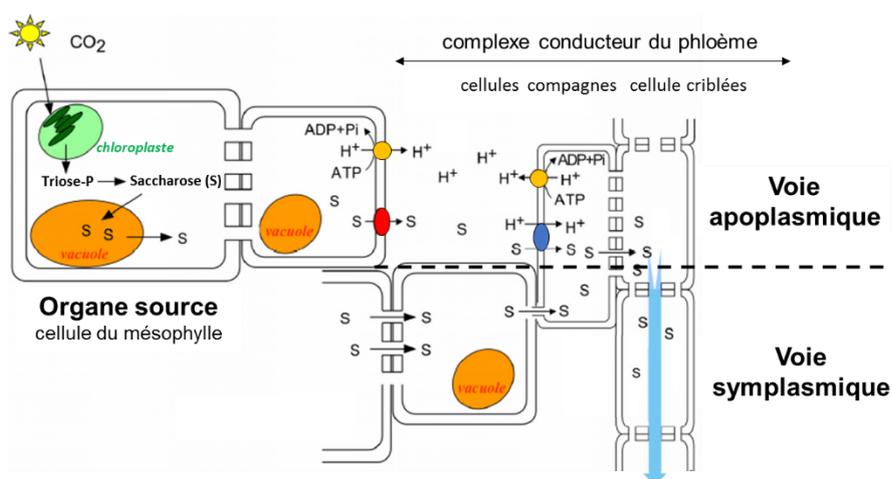


Figure E.12 : Les voies de chargement du saccharose dans le phloème au niveau des organes sources. Le saccharose (S) synthétisé au niveau des cellules mésophylliennes peut être chargé dans le phloème par voie symplasmique (diffusion passive à travers les plasmodesmes) ou apoplasique faisant intervenir des transporteurs membranaires spécifiques (transport actif). Le rond rouge représente un transporteur de la famille des SWEET, les ronds jaunes représentent des ATPase/protons (H^+) de la membrane plasmique et le rond bleu un co-transporteur de saccharose/ H^+ . Adapté de Conde *et al.* (2007)

Ces voies symplasmiques et apoplasiques ne peuvent coexister pour une même espèce (Rennie and Turgeon, 2009 ; Turgeon, 2010). Le mode de chargement du phloème dépend donc de l'espèce, tandis que le déchargement dépend des tissus cibles (Viola *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2006).

1.2.2 Le déchargement du phloème

Au niveau de l'organe puits, le déchargement du phloème peut se faire également par voie symplasmique et/ou apoplasique en fonction de l'organe receveur et de son stade de développement (Patrick, 1997 ; Lemoine *et al.*, 2013). Généralement, le déchargement du saccharose se fait par voie symplasmique. Etant donné que les concentrations en saccharose dans le phloème sont élevées, il diffuse selon le gradient de concentration à travers les plasmodesmes jusqu'aux cellules cibles. Dans le cas, où la force du puits est fortement augmentée, comme par exemple des organes puits en développement (Zhang, 2006) ou des tissus colonisés par des microorganismes (voir paragraphe IV), la voie symplasmique est complétée par la voie apoplasique pour augmenter le transfert du saccharose vers le puits fort. De plus, chez la pomme de terre,

il a été montré qu'une inhibition de *StSUT1* bloquerait la croissance des tubercules lorsque le déchargement s'effectue par voie apoplasmique, indiquant un rôle de SUT1 dans l'efflux de saccharose vers les organes puits (Viola *et al.*, 2001; Kühn, 2003). La voie apoplasmique fait donc intervenir un des transporteurs spécifiques de la famille SUT, SUT1/SUC1, qui va exporter le saccharose dans l'apoplasme et l'importer dans les organes puits par transport actif (Figure E.12 ; Carpaneto *et al.*, 2005 ; Geiger, 2011 ; Doidy *et al.*, 2012b).

Au niveau des organes puits, le saccharose peut être importé soit dans la vacuole où il est converti en hexoses par l'intervention d'invertases localisées dans la vacuole, soit dans le cytoplasme où il peut être transformé par le biais de la SuS et/ou d'invertases (Figure E.12) afin d'être métabolisé (puits en croissance) et/ou stocké sous forme d'amidon dans les amyloplastes. Les invertases constituent un groupe d'enzymes qui diffèrent en fonction de leur localisation cellulaire et les différences de pH optimum d'activité (Roitsch and González, 2004). Il existe les invertases alcalines/neutres cytosoliques (INV-C) avec une activité faible et transitoire, car le saccharose cytoplasmique est souvent temporairement stocké dans les vacuoles, où les invertases acides vacuolaires (INV-V) qui régulent à la fois le stockage du saccharose et la production des hexoses afin d'alimenter différentes voies métaboliques. Dans l'apoplasme, le saccharose peut être clivé en glucose et fructose grâce à l'activité d'invertases pariétales (INV-P), et les hexoses produits sont transportés activement *via* des transporteurs de monosaccharides appartenant à la famille des MST, dans les cellules puits (Figure E.12). Les hexoses peuvent être stockés dans la vacuole faisant intervenir des transporteurs de la famille des MST localisés dans le tonoplaste (non représenté sur la Figure E.12) ou utilisés pour le métabolisme cellulaire des organes puits (non représenté sur la Figure E.12).

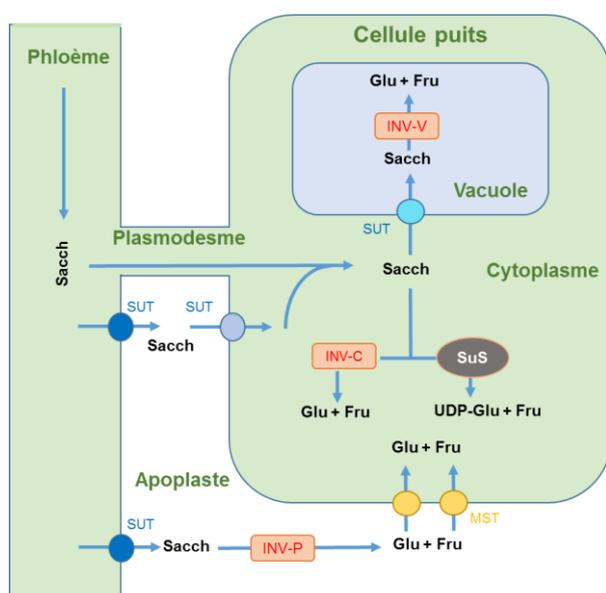


Figure E.12 : Schéma simplifié du déchargement du saccharose vers les organes puits et du catabolisme du saccharose. Au niveau des organes puits, le saccharose peut être déchargé par voie symplasmique ou apoplasmique faisant intervenir des transporteurs spécifiques de saccharose (ronds bleus). Au niveau du cytoplasme, le saccharose peut être importé dans la vacuole, ou clivé en glucose et fructose. Les hexoses peuvent être soit stockés dans la vacuole [non représenté sur le schéma], soit utilisés par le métabolisme cellulaire [non représenté sur le schéma] par le biais de la sucrose synthase (SuS) ou des invertases (INV). Dans l'apoplasme, les hexoses, issus du clivage de l'invertase pariétale (INV-P), peuvent être transportés dans les cellules puits par des transporteurs de monosaccharides (ronds jaunes). Adapté de Rolland *et al.* (2006)

Bien que les mécanismes de régulation de la distribution des photoassimilats, faisant intervenir différents organes puits et différentes voies métaboliques, soient complexes et encore mal compris, les transporteurs de

sucres et les invertases (particulièrement les INV-P) semblent jouer un rôle important dans l'allocation des sucres ainsi que dans les relations sources/puits au sein de la plante (Kühn and Grof, 2010 ; Lemoine *et al.*, 2013 ; Ruan, 2014).

Le rôle des invertases dans la plante ne sera pas davantage détaillé dans ce manuscrit car nous avons choisi de nous focaliser sur les mécanismes de transport des sucres. De plus, il est admis que les microorganismes pathogènes et mutualistes possèdent des mécanismes d'acquisition des sucres différents, les CMA ne pouvant pas hydrolyser le saccharose car ils ne possèdent pas d'invertases (Bago *et al.*, 2000 ; Smith and Read, 2008), alors que les microorganismes pathogènes possèdent leurs propres invertases.

2. Les transporteurs de sucres, acteurs moléculaires de l'allocation des sucres chez les plantes

Les transporteurs de sucres chez les plantes sont regroupés en trois grandes familles ; les SUT (SUcrose Transporters), les MST (MonoSaccharide Transporters) et les SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters). Ils permettent le passage de sucres à travers les membranes *via* la diffusion facilitée ou par un co-transport sucres/H⁺ (symport ou antiport ; Figure E.13). Bien évidemment tous les transporteurs de sucres ne sont pas impliqués dans le transport à longue distance (essentiellement la fonction des SUT) mais beaucoup participent à la distribution des sucres dans les différentes cellules des tissus de la plante.

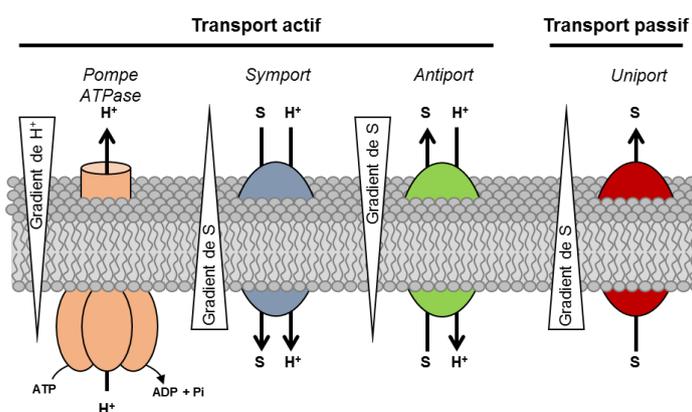


Figure E.13: Les différents types de transporteurs de sucres (S) membranaires. Le passage de la molécule de sucre à travers la membrane peut se faire contre son gradient de concentration (transport actif) ou dans le sens de son gradient de concentration (transport passif). Les pompes ATPase hydrolysent l'ATP pour générer un gradient de protons (H⁺) qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Les symports et antiports utilisent ce gradient de H⁺ pour transporter le S d'intérêt contre son gradient de concentration. On parlera de symport si le transport du S est dans le même sens que les H⁺ et d'antiport dans le cas inverse. Le transport du S dans le sens de son gradient de concentration ne nécessitant pas l'utilisation du gradient de H⁺ et se fait au travers d'un uniport. Adapté du chapitre de livre Drain, Pfister et al. (2017) en Annexe 1.

2.1 Les transporteurs de sucres membres de la Major Facilitator Superfamily (MFS)

Les transporteurs des familles des SUT et des MST appartiennent à la superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily), qui représente une des plus grandes classes de canaux et de transporteurs d'ions et

de solutés (sucres, acides aminés, vitamines, etc.) à travers les membranes *via* un transport actif et/ou passif (Pao *et al.*, 1998 ; Reddy *et al.*, 2012).

2.1.1 La famille des Sucrose Transporters (SUT)

Comme indiqué précédemment, les transporteurs SUT sont essentiels pour le transport du saccharose des feuilles sources aux organes puits. Ces transporteurs réalisent un symport de saccharose/H⁺ avec une stœchiométrie 1:1, et sont capables de transporter le saccharose contre son gradient de concentration à travers les membranes plasmiques ou de manière intracellulaire de la vacuole vers le cytoplasme (Sauer, 2007). La majorité des SUT, caractérisés principalement en système hétérologue, possèdent une affinité pour le saccharose de l'ordre du mM (Doidy *et al.*, 2012a). Ces transporteurs possèdent 12 domaines transmembranaires reliés par des boucles hydrophiles qui forment un seul pore pour le saccharose, les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (Lemoine, 2000).

La classification des SUT chez les monocotylédones et les dicotylédones a constamment évolué ces 15 dernières années en raison du nombre croissant de nouvelles séquences identifiées (Pao *et al.*, 1998 ; Aoki *et al.*, 2003 ; Sauer, 2007 ; Braun and Slewinski, 2009 ; Kühn and Grof, 2010 ; Aoki *et al.*, 2012 ; Lalonde and Frommer, 2012 ; Reinders *et al.*, 2012 ; Doidy *et al.*, 2012b ; Peng *et al.*, 2014). Les différents transporteurs SUT sont répartis en 5 classes (SUT1 à 5) dans la classification proposée par (Kühn and Grof, 2010). Depuis, de nouvelles classifications des SUT de plantes ont été proposées par Doidy et collaborateurs (2012b), et dernièrement par Peng et collaborateurs (2014), classant les différents transporteurs en trois types (I, II, III), où le type II contient une sous-classe spécifique des plantes monocotylédones (nommée type IIB ; Tableau E.2). En raison de différentes classifications et des différents noms attribués par les différents auteurs, nous utiliserons, par souci de clarté, la classification de Kühn & Grof, (2010) dans ce manuscrit (Figure E.14).

Tableau E.2: Quelques exemples représentatifs de l'évolution de la classification des SUT chez les plantes.

Références	Nombre de SUT de plantes dans l'étude	Sous-classes des SUT			
		dicot-	dicto/monocot-	dicot/monocot-	monocot-
Peng <i>et al.</i> , 2014	233	Type I	Type III	Type II	Type IIB
Doidy <i>et al.</i> , 2012b	88	SUT1	SUT4	SUT2 (IIA)	SUT2 (IIB)
Kühn et Grof, 2010	41	SUT1	SUT4	SUT2	SUT3 et SUT5
Sauer, 2007	62	Groupe 2	Groupe 4	Groupe 3	Groupe 1

- La classe SUT1, aussi appelée SUC2 chez *A. thaliana*, est spécifique des dicotylédones et représente la classe de transporteurs la plus étudiée à ce jour. Une protéine unique du clade est impliquée dans l'import du saccharose/H⁺, avec une haute affinité pour celui-ci, lors du chargement du phloème par voie apoplasmique dans les espèces possédant ce type de chargement (Zhang and Turgeon, 2009). Les protéines SUT1 ont été retrouvées à la membrane plasmique des cellules compagnes et/ou criblées, en accord avec leurs fonctions de chargement du phloème (Riesmeier *et al.*, 1994 ; Kühn *et al.*, 1997 ; Reinders *et al.*, 2002 ; Kühn *et al.*, 2003

; Knop, 2004 ; Hackel *et al.*, 2006 ; Srivastava *et al.*, 2008 ; Rennie and Turgeon, 2009). Elles ont également été localisées dans les tissus des puits (Riesmeier *et al.*, 1994 ; Truernit and Sauer, 1995 ; Bürkle *et al.*, 1998 ; Kühn *et al.*, 2003 ; Hackel *et al.*, 2006), indiquant que ces transporteurs sont impliqués dans la libération du saccharose du phloème vers l'apoplasme et/ou qu'ils contribuent à l'absorption du saccharose dans les tissus puits (Carpaneto *et al.*, 2005 ; Geiger, 2011 ; Doidy *et al.*, 2012b).

Les autres membres de la classe SUT1 ne sont pas aussi bien connus que ceux responsables du chargement du phloème, mais semblent être impliqués dans la distribution du saccharose vers les organes puits (par exemple les fleurs et les graines), bien que leur rôle physiologique doit être encore élucidé (Sauer, 2007 ; Doidy *et al.*, 2012a).

- La classe SUT2 est retrouvée chez la grande majorité des monocotylédones et des dicotylédones. Initialement décrites comme des senseurs de saccharose chez la tomate et *Arabidopsis* (Barker *et al.*, 2000), certaines protéines de cette classe ont été déterminées comme étant des transporteurs fonctionnels (Barth *et al.*, 2003). Structurellement différents des autres SUT, avec une extrémité N-terminale cytoplasmique plus grande et une boucle centrale plus étendue, le rôle de ces transporteurs n'est pas encore bien défini. Ils ont été retrouvés au niveau des organes puits où ils pourraient être impliqués dans le déchargement du phloème. Ils ont été proposés comme participant au développement du tube pollinique, des fruits et des graines chez la tomate (Hackel *et al.*, 2006). Récemment, Bitterlich et collaborateurs (2014) ont montré qu'un transporteur de cette classe chez la tomate (SISUT2), aurait un impact potentiel lors d'une interaction avec un CMA en contrôlant le développement de la MA (voir la partie IV. 2. La régulation des flux de sucres chez la plante à l'interface plante/microorganismes MA).

- La classe SUT3, spécifique des monocotylédones, rassemble des protéines de haute affinité pour le saccharose. Il semble que cette classe comprenne également une protéine unique nécessaire au chargement du phloème pour les espèces monocotylédones par voie apoplasmique (ZmSUT1 ; Slewinski *et al.*, 2009).

- La classe SUT5, également spécifique des monocotylédones, est regroupée à ce jour dans un même groupe avec la classe SUT3 (Peng *et al.*, 2014). Elle représente la classe la moins connue et étudiée à ce jour. Une seule protéine a été caractérisée chez le riz comme étant un symport saccharose/H⁺ (Sun *et al.*, 2010).

- La classe SUT4, est retrouvée chez les monocotylédones et les dicotylédones. Contrairement aux autres SUT, qui sont à la membrane plasmique, certaines études ont montré une localisation tonoplastique de ces protéines, permettant la libération du saccharose de la vacuole vers le cytoplasme (Okubo-Kurihara *et al.*, 2011 ; Eom *et al.*, 2011 ; Schneider *et al.*, 2012). Toutefois, une double localisation plasmalemmique et tonoplastique a également été rapportée (Chincinska *et al.*, 2013).

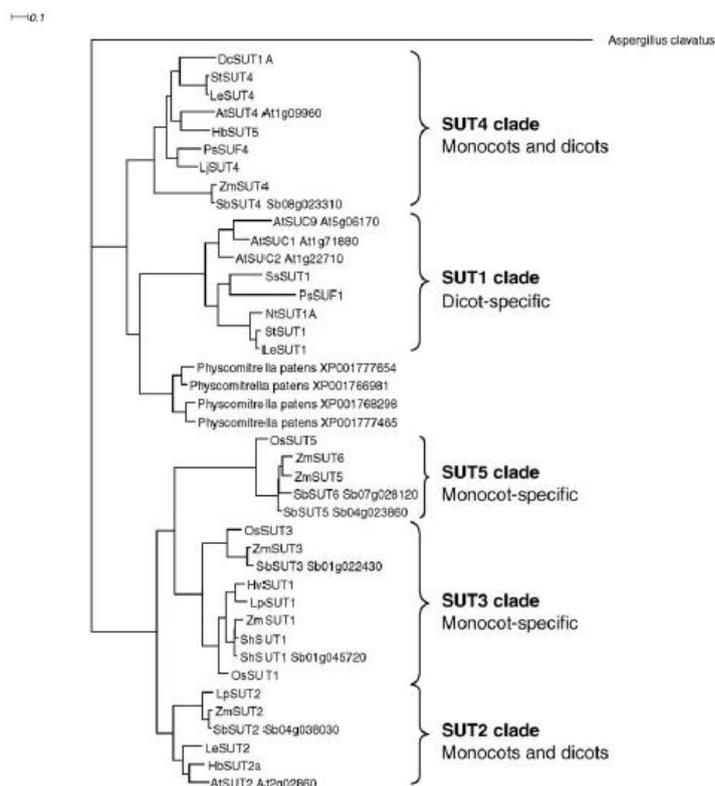


Figure E.14 : Arbre phylogénétique des différentes classes de SUT chez les monocotylédones et dicotylédones, selon Kühn & Grof, (2010). Les séquences SUT de la mousse *Physcomitrella patens* ont été incluses ainsi que celles du champignon *Aspergillus clavatus* utilisées comme groupe externe.

Il est à noter que si tous les SUT semblent réaliser des imports saccharose/H⁺ dans le cytoplasme, il a récemment été montré que le transporteur ZmSUT1 (classe SUT3) a un mode de transport réversible en expression hétérologue en ovocytes de *Xenopus*, en réponse à une augmentation de la concentration en saccharose cytosolique et une variation du pH, permettant l'efflux de saccharose (Carpaneto *et al.*, 2005 ; Carpaneto *et al.*, 2010). Ceci pourrait impliquer un rôle des transporteurs de type SUT dans le chargement ou déchargement de cellules/organes en fonction du stade de développement et des paramètres environnementaux.

2.1.2 La famille des MonoSaccharide Transporters (MST)

Ces transporteurs MST constituent la plus grande famille de transporteurs de sucres, comptant par exemple 53 membres chez *Arabidopsis*. Ils possèdent également 12 domaines transmembranaires et catalysent le transport d'hexoses, mais aussi celui de certains polyols (Büttner, 2007).

Ils sont impliqués dans la répartition des sucres notamment vers les organes puits par un système de transport de type symport ou antiport sucre/H⁺ (Büttner, 2007). Les MST sont classés en 7 sous-familles selon leur spécificité de substrat, le mécanisme de transport et leur localisation cellulaire chez *Arabidopsis* (Figure E.15), *M. truncatula* et *O. sativa* (Büttner, 2007 ; Doidy *et al.*, 2012a) : STP (Sugar Transporter Protein), PLT (Polyol Transporter), VGT (Vacuolar Glucose Transporter), TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter), ERD6-like (Early Responsive to Dehydration), INT (Inositol Transporter) et pGlcT/SGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G protein B1).

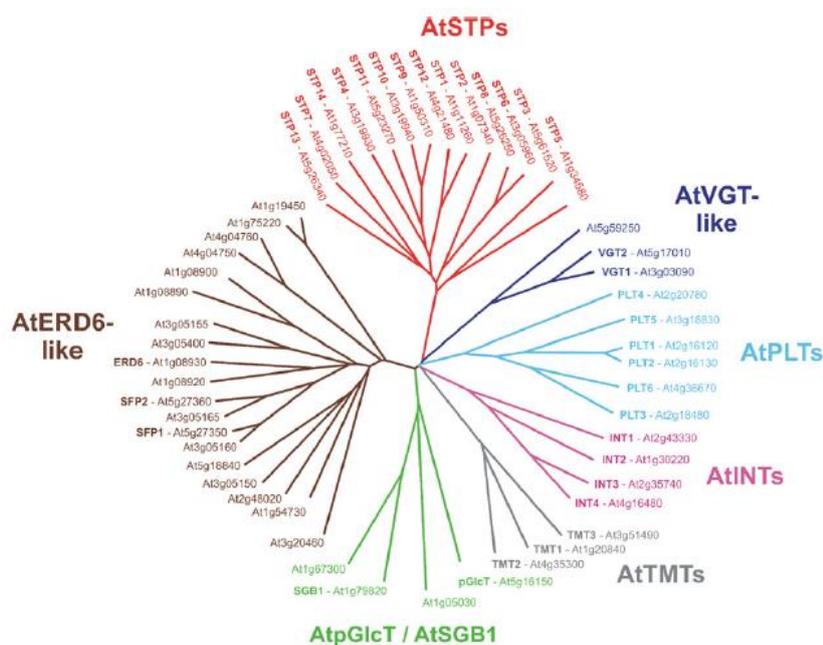


Figure E.15 : Arbre phylogénétique des membres de la famille des MST chez *A. thaliana*. Le génome d'*A. thaliana* contient 53 protéines AtMST regroupées dans 7 sous-familles indiquées en couleurs (Büttner, 2007).

2.2 La famille des Sugars Will Eventually be Exported Transporters (SWEET)

Récemment, une autre famille de transporteurs de sucres nommée SWEET a été identifiée à la fois chez les plantes et les animaux, et représente des uniports facilitant le transport de sucres. Les transporteurs appartenant à la famille des SWEET se distinguent structuralement des MFS car ils sont plus petits et possèdent 7 domaines transmembranaires chez les eucaryotes (Chen *et al.*, 2010).

Cette famille, divisée en 4 sous-classes, comprend par exemple 17 membres chez *Arabidopsis* et 21 chez le riz. Les protéines appartenant aux classes I, II, et IV sont principalement des transporteurs d'hexoses (Chen *et al.*, 2010), alors que celles de la classe III sont des transporteurs préférentiels de saccharose (Chen *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2014). Les SWEET sont localisés majoritairement à la membrane plasmique ; bien que certains aient également été retrouvés à la membrane d'autres compartiments cellulaires tels que la vacuole (Chardon *et al.*, 2013 ; Klemens *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2015) ou l'appareil de Golgi (Lin *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2015). Les rôles physiologiques des SWEET sont variés. On peut citer (i) l'efflux de saccharose pour le chargement du phloème au niveau des feuilles sources (Chen *et al.*, 2012), (ii) le stockage du fructose dans la vacuole (Chardon *et al.*, 2013 ; Guo *et al.*, 2014), (iii) le développement du pollen, (iv) la sécrétion du nectar (Lin *et al.*, 2014), (v) le remplissage des graines (Sun *et al.*, 2013), (vi) la tolérance au froid (Klemens *et al.*, 2013), et (vii) ils sont également impliqués dans les interactions plantes microorganismes (voir paragraphe IV) pour le transport de sucre à l'interface biotrophe (Chen *et al.*, 2010 ; Cohn *et al.*, 2014 ; Chong *et al.*, 2014 ; Manck-Götzenberger and Requena, 2016).

Un schéma, hypothétique et simplifié, représentant la localisation et la fonction des différents transporteurs de sucres, à l'échelle de la cellule végétale est présenté en Figure E.16.

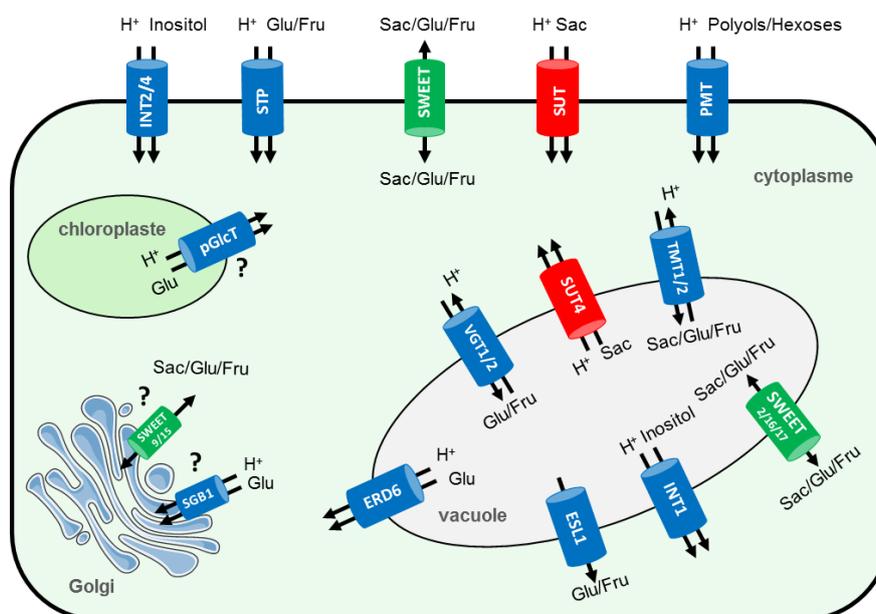


Figure E.16 : Schéma hypothétique résumant la localisation et la fonction des différents transporteurs de sucres dans la cellule végétale. Le transport de sucres à travers les membranes des cellules est assuré par des protéines localisées dans les membranes plasmiques, le tonoplaste ou la membrane plastidique et appartient à trois grandes familles : les transporteurs de saccharose SUT (en rouge), les transporteurs de monosaccharise MST (en bleu) puis les SWEET (en vert). Les SUT représentent des symports saccharose/H⁺ permettant l'import de sucres dans la cellule, ils sont localisés principalement sur la membrane plasmique, avec une exception pour les transporteurs de la classe SUT4 localisés au tonoplaste. Les MST localisés à la membrane plasmique fonctionnent comme des symports sucre/H⁺ assurant l'influx de sucres vers l'intérieur de la cellule. Ils regroupent également des antiports (VGT et TMT) localisés dans au tonoplaste qui transportent les sucres dans la vacuole. Les SWEET permettent un transport de type uniport au niveau de la membrane plasmique, et quelques-uns au niveau du tonoplaste et de l'appareil de Golgi. Les transporteurs représentés par un point d'interrogation ne sont pas caractérisés biologiquement à ce jour. Adapté de Doidy et al. (2012a).

3. La dynamique membranaire pour réguler les flux de sucres à l'échelle de la cellule

Pour assurer leur fonction, les protéines membranaires sont d'abord synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE), puis adressées le long du système endomembranaire de sécrétion (également appelé système sécrétoire, Figure E.17) à travers l'appareil de Golgi, puis le Trans-Golgi Network (TGN) vers leur destination finale (i) la membrane plasmique par exocytose pour les protéines plasmalemmiques (Peer, 2011) ou (ii) la membrane vacuolaire pour les protéines tonoplastiques (Pedrazzini *et al.*, 2013). Les protéines du plasmalemmes peuvent être soit conservées à cette membrane éventuellement dans des microdomaines, riches en stérols et sphingolipides (Mongrand *et al.*, 2010), soit internalisées par endocytose. Ce processus d'endocytose permet : (i) leur adressage vers la vacuole pour leur dégradation, participant ainsi à leur turnover ou (ii) leur stockage dans des compartiments endocytiques de réserve puis leur recyclage vers la membrane plasmique quand leur fonction est requise (Murphy *et al.*, 2005 ; Figure E.17). La voie principale d'endocytose la mieux décrite chez les cellules végétale est l'endocytose dépendante de la clathrine (Clathrin-Mediated Endocytosis, CME ; Chen *et al.*, 2011) qui est la voie principale d'endocytose des PRR lors des IPM (Leborgne-Castel *et al.*, 2010). Une endocytose liée aux microdomaines membranaires, impliquant des

protéines spécifiques de ces microdomaines telles les flotillines, a également été envisagée mais peu de données sont actuellement disponibles chez les plantes (Hao *et al.*, 2014).

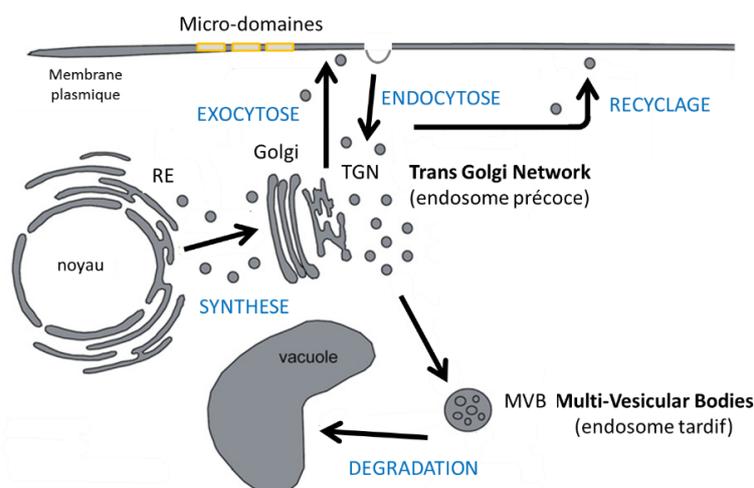


Figure E.17 : Représentation simplifiée du système endomembranaire chez les plantes.

Les protéines entrent de manière co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique (RE) et sont dirigées vers l'appareil de Golgi (Golgi). Les protéines membranaires adressées à la membrane plasmique (et/ou dans les microdomaines) ou les protéines solubles excrétées dans l'apoplasme quittent l'appareil de Golgi par la maturation des saccules aboutissant à un réseau trans-golgien (TGN). Les protéines sont délivrées à la membrane plasmique par exocytose, ou à la vacuole par le trafic cellulaire pour les protéines du tonoplaste (non représentées sur ce schéma). En parallèle, les protéines membranaires ainsi que des molécules extracellulaires peuvent être internalisées par endocytose au niveau des endosomes précoces. Les protéines membranaires peuvent soit être recyclées et réadressées à la membrane plasmique, soit dégradées dans la vacuole via les compartiments multi-vésiculaires (MVB, ou endosome tardif) qui fusionnent avec la vacuole lytique.

Le trafic cellulaire à destination (exocytose) et en provenance de la membrane plasmique (endocytose/recyclage) peut donc contrôler l'abondance et l'activité des transporteurs de sucres, participant aux réponses de la cellule à son environnement. Au-delà d'une régulation transcriptionnelle et leur synthèse *de novo*, l'adressage des transporteurs de sucres à la membrane plasmique peut-être régulé afin d'augmenter ou de limiter les échanges de sucres entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Figure E.18, régulation 1). De même, une régulation des transporteurs tonoplastiques peut influencer les échanges entre la vacuole et le cytoplasme.

Très récemment, une étude a démontré, chez les transporteurs plasmémiques de la sous-famille STP d'*Arabidopsis*, la présence d'un signal d'export du RE correspondant à 3 résidus aromatiques en C-terminal, nécessaire à l'adressage à la membrane plasmique (Yamada *et al.*, 2017). La mutation de ce signal d'export non seulement a entraîné un défaut d'adressage et une rétention dans le RE des protéines STP1 et STP13 chez des cellules végétales, mais également une inhibition de l'entrée de glucose après expression hétérologue chez la levure (Yamada *et al.*, 2017). Ceci illustre l'importance de la localisation subcellulaire des transporteurs pour leur fonction physiologique.

Pour les protéines déjà présentes dans les membranes, un autre niveau de régulation peut avoir lieu à l'échelle de la protéine, par des modifications post-traductionnelles ou par des interactions protéines-protéines et/ou

encore par des processus de dynamique membranaire décrits précédemment en lien avec un trafic vésiculaire (Figure E.18).

Les données montrant une régulation des transporteurs de sucres par des modifications post-traductionnelles *via* des phosphorylations de résidus de ces protéines sont assez rares. Cependant les travaux de Roblin et collaborateurs (1998) ont été les premiers à montrer que l'absorption du saccharose liée par la force protomotrice est inhibée dans les vésicules de membrane plasmique préparées à partir de feuilles de betterave sucrière (*Beta vulgaris* L., Bv) et infiltrées avec l'acide okadaïque, un inhibiteur de protéines phosphatases. Les auteurs ont suggéré que le transporteur de saccharose semble être actif lorsqu'il est sous une forme déphosphorylée et inactif sous une forme phosphorylée (Roblin *et al.*, 1998). Par la suite, Ransom-Hodgkins et collaborateurs (2003) ont confirmé l'effet inhibiteur sur l'activité du transport de saccharose, lorsque les protéines phosphatases sont inhibées. Par contre, des résultats contradictoires ont été obtenus lors de traitements avec des inhibiteurs de protéines kinases qui semblent augmenter ou ne pas avoir d'effet sur l'activité du transport de saccharose de BvSUT1 (Ransom-Hodgkins *et al.*, 2003). Des études par des approches de phosphoprotéomiques chez *Arabidopsis* ont permis d'identifier des sites putatifs de phosphorylation pour des transporteurs de saccharose et de monosaccharides (Nühse *et al.*, 2004 ; Niittylä *et al.*, 2007). Récemment, il a été montré pour la première fois une régulation par phosphorylation du transporteur de monosaccharide AtSTP13, essentielle à son activité dans un contexte d'IPM (développé dans le paragraphe IV.1. La régulation des flux de sucres de la plante à l'interface plante/microorganisme pathogène ; Yamada *et al.*, 2016). La régulation de l'activité des transporteurs de sucres par phosphorylation peut donc être un mécanisme commun possible pour les transporteurs de saccharose et d'hexoses.

L'exemple le plus connu de régulation à l'échelle de la protéine par dynamique membranaire, est celui du transporteur de glucose GLUT4, chez les mammifères. En effet, en réponse à l'insuline il se déplace entre la membrane plasmique et des compartiments intracellulaires de stockage, dans des cellules musculaires et adipeuses. L'insuline stimule rapidement le transport de glucose par un recrutement réversible des protéines GLUT4 à la membrane plasmique où elles s'activent (Figure E.18, régulation 3). Au contraire, en absence d'insuline, GLUT4 est séquestrée dans des compartiments intracellulaires, réduisant ainsi sa concentration à la membrane plasmique (Leto and Saltiel, 2012).

Chez les plantes, les travaux de Krügel et collaborateurs (2008 et 2012), réalisés chez la levure ou en plante, ont montré que le transporteur SISUT1 de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* SUT1) est également régulé par dynamique membranaire en réponse à des agents oxydants. Cette oxydation a un effet sur l'adressage à la membrane plasmique et la dimérisation de la protéine, mais également sur l'augmentation de l'activité du transporteur (Krügel *et al.*, 2008). De plus, ces travaux ont montré la présence de StSUT1 sous forme de monomères (majoritairement) et de dimères dans des fractions résistantes aux détergents, correspondant à des microdomaines de la membrane plasmique. D'autres auteurs ont également montré la capacité des transporteurs SUT à interagir entre eux ou avec d'autres protéines. Reinders et collaborateurs (2002) et Schulze et collaborateurs (2003), utilisant le système split ubiquitine en levure, ont montré que des

membres des classes SUT1, SUT2 et SUT4 de la tomate (*Solanum lycopersicum*, SI) et d'Arabidopsis étaient capables de former aussi bien des homo- que des hétéro-dimères. *In planta*, une preuve supplémentaire de l'homo-dimérisation de StSUT1 démontrée dans les microdomaines chez la pomme de terre, a été menée par une approche split-YFP dans des cellules de tabac (Krügel et al., 2008). De plus, ces dimères ont la capacité d'absorber du saccharose chez la levure démontrant leur fonctionnalité (Reinders *et al.*, 2002). Des études plus récentes révèlent une interaction entre StSUT1 et de nombreuses protéines des microdomaines, dont une protéine disulfure isomérase (PDI), qui elle-même interagit également avec StSUT4 et SISUT2. La PDI interviendrait comme protéine chaperon dans le contrôle de l'oligomérisation et l'adressage des SUT à la membrane plasmique et/ou aux microdomaines (Krügel *et al.*, 2012 ; Figure E.18, régulation 2). Enfin, les travaux de Liesche et collaborateurs (2010) montrent que l'adressage et le recyclage à la membrane de StSUT1 sont contrôlés par endocytose (probablement en association avec les microdomaines) entraînant soit sa dégradation dans la vacuole, soit son recyclage à la membrane plasmique (Figure E.18, régulation 4).

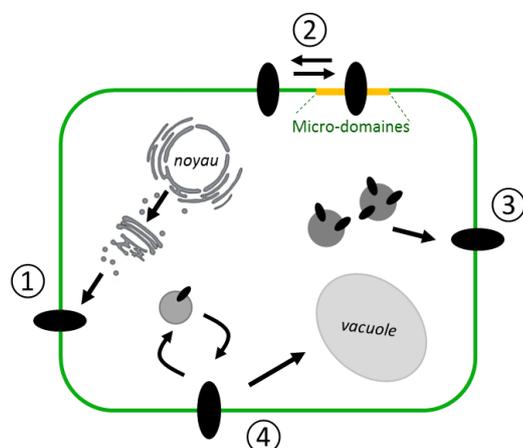


Figure E.18 : Schéma hypothétique et simplifié représentant les différentes régulations de dynamique membranaire de transporteurs de sucres plasmalemmiques à l'échelle de la cellule. ① Régulation de la synthèse *de novo* du transporteur et adressage à la membrane plasmique ② Régulation positive ou négative des transporteurs dans des zones particulières de la membrane plasmique (microdomaines). ③ Mobilisation à partir de réservoirs intracellulaires et adressage à la membrane plasmique par exocytose. ④ Dégradation à la vacuole et/ou recyclage du transporteur par endocytose.

La dimérisation des monomères (homo- et hétérodimères) dans la famille SWEET chez Arabidopsis a également été démontrée par des expériences de split ubiquitine chez la levure ; certaines interactions ont été confirmées *in planta* par split GFP (Xuan *et al.*, 2013). Ces premières études sur l'oligomérisation des SWEET, utilisant des mutants dominants négatifs ont montré l'importance de l'oligomérisation pour leur fonction. Les transporteurs SWEET ne contiennent que 7 domaines transmembranaires par rapport aux transporteurs SUT/MST qui en possèdent 12. Les auteurs ont suggéré que l'oligomérisation de deux SWEET pourrait permettre la formation d'un pore membranaire permettant le transport de sucres. Cependant, ils peuvent être fonctionnels sous forme de monomère, cette structure pourraient être suffisante à l'activité du transport (Xuan *et al.*, 2013). De même, une étude récente a révélé chez le riz que le transporteur OsSWEET2b, localisé au niveau du tonoplaste, semble être fonctionnel sous forme de monomère (Tao *et al.*, 2015). Ces auteurs ont également observé la formation d'homotrimères de ce transporteur. La formation de ces macro-complexes permettrait la régulation de l'activité du transport, par changement de conformation des protomères du complexe, induisant une modification de la capacité du transport. Mais les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces régulations doivent encore être élucidés.

Les transporteurs de sucres peuvent donc former des homo- et/ou des hétéro-oligomères, indiquant que leur activité de transport, leur localisation et leur dynamique peuvent donc être régulés par des interactions

protéines-protéines. Les données disponibles sur la régulation des transporteurs de sucres *via* le trafic cellulaire sont rares chez les plantes et ne concernent pour l'instant que quelques candidats de la famille SUT ou MST (STP). L'existence de mécanismes similaires pour d'autres transporteurs n'est pas à exclure mais reste à identifier notamment lors des différentes interactions entre plantes et microorganismes.

IV. Les sucres, un élément essentiel à l'interface biotrophe pour le devenir des IPM

Lors du déchargement du phloème vers les organes puits, le saccharose ou ses dérivés peuvent être également transférés à des organes puits non végétaux, comme par exemple les structures dérivées de la colonisation des racines par les CMA ou par des microorganismes pathogènes. Ces sucres apoplasmiques représentent en effet une ressource énergétique potentiellement exploitable par ces microorganismes telluriques, étant hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Ils sont donc fortement dépendants de l'approvisionnement des sucres excrétés par la plante hôte pour leur nutrition et leur métabolisme. La nature des sucres disponibles au niveau de l'apoplasme est importante, car le glucose est très préférentiellement utilisé par les microorganismes, par rapport au saccharose et au fructose (Sutton *et al.*, 1999 ; Hall and Williams, 2000 ; Schübler *et al.*, 2006 ; Nehls *et al.*, 2010). La colonisation des racines de la plante par ces microorganismes représente une demande accrue en sucre, interférant avec la balance source/puits de la plante, ce qui va modifier les mécanismes de transport et les activités des enzymes de clivage du saccharose, impactant *in fine* la répartition des sucres à l'échelle de la plante entière (Biemelt and Sonnewald, 2006 ; Doidy *et al.*, 2012a).

Dans la partie suivante, nous discuterons du rôle des acteurs associés lors de ces phénomènes de compétition à l'interface biotrophe, uniquement du côté de la plante, bien que les "mêmes types d'acteurs" doivent être présents chez les microorganismes (moins bien identifiés et caractérisés). Nous nous focaliserons au niveau de l'interface plante/microorganisme pathogène et l'interface plante/CMA.

1. La régulation des flux de sucres de la plante à l'interface plante/microorganisme pathogène

Lors d'interactions pathogènes, les microorganismes détournent les sucres nécessaires à leur survie, au détriment des cellules végétales. La plante hôte perçoit les microorganismes pathogènes comme des "puits étrangers" (Naseem *et al.*, 2017) et va, en plus d'activer son système de défense, tenter de priver les agents pathogènes des sucres apoplasmiques, en les récupérant par l'action des transporteurs de sucres agissant en synergie avec les invertases pariétales. La plante et les agents pathogènes transforment l'espace extracellulaire en une course aux sucres afin d'acquiescer/sauvegarder ces ressources énergétiques (Naseem *et al.*, 2017).

Le saccharose apoplasmique peut être pris en charge directement par des agents pathogènes qui possèdent des transporteurs SUT. A ce jour, un seul transporteur SUT a été identifié chez un champignon pathogène (*Ustilago maydis*), nommé UmSRT1 (Wahl *et al.*, 2010). Durant l'interaction maïs/*U. maydis*, une

compétition pour le saccharose apoplasmique a été observée dans la zone de contact entre le champignon et la plante hôte, par l'intervention des transporteurs des deux « partenaires » ZmSUT1 et UmSRT1 (Wippel *et al.*, 2010). L'absorption directe du saccharose est considérée comme une stratégie mise en place par l'agent pathogène pour empêcher l'induction des réactions de défense qui sont généralement déclenchées suite à la modification de la concentration en glucose, libéré par l'hydrolyse du saccharose apoplasmique (Ehness *et al.*, 1997).

Cependant les hexoses, et plus particulièrement le glucose, sont la ressource carbonée préférentiellement absorbée par les agents pathogènes. Les invertases apoplasmiques sont donc des éléments clés dans la libération de ces hexoses libres dans l'apoplasme. Différentes études ont indiqué une modulation d'activités invertase dans les tissus infectés en réponses à des agents pathogènes dans différentes plantes (Tauzin and Giardina, 2014). A ce jour, il semble difficile de distinguer la contribution respective des invertases de plantes ou de microorganismes pathogènes à l'augmentation de telles activités (Doïdy *et al.*, 2012a ; Lemoine *et al.*, 2013), bien que peu d'études aient démontré le rôle des invertases fongiques dans l'augmentation de telles activités (Ruiz and Ruffner, 2002 ; Voegelé *et al.*, 2006). Récemment une étude a montré chez *Arabidopsis* que le champignon pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea* possède sa propre machinerie de clivage de saccharose facilitant la libération d'hexoses et leur absorption par des transporteurs d'hexoses, indépendamment des invertases pariétales de la plante hôte (Veillet *et al.*, 2016). Les deux partenaires semblent activer leurs invertases, ayant pour conséquence une augmentation de la force puits, permettant un déchargement de saccharose dans l'apoplasme et son hydrolyse. Les hexoses ainsi générés peuvent être la cible des agents pathogènes qui expriment des transporteurs de glucose et de fructose. Une réponse de la plante peut être de récupérer les hexoses localisés dans l'apoplasme par l'expression de transporteurs d'hexoses, limitant ainsi les ressources carbonées aux agents pathogènes.

Différentes régulations des flux de sucres et de l'expression des transporteurs de sucres de plantes ont été observées en réponse à différents microorganismes pathogènes. L'expression d'un gène codant un transporteur de monosaccharide symport/H⁺, nommé STP4 est rapidement induite chez *Arabidopsis* en présence d'éliciteurs et/ou lors d'infection par des bactéries ou champignons pathogènes (Truernit *et al.*, 1996 ; Fotopoulos *et al.*, 2003). De même, le champignon pathogène *B. cinerea* augmente l'import du glucose dans des cellules de pin (*Pinus pinaster*) via un symport glucose/H⁺ (Azevedo, 2005) et stimule l'expression du transporteur d'hexose AtSTP13 chez des cellules d'*Arabidopsis* (Lemonnier *et al.*, 2014). L'augmentation de l'expression de ce dernier semble jouer un rôle dans la résistance à l'agent pathogène. Récemment, Yamada et collaborateurs (2016) ont montré un mécanisme de privation des sucres apoplasmiques mis en place par la plante en réponse à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, lié à l'immunité basale et à la régulation du système de transport par phosphorylation. Chez *Arabidopsis*, l'infection par la bactérie induit une augmentation de l'activité des invertases pariétales, ce qui va augmenter les niveaux en hexoses libres dans l'apoplasme. Cependant, afin de « priver » l'agent pathogène de cette source trophique, le transporteur AtSTP13, dont l'expression est induite en réponse à la flg22, va interagir directement avec FLS2 le récepteur

de la flg22. Le co-récepteur BAK1, qui interagit avec FLS2 et donc avec AtSTP13, phosphoryle le transporteur pour permettre une augmentation de son activité, permettant l'import d'hexoses dans la cellule végétale, limitant ainsi la croissance de la bactérie pathogène. La mutation d'AtSTP13 augmente la sensibilité de l'hôte à l'infection par la bactérie, en raison de la disponibilité des hexoses par inhibition de l'activité du transporteur. Le transporteur AtSTP13 joue donc un rôle essentiel dans la résistance à certains agents pathogènes. De plus ces travaux montrent pour la première fois une régulation post-traductionnelle par phosphorylation d'un transporteur de sucres lors des IPM. Les travaux de Moore et collaborateurs (2015), ont permis l'identification d'un gène appelé *Lr67* chez le blé induit en réponse à l'infection par le champignon pathogène *Puccinia triticina*, codant l'homologue de AtSTP13. Un allèle muté de ce gène (appelée *Lr67* résistant) code une forme non fonctionnelle de transporteur qui confère une résistance partielle aux agents pathogènes de la rouille du blé et de l'oïdium, par perte de la capacité d'import d'hexoses. Ces derniers restent dans l'apoplasme ce qui modifie la balance hexoses/saccharose entraînant une signalisation glucidique qui déclenche les mécanismes de défenses. Comme introduit précédemment, les sucres apoplasmiques (saccharose et glucose) représentent des molécules de signalisation importantes pour la plante dans la régulation de la défense en contrôlant l'expression de gènes de défense (Rolland *et al.*, 2006; Lemoine *et al.*, 2013), un concept pour lequel les sucres apoplasmiques, et plus particulièrement la modification de la balance hexoses/saccharose, permettraient la mise en place de mécanismes de défense (« sweet immunity concept » ou « sugar-enhanced defence » ; Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2013). Ces exemples peuvent mettre en avant différentes stratégies que déploient les cellules végétales lors des interactions biotiques en fonction des modes de vie des microorganismes avec lesquelles elles interagissent.

En plus des MST, les SWEET sont également régulés lors des interactions avec des microorganismes pathogènes. Chen et collaborateurs (2010) ont montré que la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et les champignons pathogènes *G. cichoracearum* et *B. cinerea*, induisent une augmentation de l'expression de 7 gènes codant des SWEET chez *Arabidopsis*. *B. cinerea*, induit également l'expression du gène *VvSWEET4* (orthologue d'*AtSWEET4* également induit) chez la vigne qui permet le transport de glucose à la membrane plasmique. Les mutants *Atsweet4* sont plus résistants à *B. cinerea*, indiquant le rôle de SWEET4 dans le développement du champignon nécrotrophe *via* une acquisition des sucres facilitée par la plante hôte (Chong *et al.*, 2014). A l'opposé, le gène codant la protéine tonoplastique AtSWEET2 est fortement induit dans les racines d'*Arabidopsis* en réponse à l'infection par l'oomycète pathogène nécrotrophe *Pythium irregulare*. Les mutants *Atsweet2* sont plus sensibles à l'agent pathogène et exportent plus de glucose dans l'apoplasme. Ainsi, l'augmentation de l'activité AtSWEET2 contribuerait, *via* un import de glucose dans la vacuole, à la résistance de *Pythium* en empêchant la perte de sucre dans la rhizosphère (Chen *et al.*, 2015). Chez le riz, les transporteurs SWEET peuvent être également la cible de bactéries pathogènes qui ont développé des mécanismes afin d'acquérir les sucres de la plante. Il a été montré que la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sécrète des effecteurs activateurs de transcription (TALE) qui vont activer l'expression des gènes *OsSWEET11* et *OsSWEET14* en se liant à leurs régions promotrices (Yang *et al.*, 2006 ; Antony *et al.*, 2010

; Chen *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2011). La mutation de la région promotrice où se fixent les TALE empêcherait l'augmentation de l'expression d'*OsSWEET11* induite par l'agent pathogène. Ainsi, la résistance à la bactérie se développe, car sa capacité à acquérir du sucre de la plante hôte est bloquée. L'induction de gènes codants des SWEET du clade III en réponse à des TALE a également été retrouvée dans d'autres interactions impliquant la bactérie du genre *Xanthomonas* et le manioc et/ou le citronnier (Hu *et al.*, 2014; Cohn *et al.*, 2014). Cette modulation de l'expression des gènes de transporteurs de sucres de la plante induite par les pathogènes, modifie des flux de sucres au niveau du site d'infection, libérant des sucres utilisables par les agents pathogènes pour leur développement et entraînant en contrepartie un effet négatif sur la croissance de la plante. Cette capacité de « manipuler » l'expression des transporteurs de l'hôte peut être essentielle à l'induction de la maladie par les agents pathogènes qui prolifèrent dans les tissus de l'hôte.

2. La régulation des flux de sucres de la plante à l'interface plante/champignon mycorhizien

Lors de la MA, des protéines spécifiques du transport du saccharose et de monosaccharides sont présentes à l'interface symbiotique. Les CMA absorbant préférentiellement du glucose (Schüßler *et al.*, 2006), leur développement dépend fortement des hexoses libérés par l'hydrolyse du saccharose par les enzymes de clivage de la plante hôte. La plante doit donc entrer en compétition pour les ressources carbonées en limitant leurs accès pour les agents pathogènes, tout en favorisant les échanges avec les interactions mutualistes. La régulation des systèmes d'acquisition des ressources carbonées est ainsi essentielle pour déterminer le devenir de l'interaction.

Il a été montré que l'activité enzymatique des INV-P ainsi que de la SuS, augmente dans les racines de soja mycorhizées (Schubert *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que l'expression du gène *LIN6* codant pour une INV-P de la tomate est induit dans les cellules colonisées (Schaarschmidt *et al.*, 2006), tout comme l'augmentation de l'expression du gène *MtSucS1* codant une SuS a été détectée dans les racines colonisées (Hohnjec *et al.*, 2003). D'autres études ont également rapporté une augmentation de l'activité et de l'expression des invertases (INV-P, INV-C et INV-V) et de la SuS dans les racines mycorhizées de diverses plantes (Wright *et al.*, 1998 ; García-Rodríguez *et al.*, 2007 ; Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008). Cette régulation positive semble indiquer que le clivage du saccharose se produit aussi bien dans l'apoplasme et le cytoplasme de l'hôte, avant le transfert de monosaccharides à l'interface biotrophe. Aucune enzyme de clivage du saccharose n'a été identifiée dans le génome des CMA, indiquant que principalement les INV-P et les SuS végétales semblent être nécessaires à l'établissement de la MA. En effet, la perturbation de l'expression de l'INV-P et/ou de la SuS (*MtSucS1*) a des effets délétères sur le développement des arbuscules et le fonctionnement de la MA (Schaarschmidt *et al.*, 2007 ; Baier *et al.*, 2010). Néanmoins, il est à noter que même si une inhibition partielle de l'activité INV-P chez *N. tabacum* a engendré une diminution de l'intensité de la mycorhization (baisse du nombre d'arbuscules), une surexpression de l'INV-P n'a eu aucun effet (Schaarschmidt *et al.*, 2007). Ceci montre que si l'INV-P est essentielle au fonctionnement de la MA *via* la mise à disposition d'hexoses, elle n'est pas le seul point de contrôle de la MA.

En plus d'une régulation transcriptionnelle des enzymes du métabolisme du saccharose, les gènes codants les transporteurs de sucres sont aussi régulés positivement dans les racines mycorhizées. Ces exemples de régulation sont présentés dans le chapitre de livre Drain, Pfister et al. 2017, présenté en Annexe 1 partie « Transport des éléments carbonés des feuilles aux partenaires fongiques ».

De manière intéressante, un transporteur essentiel à la mycorhization, SUT2, dont le gène est exprimé dans les cellules arbusculées chez la tomate est régulé par dynamique membranaire. En effet, il interagit avec des protéines localisées dans des vésicules suggérant son internalisation (Bitterlich *et al.*, 2014). Ce transporteur SISUT2 contrôle négativement la disponibilité en saccharose pour les CMA en limitant leur expansion colonisatrice dans les racines. La recherche de protéines interagissant avec ce transporteur a révélé la présence de protéines ayant un rôle dans la fusion de vésicules et d'autres associées à des domaines particuliers de la membrane ou localisées dans des vésicules intracellulaires (Krügel *et al.*, 2012 ; Bitterlich *et al.*, 2014 ; Kühn, 2016). Notamment, le co-récepteur BAK1 et la protéine MSP1 (Membrane Steroid binding Protein 1) interagissent avec SISUT2 à la membrane péri-arbusculaire. Suite à l'interaction BAK1-MSBP1-SUT2, l'internalisation de ce complexe a pour fonction d'inhiber l'activité de SISUT2, limitant ainsi l'apport de saccharose au niveau de la membrane péri-arbusculaire.

La plante est « confrontée au dilemme » de vouloir libérer des sucres pour attirer les mutualistes mais attire également par ce biais des agents pathogènes.

V. Ma contribution à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires des IPM dans les stades précoces : pourquoi (mes objectifs) et comment (mes modèles d'étude)

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de recherches menées pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant influencer le devenir des interactions entre les plantes et les microorganismes. Ils ont porté sur des analyses comparatives d'événements des voies de signalisation précoces déclenchés après la perception de molécules microbiennes, mimant ainsi leurs interactions avec des microorganismes, par les cellules de tabac en culture. A la fois la comparaison de différents types de molécules microbiennes et l'influence de la dynamique membranaire ont été abordés. Dans ce contexte de stress biotique, la régulation des échanges de sucres au niveau de la plante a été questionnée par (i) l'analyse des flux, (ii) l'expression de gènes de transporteurs de sucres ou bien encore (iii) l'analyse *in silico* de l'interactome de transporteurs de sucres chez les cellules végétales. Au cours de mes travaux, j'ai abordé en parallèle trois axes qui seront présentés en 3 chapitres dans ma thèse.

1. Le premier objectif de ma thèse était de déterminer si des cellules indifférenciées de tabac (*N. tabacum* cv. Xanthi) étaient capables de percevoir des molécules microbiennes provenant de microorganismes à stratégies trophiques différentes et de développer des réponses spécifiques associées. Dans un premier

point, j'ai caractérisé et comparé des événements de signalisation induits par ces molécules. La première molécule est la cryptogéine, un éliciteur protéique de réactions de défense sécrété par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* qui mime une interaction incompatible : dont les événements de signalisation cellulaire et certaines réponses de défense sont bien établis, impliquant notamment une inhibition de l'entrée de glucose par des mécanismes encore inconnus. Les deuxièmes types de molécules microbiennes sont les facteurs Myc, LCO et CO4, impliqués dans le dialogue moléculaire entre la plante et le CMA pour lesquels les connaissances sur la signalisation cellulaire précocement induite sont rares. Dans un second point, j'ai analysé si ces molécules étaient capables de modifier les flux de sucres à travers la membrane plasmique et de réguler l'expression de transporteurs de sucres à l'échelle cellulaire.

2. Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier le rôle du trafic cellulaire dans la signalisation, et plus particulièrement de questionner si un élément de la dynamique membranaire lié à la clathrine pouvait influencer les réponses cellulaires déclenchées par la cryptogéine chez *N. tabacum*. Tout d'abord une étude comparative de la signalisation cryptogéine et des réponses cellulaires entre une lignée cellulaire sauvage et des lignées perturbées dans le trafic lié à la clathrine (générées au laboratoire avant mon arrivée) a été menée. Dans un deuxième point nous nous sommes interrogés sur l'effet de cette perturbation du trafic membranaire sur les flux de sucres et l'expression de gènes de transporteurs de sucres.
3. Dans le but d'approfondir les connaissances sur les événements de régulation des transporteurs de sucres, le troisième objectif a été d'établir un interactome des transporteurs de sucres en utilisant une ressource disponible pour étudier *in silico* des événements d'interactions protéines-protéines (IPP) au niveau de membranes cellulaires. Pour cela, j'ai utilisé la base de données Membrane-based Interactions Network Database (MIND). Le but de ces recherches étaient d'identifier des protéines régulatrices putatives en interaction avec les transporteurs de sucre chez la plante modèle *A. thaliana*, notamment lors de contraintes biotiques, permettant de proposer de nouvelles hypothèses de régulation des transporteurs de sucres.

**MATÉRIELS
&
MÉTHODES**

I. Matériels biologiques et traitements

Sauf indication les produits chimiques utilisés sont commercialisés par Sigma-Aldrich.

1. Cultures cellulaires et condition de culture

La plante modèle utilisée pour ma thèse est *Nicotiana tabacum*, une dicotylédone appartenant à la famille des Solanaceae. Différentes lignées cellulaires de *N. tabacum* cultivar (cv.) Xanthi cultivées en suspension ont été utilisées lors de ces travaux. Les cellules ont été cultivées à 25°C sous agitation à 150 rpm en lumière continue (30-40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) dans un milieu de culture approprié pour chaque lignée cellulaire.

Les cellules de tabac cv. **Xanthi** ont été cultivées dans le milieu (Chandler *et al.*, 1972) à pH 5,6 contenant 4,30 g/L de sels MS (Murashige et Skoog, MO256 medium, Duchefa), 0,2 g/L de L-glutamine, 0,107 g/L de kinétine, 30 g/L de saccharose, 0,1 g/L d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et 15 g/L de pantothénate de calcium.

Différentes lignées cellulaires Xanthi ont été utilisées :

- la lignée de cellules non transformées (wild type, **WT**).
- les lignées **Hub** (Hub1.5, Hub7.6 et Hub14.11) provenant de feuilles de plantes exprimant la partie 3' du gène de la chaîne lourde de clathrine (appelé le hub), et obtenues *via* un milieu d'induction de la callogenèse par Adam et collaborateurs (2012). Ces cellules comportent une résistance à l'hygromycine.
- la lignée **gp15** exprimant la construction anti-sens de la NADPH oxydase membranaire *NtrbohD* (Simon-Plas *et al.*, 2002). Ces cellules sont résistantes à la kanamycine.
- la lignée **Xanthi** exprimant le gène codant la forme non fonctionnelle de l'**aequorine** (apoequorine) exprimée dans le cytosol (Manzoor *et al.*, 2012).

Ces suspensions cellulaires ont été repiquées en fin de phase exponentielle tous les 7 jours dans un milieu Chandler frais à raison d'une dilution de 15:100, (v/v).

2. Préparation des lignées cellulaires pour les différentes expériences

Pour toutes les expériences, 24 h avant leur utilisation les cellules des différentes lignées cv. Xanthi, à 7 jours de culture ont été diluées au demi par addition de milieu de culture neuf.

Avant traitement, les cellules ont été récupérées par filtration puis lavées à 2 reprises avec un tampon d'équilibration I₂ (175 mM de D-mannitol, 0,5 mM de CaCl₂, 0,5 mM de K₂SO₄ (Prolabo), 2 mM de MES, ajusté à pH 5,8). A raison de 0,15 g de poids frais de cellules par mL de tampon I₂, les cellules ont été équilibrées pendant 2 h à 25°C sous agitation (150 rpm).

Les cellules Xanthi exprimant l'aequorine dans le cytosol ont été lavées à 2 reprises avec un tampon d'équilibration I₁₀ (175 mM de D-mannitol, 0,5 mM de CaCl₂, 0,5 mM de K₂SO₄ (Prolabo), 10 mM de MES, ajusté à pH 5,8) et équilibrées à raison de 0,15 g de poids frais de cellules par mL de tampon I₁₀ pendant 3 h à 25°C sous agitation (150 rpm) à l'obscurité. Dès le début de l'équilibration, la reconstitution *in vivo* de

l'aequorine a été débutée par l'addition de 1 μM de coelentérazine (Calbiochem, à partir d'une solution mère préparée dans de l'éthanol et stockée à -20°C). La coelentérazine étant sensible à la lumière, les cellules ont été maintenues à l'obscurité depuis le début de l'équilibration jusqu'à la fin des expérimentations.

3. Traitements des cultures cellulaires

La **cryptogéine** produite à partir de filtrats de culture de l'oomycète *Phytophthora cryptogea* selon le protocole décrit par Bonnet et collaborateurs (1996) a été fournie par le Dr S. Bourque (UMR Agroécologie, INRA de Dijon). Elle a été conservée à -20°C dans de l'eau ultra pure et utilisée à une concentration finale de 50 nM.

Les facteurs Myc **Lipo-ChitoOligosaccharides** (LCO) et **ChitOtetrasaccharides** (CO4) produits par synthèse totale (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble) et ont été fournis par le Pr. Guillaume Bécard (UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Castanet-Tolosan) et Fabienne Maillet (UMR2594, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Castanet-Tolosan). Les **LCO** sont composés de tétramères de chitine (LCO-IV) et peuvent être sulfatés (S) ou non (nS) sur le sucre réducteur, ce dernier portant un acide gras en C16:0 (acide palmitique) ou C18:1 (acide oléique) saturé ou non (Maillet *et al.*, 2011). Nous avons travaillé avec 4 formes de LCO : LCO-IV(C16:0, S) ; LCO-IV(C16:0, nS) ; LCO-IV(C18:1, S) et LCO-IV(C18:1, nS). Ils ont été dissous dans un mélange d'eau ultra pure/acétonitrile (50:50, v/v), vortexés et soniqués 3 fois durant 15 sec avant chaque utilisation. Ces molécules ont été utilisées sous forme d'un mélange équimolaire ou isolées à une concentration finale de 100 nM. Les dilutions ont été effectuées de manière à assurer une concentration finale en acétonitrile n'excédant pas 0,05 % (v/v). Les **CO4** correspondent à de courtes chaînes de chitines non acylés et ont été utilisés à une concentration finale de 100 nM. Les solutions stocks de LCO et de CO4 ont été conservées à -20°C .

Le **DPI** (DiPhenyl Iodonium), un inhibiteur pharmacologique de la production de FAO médiée par des flavoenzymes comme les NADPH oxydases (Pugin *et al.*, 1997), a été préparé dans du DMSO et a été ajouté 5 min avant le traitement des suspensions cellulaires à une concentration finale de 5 μM . Les dilutions ont été effectuées de manière à assurer une concentration finale en DMSO n'excédant pas 0,05 % (v/v). Pour les témoins un volume égal de 0,05 % (v/v) de DMSO a été ajouté aux suspensions cellulaires.

La sonde **FM4-64** (FM pour Fei Mao, nom du chimiste qui a développé cette sonde, Molecular Probes), composé styryl marqueur lipophile d'endocytose ne fluoresçant que dans un environnement hydrophobe, a été préparé dans de l'eau à la concentration de 17 μM et utilisé à la concentration de 4,25 nM. Il est ajouté aux cellules 5 min avant l'ajout de cryptogéine.

II. Méthodes

1. Mesures d'évènements de signalisation cellulaire

1.1 Mesure des variations de la concentration en calcium libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$)

Après la reconstitution *in vivo* de l'aequorine (voir paragraphe précédent « préparation des lignées cellulaires pour les différentes expériences »), l'émission de luminescence a été mesurée à l'aide du luminomètre Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Allemagne). Pour cela, 250 μ L de suspension cellulaire ont été transférées délicatement dans un tube de luminomètre, où ont été ajoutées les molécules microbiennes d'intérêts. Le tube a été rapidement et délicatement placé dans la chambre du luminomètre pour l'enregistrement en continu des mesures de luminescence avec un intervalle d'1 seconde pendant 60 min. Les valeurs exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) ont été enregistrées en temps réel sur ordinateur et l'utilisation du logiciel Win Term (Berthold) a permis de suivre graphiquement l'évolution des mesures. A la fin de la cinétique, l'aequorine fonctionnelle résiduelle, c'est-à-dire l'aequorine non consommée pendant l'expérience, a été quantifiée par l'ajout de 300 μ L de tampon de lyse (10 mM $CaCl_2$, 2 % Nonidet-P40, 10 % éthanol v/v) et l'augmentation résultante de la luminescence a été surveillée jusqu'à atteindre le niveau basal. Les données de luminescence en RLU ont été transformées en concentrations de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), en utilisant l'équation d'Allen *et al.*, 1977: $[Ca^{2+}] = \{(L_0/L_{max})^{1/3} + 118(L_0/L_{max})^{1/3} - 1\} / \{7 \times 10^6 - [7 \times 10^6 (L_0/L_{max})^{1/3}]\}$, où L_0 correspond à chaque valeur de RLU obtenue pendant la durée de l'expérience par seconde et L_{max} est la quantité totale de luminescence présente dans les 250 μ L de suspension.

1.2 Mesure de la production d' H_2O_2

La mesure de la production d' H_2O_2 a été déterminée par chimiluminescence à l'aide du même luminomètre que pour les mesures de calcium. Suite à l'équilibration des cellules dans le tampon I_2 , le bruit de fond de luminescence a été mesuré avant traitement des cellules (au temps 0). Après traitement des cellules avec la molécule d'intérêt, 250 μ L de suspension cellulaire ont été prélevés dans un tube de luminomètre à des temps donnés. Après transfert dans le luminomètre, la suspension contenue dans le tube est complétée automatiquement avec 50 μ L d'une solution de luminol à 0,3 mM et 300 μ L du tampon I_{50} (50 mM de MES, 175 mM de mannitol, 0,5 mM de $CaCl_2$, 0,5 mM de K_2SO_4 (Prolabo), pH 6,5). Les valeurs obtenues en RLU ont été ensuite converties en nanomoles d'équivalents H_2O_2 à l'aide d'une gamme étalon connue en H_2O_2 , réalisées sur les cellules non traitées. La quantité de photons émise est proportionnelle à la quantité d' H_2O_2 présente. La solution d' H_2O_2 utilisée a été préparée extemporanément à 10 mM par dilution d'une solution mère à 3 % (0,882 M). Les résultats ont été exprimés en nanomoles d'équivalents H_2O_2 par gramme de cellules.

1.3 Mesure du pH et de la conductivité extracellulaire

Le pH extracellulaire a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (PHM 220, Meterlab) au début et à la fin de chaque cinétique, en plongeant directement l'électrode dans la suspension cellulaire.

La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (HORIBA Twin Cond B-173, Technoparc, France) au début et à la fin de chaque cinétique, en déposant 30 μL de la suspension cellulaire sur la cellule de lecture de l'appareil.

1.4 Extraction de protéines totales solubles

Un échantillonnage de 5 mL de suspension cellulaire équilibrée dans le tampon I₂ a été effectué à différents temps (0, 5, 10, 30 et 60 min) après traitement ou non avec les molécules microbiennes. Les cellules ont été récoltées par filtration sur des filtres en fibre de verre GF/A (Whatman International Ltd., Royaume-Uni) et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Après broyage manuel des cellules congelées, 250 mg de broyat ont été additionnés de 400 μL de tampon d'extraction de protéines (50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM d'EDTA, 5 mM d'EGTA, 50 mM de β -glycérophosphate, 1 mM de Na_3VO_4 , 2 mM de DTT, 10 mM de NaF et 1 mM PMSF). Les extraits ont été incubés sur de la glace pendant 15 min puis centrifugés à 23 000g pendant 20 min à 4°C. Les surnageants contenant les protéines ont été prélevés et la concentration en protéines a été quantifiée selon la méthode décrite par (Bradford, 1976) en utilisant de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme référence. Des aliquots de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines additionnés de tampon Laemmli (Laemmli, 1970) ont été stockés à -20°C. Les surnageants restants (exempt de Laemmli) ont été stockés à -80°C.

1.5 Activité kinase en gel

Les activités de protéines kinases dépendantes ou indépendantes du Ca^{2+} ont été analysées par des mesures d'activité kinase en gel comme décrit précédemment par (Kameshita and Fujisawa, 1989), avec quelques modifications. Vingt μg d'extraits protéiques ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en condition dénaturante (SDS-PAGE) contenant différents substrats des protéines kinases: 0,14 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'histone III (HIII) ou 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de myelin basic protein (MBP). Après l'électrophorèse, le SDS a été éliminé par 2 lavages pendant 30 min avec un tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 20 % d'isopropanol v/v) puis 2 fois 30 min avec un tampon B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; 5 mM de β -mercaptoéthanol). Les protéines contenues dans le gel ont ensuite été dénaturées par 2 étapes de lavage pendant 30 min dans un tampon C (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 6 mM de guanidine, 5 mM de β -mercaptoéthanol) avant d'être re-naturées par 5 lavages successifs, dont 1 à 4°C pendant 16 h avec un tampon D (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 0,04 % Tween 40 v/v, 5-mercaptoéthanol 5 mM). Les gels ont été équilibrés pendant 1 h à température ambiante avec un tampon de phosphorylation E (HEPES 40 mM pH 7,5, MgCl_2 20 mM, DTT 2 mM) avec 0,5 mM de Ca^{2+} ou en l'absence de Ca^{2+} (ajout de EGTA 0,1 mM) suivi de 1 h dans le tampon E complété avec 15 μM d'ATP froid et 15 μCi [γ -³²P]-ATP (PerkinElmer, États-Unis). La réaction de phosphorylation a été arrêtée par différents lavages de gel avec un tampon F (5 % de TCA w/v; 1

% de pyrophosphate de potassium w/v). Les gels ont été séchés 1 h à 80°C (GelDryer, Bio-Rad, États-Unis) et les activités de protéines kinases ont été révélées par exposition d'un écran PhosphorImager (Molecular Dynamics Inc, États-Unis) ou par autoradiographie (Amersham Hyperfilm ECL, Royaume-Uni). La masse moléculaire apparente des protéines kinases a été estimée à l'aide de marqueurs moléculaires pré-colorés (Bio-Rad, États-Unis).

1.6 Immuno-détection des protéines

Des extraits protéiques de 10 µg ont été déposés sur une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (HybondC, Amersham, Royaume-Uni) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Trans-Blot SD, Bio-Rad, USA) pendant 40 min à 15 V, en utilisant une solution de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v), 20 % de méthanol (v/v)). Une étape de blocage de la membrane a été effectuée 1 h dans du tampon TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 à 0,05 % (v/v)) additionné de 2 % de BSA (m/v) à température ambiante sur un agitateur rotatif. La membrane a été incubée 1 h à température ambiante, avec un anticorps primaire polyclonal phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204) dirigé contre les peptides phosphorylés dilué au 1/5000^{ème} (Cell Signaling Technology, États-Unis) ou un anticorps polyclonal primaire ERK1/2 dilué au 1/1000^{ème} révélant les protéines kinases totales (ab196883 Abcam plc., Royaume-Uni). Ensuite, 3 lavages ont été réalisés avec du TBS-T pendant 10 min et les membranes ont été incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire approprié conjugué avec la peroxydase de raifort dilué au 1/10000^{ème} (Bio-Rad, USA). Les protéines immuno-réactives ont été révélées par électrochimiluminescence (ECL, LumiGLO, Cell Signaling Technology, États-Unis). La masse moléculaire apparente des protéines a été estimée à l'aide de marqueurs moléculaires pré-colorés (Bio-Rad, États-Unis).

1.7 Absorption de sucres radiomarqués dans les cellules de tabac

L'absorption de sucres par les cellules a été mesurée après ajout de 2 mM de sucres radiomarqués (glucose-D-¹⁴C ou saccharose-D-¹⁴C ou fructose-D-¹⁴C PerkinElmer, États-Unis) à 0,055 MBq/g de poids frais de cellules, 5 min avant le traitement par les molécules d'intérêts. Après chaque temps de traitement ou de contrôle sans traitement (0, 15, 30, 60 min), des duplicatas de 2 mL de suspension cellulaire ont été prélevés puis filtrés à l'aide d'une pompe à vide sur des filtres de fibres de verre GF/A (Whatman International Ltd., Royaume-Uni). Les cellules ont ensuite été lavées 1 min avec 10 mL de tampon I₂ puis 20 s avec 5 mL de ce même tampon. Les galettes cellulaires ont été récoltées, pesées et placées à 80°C pendant 16 h. Les poids secs ont été déterminés et les cellules séchées ont été placées dans des flacons de scintillation mélangées avec 10 mL de liquide de scintillation (Ultima Gold Ready-Safe Cocktail, PerkinElmer, États-Unis) afin d'évaluer la radioactivité de chaque échantillon à l'aide d'un compteur de scintillation liquide (Beckman Coulter LS6500 Liquid Scintillation Counter, États-Unis). Les mesures d'absorption de sucres ont été exprimées en µmol de glucose/saccharose/fructose par gramme de poids frais de cellules en fonction du temps.

1.8 Analyse de l'endocytose par internalisation de la sonde lipidique FM4-64 par microscopie confocale à balayage laser

Pour analyser l'endocytose, la sonde lipophile fluorescente FM4-64 a été ajoutée à 2 mL de suspension cellulaire équilibrée dans le tampon I₂ contenu dans un pilulier et agité pendant 5 min avant tout traitement, à 25°C et à l'obscurité tout le long de l'expérimentation, afin d'éviter les altérations spectrales de la sonde fluorescente. Après 5 min, les cellules ont été traitées ou non avec la cryptogéine et 15 µL de suspension ont été prélevés à différents temps (0, 5, 10, 15 min) et mis entre lame et lamelle. La fluorescence émise par la sonde a été mesurée à l'aide d'un microscope confocale à balayage (TCS SP2-AOBS LEICA Microsystems) entre 600 et 670 nm de longueurs d'onde d'émission, après excitation à l'aide d'un laser argon à 488 nm. Les structures ponctiformes rouges, proches de la membrane plasmique identifiées comme des vésicules endocytotiques, ont été dénombrées (d'une épaisseur inférieure à 3 µm), puis normalisées par le périmètre des cellules qui est mesuré à l'aide du logiciel « Image J » (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Cinq expériences biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque fond génétique, avec une analyse entre 5 et 35 cellules par temps et conditions de traitements.

1.9 Mesure de l'index mitotique

Le pourcentage de mitose a été mesuré tous les jours durant 7 jours, plus le 7^{ème} jour où les cellules Xanthi WT, Hub1.5 et Hub14.11 ont été diluées au demi (similaire à nos conditions expérimentales). Les cellules ont été décantées durant 5 min afin d'éliminer le milieu de culture. Les cellules ont été fixées dans un mélange éthanol absolu (3V/1V acide acétique) puis stockées à 4°C. La coloration des cellules a été effectuée en prélevant 100 µL de cellules fixées avec 1 µg.mL⁻¹ de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) qui va se lier aux bases adénines et thymines de l'ADN. Après 10 min à l'obscurité les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Photomicroscope Axiophot, Zeiss, Allemagne) en utilisant le filtre DAPI (G365 / FT395 / LP420 nm). L'expérience biologique a été répétée minimum 5 fois avec comptage de minimum 500 à 600 cellules par lignée et par jour.

1.10 Mesure de la mort cellulaire

La mort cellulaire a été mesurée par une double coloration des cellules avec le diacétate de fluorescéine (FDA) marqueur de viabilité et l'iodure de propidium (IP) agent intercalant des acides nucléiques de cellules mortes, comme décrit précédemment par Jones and Senft (1985). Les cellules Xanthi et Xanthi-hub ont été incubées à température ambiante avec 20 µg.mL⁻¹ de FDA et 1 µg.mL⁻¹ d'IP pendant 5 minutes. Le dénombrement de cellules mortes (noyaux marqués par l'IP en rouge) et viables (cytosol marqués en vert par le FDA) a été effectué après observation à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Photomicroscope Axiophot, Zeiss, Allemagne) en utilisant le filtre rhodamine (BP546 ± 12 / FT580 / LP590 nm) et celui de la fluorescéine (BP450-490 / FT510 / LP520 nm), respectivement. Les comptages ont été effectués au temps 0

et à 24 h après traitement. Le pourcentage de mort cellulaire a été calculé à partir du rapport nombre de cellules mortes sur le nombre de cellules totales (vivantes et mortes) multiplié par 100. L'expérience biologique a été répétée minimum trois fois avec comptage minimum de 500 cellules par expérience biologique.

2. Méthodes de Biologie Moléculaire

2.1 Analyses *in silico* des gènes codant les transporteurs de sucres chez le tabac

Afin d'identifier les séquences codantes des transporteurs de sucres putatifs chez le tabac, des recherches *in silico* de ces séquences ont été effectuées à l'aide de la base de données des Solanaceae (<http://solgenomics.net/>) utilisant les algorithmes BLAST (BLASTN, BLASTP et BLASTX, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et en interrogeant la base de données avec les séquences protéiques et/ou nucléiques des transporteurs de sucres publiés précédemment chez *M. truncatula* (Mt; <http://jcvl.org/medicago/>), *A. thaliana* (At; <https://www.arabidopsis.org/>) et *S. lycopersicum* (Sl) (Büttner, 2007; Chen *et al.*, 2010; Doidy *et al.*, 2012b; Reuscher *et al.*, 2014).

2.2 Analyses phylogénétiques

La construction des arbres phylogénétiques a été réalisée avec le programme MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). L'alignement des séquences d'acides aminés des transporteurs de sucres a été effectué à l'aide du programme d'alignement multiple de séquences ClustalW. Les arbres ont été construits en utilisant la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method) corrigée par le modèle statistique de correction de Poisson (Zuckerandl and Pauling, 1965), et par l'application des algorithmes Neighbor-Joining et BioNJ, avec une valeur de « bootstrap » de 500. Les arbres qui possèdent des branches ayant une valeur de robustesse inférieure à 50 % ont été éliminés, afin d'obtenir des branches robustes et des groupes valides.

2.3 Extraction des ARNs totaux et synthèse d'ADNc

Des prélèvements de 5 mL de suspension cellulaire équilibrée dans du tampon I₂ ont été effectués à 0, 30 min, 2 et 4 h après traitement ou non avec les molécules d'intérêts. Les cellules ont été récoltées par filtration sur des filtres en fibre de verre GF/A (Whatman International Ltd., Royaume-Uni) et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Après broyage manuel des cellules congelées, 100 mg de broyat ont été utilisés pour l'extraction et la purification des ARN totaux à l'aide du mini kit RNeasy Plant (Qiagen, Allemagne) suivant les instructions du fabricant. Les solutions d'ARN ont été traitées avec de la DNase DNA-free™ (Ambion, États-Unis) pendant 30 min à 37°C et arrêtées par l'ajout d'une solution stop à température ambiante, conformément aux instructions du fabricant. Après une centrifugation à 4000 g pendant 2 min, le surnageant contenant les ARN a été prélevé et conservé dans la glace pour la suite des expériences ou stockés à -20°C. La concentration ainsi que la pureté des ARN a été déterminée par mesure spectrophotométrie à

l'aide du Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, États-Unis). Le rapport de pureté a été déterminé grâce au rapport d'absorbance A260/A280.

La transcription inverse a été effectuée avec 1 µg d'ARN en utilisant le kit ImpromII™ Reverse Transcriptase (Promega, États-Unis), selon les instructions du fabricant.

2.4 Analyse de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les qPCR ont été réalisées à l'aide du système de PCR en temps réel ViiA™ 7 (Applied Biosystems, États-Unis) et du logiciel ViiA™ 7 v1.2, utilisant le kit GoTaq®qPCR Master Mix (Promega, États-Unis). Selon les expériences, les qPCR ont été réalisées soit en plaque de 96 ou de 384 puits. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 15 µL pour les plaques 96 (comprenant 2,5 ng d'ADNc, 3 µM de chacune des amorces sens et anti-sens et le tampon de réaction 1X comprenant le SYBR®Green I) et de 10 µL pour les plaques 384 (comprenant 2,5 ng d'ADNc, 6,7 µM de chacune des amorces sens et anti-sens et le tampon de réaction 1X comprenant le SYBR®Green I). L'amplification PCR a été réalisée selon le programme suivant : une étape de dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15 s à 95°C, puis une étape d'hybridation et d'élongation de 60 s à 60°C. La détection de l'amplification a été analysée à la fin de chaque cycle PCR en mesurant la fluorescence à 530 nm émise par la sonde dérivant du SYBR®Green I. Enfin une courbe de dénaturation a été réalisée afin d'estimer la qualité de l'amplification. Après une dénaturation des produits PCR durant 15 s à 95°C, les échantillons ont été incubés 60 s à 68°C, puis la température a été augmentée de 0,05°C par seconde jusqu'à 95°C et la fluorescence a été mesurée tous les 0,05°C/s.

Les amorces spécifiques de chaque gène ont été conçues à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). La séquence de l'amorce a été alignée contre l'intégralité des séquences des *NtSUT*, *NtSWEET*, et *NtMST* en utilisant l'algorithme BLASTN, et aussi testée par PCR *in silico* via le logiciel AmplifX (<http://crn2m.univ-mrs.fr/AmplifX?lang=en>) dans le but de s'assurer de sa spécificité. Les couples d'amorces utilisées et ayant une efficacité d'amplification supérieure à 85 %, ont été récapitulées dans le tableau MM.1

Afin de déterminer le niveau d'expression des différents gènes codants les transporteurs de sucres, la méthode de quantification relative par comparaison des cycles seuils (Ct) a été utilisée (méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La quantité des cibles étudiées a été normalisée par rapport à la moyenne des deux gènes de références, le gène codant la protéine ribosomale L25 et le gène codant le facteur de traduction EF1 α (Schmidt and Delaney, 2010) et contre les cellules non traitées à chaque point de mesure.

Les niveaux d'expressions des gènes de défense et de mort ont été déterminés également par la méthode $2^{-\Delta Ct}$ en utilisant le gène codant l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, *NtubC2* (Schmidt and Delaney, 2010) comme gène de référence.

Tableau MM.1 : Liste des amorces utilisées dans ce projet pour la qPCR. Les amorces utilisées pour la quantification des transcrits codant les transporteurs de sucres ont été créés manuellement à partir des séquences nucléiques de *N. tabacum* disponibles sur la base de données NCBI. Les amorces utilisées pour la quantification des transcrits des gènes de mort et/ou associées à la défense étaient disponibles au laboratoire.

Nom de l'amorce	Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
NtSUT1-1	MF140390	GGTTCCTACTCCCGCCTCTA	TTTTCGCGGACGACGGTTAGG
NtSUT1-2	AF149981.1	GTTCCAGTACTGCCACCACG	GCTGAACAATCATTCCAGAAATAGG
NtSUT2	MF140391	AGGTTGGCACAGATGGTTTC	AGCGATTGGTTTGCTTGAGT
NtSUT4	AB539539.1	AGCCTCTAGATCCCAATCATTGCTC	CACCATAAAATTTCTCGACCAAACCA
NtSWEET2a	XM_016629722.1	AAGATGCAGCTGGAATCGCC	CCATATATGTATGGCAATCCTGAG
NtSWEET2b	XM_016634622.1	GATAGGAGCAATTCTTGGCATCAT	TTCCCGCACAAAGAAAAGAATCAG
NtMST1	X66856.1	TCAGGAAGCAAAAAGGCAGATGA	CCATTGATCAAAGCTCCAGCACA
NtHub	JX262690	GAGGGGACCCAGCTTTCTT	ATTGCCAAATGTTTGAACGA
NtPAL	AB289452.1	TCCCCTTGCTCTACATTGCTGGTT	TCAATTTGTCCGGGGTGATGCTTC
NtLox	X78269.1	TTGGAGTTCAGGAGCATTC	GAAGATGCGATCTGACTTAT
NtPR1	NM_001325784.1	GGATGCCATAACACAGCTC	GCTAGGTTTTCGCCGTATTG
NtPR3	X05959.1	GCCATAGGAGTGGACCTGCTAAAC	AAAAGACCTCTGGTTGCCGC
NtPR10a	NM_001324627.1	ATTACCTCCTCGCCAATCCT	ACACGTCGTCATCTCTCACG
NtATG3a	XM_016649673.1	ATGGTACTGTGCGAGAAGATTCACG AA	GGCGATGATGAACTCATTGAT
NtATG3b	XM_016604322.1	ACAATGGGTGCTATCGCAGCTGCAC GGA	AGCAATAACGAACTCGTTAAC
NtATG4a	KR336561.1	TGCAATGTGTCGCACTTGGGAA	GCCATCTTCATCCCCAGATACAACAT
NtATG7	KR336561.1	TCATGGCGGATAGCGGAAGA	CATCAAGCCGCAACTTATTGAGC
NPat1	XM_016609181.1	GAGACGAAACGTTTCGGCATG	GAGATGATGTTCTTTTACATTGCCTTT GG
NtPat2	AF158027.1	ACATAGATGGACCGAATGCAAGAA	TTTGGAGCTGTGAGCATGGT
NtPat3	XM_016577632.1	AGCTTCGTGAGGAGGGTCACA	GGTTGAAGCCGTTTGATATC
NtVPE family	AB075947.1; NM_001325142.1; AB075949.1; AB075950.1; XM_016647230.1; XM_016600344.1	CACGCRATCARCTGTTGA	ATATGATCATTYGGACCACT
NtHD2a	FJ903174.1	AGGAAGGCAGATTCGGCTACA	TGATTTTGGAGTCTGCTGGTT
NtHSR203J	AB091430	GCTCAACGATTACGCAGATTTTC	CCAGTCGCATTGGAGATAAGT
NtL25	L18908	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	AAGGGTGTGTTGTCTCAATCTT
NtEF1 α	AF120093	TGAGATGCACCACGAAGCTC	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
NtubC2	AB026056	CTGGACAGCAGACTGACATC	CAGGATAATTTGCTGTAACAGATTA
NtPP2A	X97913	GTGAAGCTGTACGGCCTGAGC	CATAGGCAGGCACCAAATCC

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel libre R (une langue et l'environnement pour l'informatique statistique, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche, T RCore - <https://www.r-project.org/>, 2016). Les paramètres mesurés ont été analysés statistiquement par différents tests en fonction des expérimentations : le test T de Student, le test Mann-Whitney, le test Kruskal-Wallis suivi d'une correction de Bonferroni ou encore par le test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Seules les différences significatives avec une p -value $<0,05$ ou $<0,001$ ont été considérées.

4. Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez *A. thaliana* :

4.1 Recherches *in silico* des protéines interagissant avec les transporteurs de sucres

Afin d'identifier un réseau d'interactions protéiques entre les transporteurs et des protéines membranaires, les séquences protéiques codant les 9 *AtSUT*, 17 *AtSWEET* et 53 *AtMST* ont été interrogées en utilisant la banque de données MIND (Membrane-protein Interaction Network Database, <https://associomics.dpb.carnegiescience.edu/Associomics/Home.html>). MIND contient des données d'interactions de protéines membranaires et de protéines de signalisation identifiées par la méthode du split-ubiquitine en levure, et contient 3 700 protéines qui recouvrent environ 12 102 interactions protéiques potentielles (Jones *et al.*, 2014).

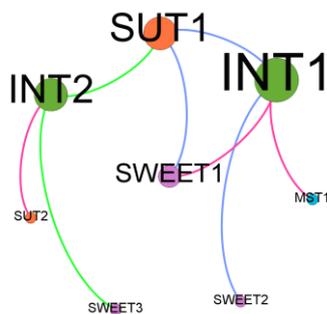
4.2 Construction du réseau d'interactions transporteurs de sucres – protéines membranaires

Le réseau d'interactions des transporteurs de sucres (ST) - protéines membranaires (interactants, INT) a été construit à partir de la liste des « tuples » d'interaction (collection ordonnée de valeurs d'un nombre indéfini (ici 3) d'attributs relatifs à un même objet) ST_i, INT_i, F_i où ST_i est le nom du transporteur de sucres impliqué/enrôlé dans l'interaction; INT_i est le nom de la protéine interagente et F_i est la force de l'interaction selon MIND. Les transporteurs de sucres sont de trois types différents : {MST, SUT, SWEET}. Ils comprennent un attribut booléen « interactant » qui indique s'ils interagissent avec d'autres transporteurs de sucres. La force F_i peut prendre trois valeurs différentes : {4+, 3+, 2+} toujours selon MIND. Le réseau a été construit à partir de la liste des « tuples » d'interaction avec la librairie *networkx* du langage *python 3* (Hagberg *et al.*, 2008).

Le réseau d'interaction est un graphique non-orienté qui comprend des sommets et des arcs ayant des attributs calculés avec la librairie *networkx* du langage *python 3*. Ces attributs ont été résumés dans le Tableau MM.2. Un exemple d'attributs de sommet d'un réseau d'interactions fictif est visible sur la Figure MM.1. La visualisation du réseau d'interaction a été effectuée par l'intermédiaire du logiciel *Gephi* (Bastian *et al.*, 2009) avec l'algorithme *Fruchterman Reingold*. La taille des sommets est proportionnelle au degré classique de celui-ci et la couleur des arcs est fonction de la force de ceux-ci.

Tableau MM.2 : Tableau explicatif des attributs pour les sommets du réseau. Un degré « transporteur de sucres » (STDegree) pour un sommet donné du réseau est le degré de ce sommet qui cible des sommets adjacents uniquement de type transporteur de sucres dans le réseau d'interaction. Un degré « type de transporteur de sucres » ({MST, SUT, SWEET}Degree) pour un sommet donné du réseau est le degré de ce sommet qui cible des sommets adjacents uniquement de type transporteur de sucres restreint à chaque famille de transporteur dans le réseau d'interaction. L'indice de diversité d'interaction (STDiv) prend pour valeur le nombre de familles différentes de transporteurs de sucres adjacents pour un sommet donné du réseau.

Réseau	Attribut	Valeur
Sommet	type	{PROTEIN, MST, SUT, SWEET}
	degree	Degré classique du sommet d'un graphe
	STDegree	Degré ciblant uniquement les transporteurs de sucres adjacents
	{MST, SUT, SWEET}Degree	Degré ciblant chaque type de transporteur de sucres adjacent
	Interactant	Booléen : Vrai si l'un des sommets adjacents interagit avec un ST ; Faux sinon
	STDiv	Indice de diversité d'interaction avec les transporteurs de sucres adjacents
Arc	weight	{2, 3, 4}
	force	{2+,3+,4+}



Sommet	Type	Interactant	Degree	STDegree	MSTDegree	SUTDegree	SWEETDegree	STDiv
INT1	PROTEIN	Vrai	4	4	1	1	2	3
INT2	PROTEIN	Vrai	3	3	0	2	1	2
MST1	MST	Faux	1	0	0	0	0	0
SUT1	SUT	Faux	3	1	0	0	1	1
SUT2	SUT	Faux	1	0	0	0	0	0
SWEET1	SWEET	Vrai	2	1	0	0	0	0
SWEET2	SWEET	Faux	1	0	0	0	0	0
SWEET3	SWEET	Faux	1	0	0	0	0	0

Figure MM.1 : Exemples d'attributs de sommet d'un réseau d'interactions entre transporteurs de sucres et protéines interactantes.

4.3 Cartes d'expression des gènes codant les transporteurs de sucres et protéines membranaires avec classification des données en k-moyennes (« k-means »)

Les niveaux d'expression de 34 gènes codants les transporteurs de sucres et les 296 gènes codant les interactants dans différentes conditions (développement, stress abiotiques et stress biotiques) ont été importés à partir de la base de données AtGenExpress Visualization Tool disponible sur le site <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=development&normalization=absolute&probeset=sv=At2g26180&action=Run>.

Dans chaque condition, nous avons analysé :

- « organes » et « stades de développement » de la plante : racines, tiges, feuilles, apex de la plante, fleurs, organes floraux, graines, et plante entière.
- stress abiotiques : sécheresse, osmotique, oxydatif et salin dans les feuilles et les racines.
- stress biotiques : des éliciteurs (flg22, LPS, GST-NPP1, HrpZ) et des agents pathogènes (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avrRpm1, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 hrcC-, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, des spores de *Phytophthora infestans*). Une légende détaillée des différentes conditions de traitements se trouvent en Annexe 2 (Tableaux A2.3, A2.4 et A2.5).

Nous avons généré par la suite un cladogramme par analyse hiérarchisée de ces niveaux d'expression pour chaque condition testée. Les profils d'expression s'insérant dans 4 à 6 groupes majeurs en fonction des conditions, nous avons regroupé des profils d'expression en k-moyennes (« k-means »). Cette méthode est un moyen simple et rapide pour organiser les données et pour résumer les tendances sous-jacentes qui se dégagent dans les conditions testées.

CHAPITRE I

**Étude comparative des évènements de signalisation
et de transport de sucres en réponse à deux types de
molécules microbiennes dans des cellules de tabac**

I. Avant-propos

Les molécules microbiennes perçues par les cellules végétales déclenchent des événements de signalisation qui peuvent être précoces (dans les premières minutes qui suivent le contact) ou plus tardifs (dans les heures ou jours après le contact). Ces événements peuvent être associés à des réponses différentielles en fonction des IPM.

Ce chapitre constitue une étude comparative d'événements de signalisation en réponse à des molécules provenant d'organismes microbiens ayant des stratégies trophiques différentes (pathogénèse vs mycorhize à arbuscules). À cette fin, nous avons utilisé un système simplifié correspondant à des cellules de tabac *N. tabacum* cv. Xanthi cultivées en suspension et deux molécules microbiennes purifiées, la cryptogéine et les facteurs Myc (LCO et CO4); qui respectivement imitent une attaque pathogène non virulente et une interaction mutualiste mycorhizienne. Les cellules de tabac en contact avec la cryptogéine, un éliciteur de réactions de défense des plantes, déclenche des événements cellulaires qui ont été bien caractérisés tels des modifications de flux de calcium, une production de FAO ou une activité de protéines kinases (Garcia-Brugger *et al*, 2006), ainsi qu'une inhibition rapide de l'entrée de glucose (Bourque *et al*, 2002). Toutefois, les mécanismes de cette inhibition sont encore interrogés. Les événements de signalisation après le contact de cellules végétales à des molécules sécrétées par des champignons mycorhiziens tels que les myc-LCO et le myc-CO4, sont pour leur part peu caractérisés.

Nous avons d'abord testé si les cellules de tabac répondent aux myc-LCO et le myc-CO4 en analysant des événements de signalisation cellulaire par comparaison avec ceux déclenchés par la cryptogéine. Nous avons ensuite étudié les échanges de sucres et la régulation de l'expression de gènes codants des transporteurs de sucres putatifs du tabac dans les cellules traitées avec les deux types de molécules microbiennes.

Nos résultats ont donné lieu à un article scientifique (Pfister *et al.*, 2017, *Frontiers in Microbiology*) inclus dans la première partie de ce chapitre et dont la version publiée est présentée en Annexe 3. Un schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats se trouvant dans cet article est schématisé en Figure I.1, présenté à la suite de l'article. Des informations et travaux complémentaires sont ensuite présentés, notamment sur l'analyse détaillée d'identification de transporteurs de sucres chez le tabac et leur expression, ainsi que des travaux préliminaires sur l'impact des LCO dans les cellules de tabac.

II. Article scientifique: « Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells »

Carole Pfister*, Stéphane Bourque, Odile Chatagnier, Annick Chiltz, Jérôme Fromentin, Diederik Van Tuinen, Daniel Wipf and Nathalie Leborgne-Castel

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21065 Dijon cedex, France.

*Correspondence: Carole Pfister (carolejulie.pfister@gmail.com)

Abstract

Plants interact with microbes whose ultimate aim is to exploit plant carbohydrates for their reproduction. Plant-microbe interactions (PMIs) are classified according to the nature of their trophic exchanges: while mutualistic microbes trade nutrients with plants, pathogens unilaterally divert carbohydrates. The early responses following microbe recognition and the subsequent control of plant sugar distribution are still poorly understood. To further decipher PMI functionality, we used tobacco cells treated with microbial molecules mimicking pathogenic or mutualistic PMIs, namely cryptogein, a defense elicitor, and chitotetrasaccharide (CO4), which is secreted by mycorrhizal fungi. CO4 was perceived by tobacco cells and triggered widespread transient signaling components such as a sharp cytosolic Ca^{2+} elevation, NtrbohD-dependent H_2O_2 production, and MAP kinase activation. These CO4-induced events differed from those induced by cryptogein, i.e. sustained events leading to cell death. Furthermore, cryptogein treatment inhibited glucose and sucrose uptake but not fructose uptake, and promoted the expression of *NtSUT* and *NtSWEET* sugar transporters, whereas CO4 had no effect on sugar uptake and only a slight effect on *NtSWEET2B* expression. Our results suggest that microbial molecules induce different signaling responses that reflect microbial lifestyle and the subsequent outcome of the interaction.

Keywords: chitotetrasaccharide, cryptogein, plant-microbe interactions, calcium, ROS, MAPKs, sugar transport, *Nicotiana tabacum*.

INTRODUCTION

Throughout their life cycle, plants are exposed to environmental fluctuations that affect their development and functioning. They also have to cope with a range of microbes (*e.g.* bacteria, fungi, oomycetes) that can be pathogenic or beneficial to plant development. In both pathogenic and mutualistic interactions, plants perceive microbial signals or microbe-associated molecular patterns [carbohydrates, lipids, (glyco)peptides, (glyco)proteins] and develop strategies based on a molecular dialogue that involves several specific pattern recognition receptors (Boller and Felix, 2009; Jones and Dangl, 2006). This perception is transduced into signaling events that lead to appropriate responses aimed at controlling the outcome of plant-microbe interactions (PMIs). At first, all microbes (whether pathogenic or beneficial) are initially perceived as invaders and activate similar early signaling pathway events related to plant immunity (Zipfel and Oldroyd, 2017). In the case of beneficial microbes, this response is subsequently attenuated or modified to allow for symbiosis to establish (Zamioudis and Pieterse, 2012). Plants control microbe populations in and around roots through sugar exudation by initiating a molecular cross-talk with heterotrophic microbes. Root sugar exudates serve as a signal for mutualistic interactions, but unfortunately also attract pathogenic microbes (Bais et al., 2006). Sugars represent the main source of energy used by the cellular machinery for growth and development. In plants, sucrose is the main compound transported from photosynthetically active source leaves to sink tissues (young leaves, flowers, fruit, roots, seeds...) *via* the phloem (Van Bel, 2003).

Alternatively, sucrose or its by-products can be transferred to microbial sinks. Thus, plant colonization or infection by microbes modifies sugar allocation at the whole plant level and increases carbon sink strength (Biemelt and Sonnewald, 2006; Doidy et al., 2012a). Photoassimilate transport requires specific membrane transporters in both plant and fungal partners. Plant sugar transporters are divided into three families. The SUCrose Transporter (SUT) (Lemoine, 2000; Sauer, 2007) and the MonoSaccharide Transporter (MST) families (Büttner, 2007; Büttner and Sauer, 2000) both belong to the Major Facilitator Superfamily and mainly co-transport sugars with protons. SUTs are involved in the long-distance transport of sucrose from source leaves to microbial sinks (Doidy et al., 2012a). In colonized root cells, sucrose is exported into the apoplast *via* SUTs and then hydrolyzed into glucose and fructose by plant cell wall or microbial invertases; microbial invertases are only involved in the case of pathogenic interactions (Roitsch and González, 2004). The third sugar transporter family, “Sugars Will Eventually be Exported Transporter” (SWEET), is involved in cellular sugar efflux (Chen et al., 2010). SWEETs play a role in biotrophic exchanges during the development of plant beneficial or pathogenic interactions (Chandran, 2015; Chen et al., 2015, 2010; Chong et al., 2014; Manck-Götzenberger and Requena, 2016; Yu et al., 2011). The capacity of plants to control apoplastic sugar uptake is thus a key determinant for the outcome of these interactions. However, the way microbes manipulate plant carbohydrate transporters at biotrophic interfaces and finally control the outcome of PMIs is still unclear.

To decipher PMI functionality with respect to sugar partitioning regulation, we compared microbial compounds from microbes with opposite trophic strategies. The first of them was cryptogein, a proteinaceous plant defense elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. It induces a hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR) against various pathogenic microbes in *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*), a non-legume plant (Bonnet et al., 1996). The cryptogein-induced signaling events that lead to gene reprogramming and cell death have been extensively studied (Garcia-Brugger et al., 2006). Within the framework of our study, it is interesting to note that cryptogein blocks glucose uptake in tobacco cells in suspension, with a subsequent decrease in O₂ consumption (Bourque et al., 2002). This energy deficiency promotes cell death as a defense mechanism. However, the impact of cryptogein on the uptake of other sugars or the expression of genes encoding sugar transporters has never been studied.

Our second microbial compound was a mycorrhizal-factor (myc-factor). Myc-factors include lipochitooligosaccharides (LCOs; Maillet et al., 2011) and short chains of non-acylated chitin chitooligosaccharides (COs; Genre et al., 2013) which are involved in the initial stages of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in plants. The nuclear calcium oscillations induced by these molecules in root epidermal cells of legumes and non-legumes (Genre et al., 2013; Sun et al., 2015) can mimic the oscillations induced by AM fungi (AMF) *in planta* (Chabaud et al., 2011; Genre et al., 2013; Kosuta et al., 2008). LCO and short-CO perception by plant cells induces the common symbiotic signaling pathway (CSSP) involved in the establishment of mycorrhizal and rhizobium-legume symbiosis (Gough and Cullimore, 2011; Oldroyd, 2013). LCOs are less effective in promoting Ca²⁺ responses, so we chose COs to induce the early signaling cascade of a beneficial fungal partner. Among short COs, we selected chitotetrasaccharide (CO4) because it is more active in terms of Ca²⁺ spiking in root cells (Genre et al., 2013). We aimed to determine whether the signaling events induced by microbial molecules from organisms with different lifestyles (pathogenic *vs.* mycorrhizal) impacted plant sugar partitioning and in turn sugar exchanges between plants and microbes. Evidence that microbes manipulate the host transport system to increase sugar efflux and that host plants attempt in return to restrict apoplastic sugar availability to halt microbe proliferation is still scarce (Ruan, 2014). In addition, the effect of CO4 as a signaling molecule has never been tested on undifferentiated cells cultured in suspension.

In the present paper, we investigate whether putative differences exist in early responses and sugar exchanges in cells submitted to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules. We report for the first time that undifferentiated cells from a non-legume plant respond to a myc-factor. Hence cell suspensions could

represent an efficient tool to decipher the signaling pathways induced by these molecules. We also show that in *N. tabacum* cell suspensions, CO₄ and cryptogein trigger the same signaling components [(cytosolic calcium, reactive oxygen species (ROS), mitogen-activated protein kinases (MAPKs)], and expression of sugar transporters yet with specific time courses and intensity levels. These findings suggest that defense and mutualistic responses are finely differentiated in the earliest steps after perception.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and preparation

N. tabacum cv. Xanthi cells wild type (wt) and gp15 cells, which express antisense *NtrbohD* under the constitutive *CaMV35S* promoter (Simon-Plas et al., 2002), were cultivated as previously described by Bourque et al. (2011). Briefly, cells were grown in Chandler's medium (Chandler et al., 1972) on a rotary shaker at 150 rpm at 25°C under continuous light (30–40 μmol.m⁻² s⁻¹). They were sub-cultured to fresh medium [15:100, (v/v)] weekly. For all experiments, 7 day-old cells were diluted to one half in Chandler's medium and cultured overnight. Before treatments, they were filtrated, washed, and resuspended in I₂ buffer (2 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 5.8) at a rate of 0.15 g fresh weight.mL⁻¹ of I₂ buffer, and equilibrated for 2 h on a rotary shaker under light (150 rpm, 25°C).

N. tabacum cells expressing cytosolic apoaequorin (Manzoor et al., 2012) were sub-cultured following the same procedure as Xanthi wt cells. Cells were collected during their exponential growth phase, washed by filtration in I₁₀ buffer (10 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 5.8), and resuspended at a rate of 0.15 g fresh weight.mL⁻¹ of I₁₀ buffer. Cell equilibration and *in vivo* reconstitution of aequorin were performed by adding 1 μM of coelenterazine (stock solution in ethanol and storage at -20°C) for at least 3 h in the dark (150 rpm at 25°C) before starting the tests.

Cell culture treatments

All basic salts and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (USA), except coelenterazine that was supplied by Calbiochem (Germany).

Cryptogein was purified according to Bonnet et al. (1996) and stored at -20°C in water as a 50 μM stock solution. Tobacco cells were treated with a final concentration of 50 nM cryptogein. Synthetic CO₄ was kindly provided by Guillaume Bécard (LRSV, Castanet-Tolosan, France) and Fabienne Maillet (LIPM, Castanet-Tolosan, France). Stock solutions of CO₄ were prepared in water at 10⁻³ M and stored at -20°C. Xanthi cells were treated with a final concentration of 100 nM CO₄. Diphenyl iodonium (DPI) was prepared in DMSO and added at a final concentration of 5 μM 5 min prior to CO₄ treatment. An equal volume of 0.05 % (v/v) of DMSO was added to the control cell suspensions.

Cytosolic calcium measurements

After *in vivo* reconstitution of aequorin, luminescence emission was measured using a luminometer (Lumat LB9507, Berthold Technologies, Germany). For this purpose, as described by (Lecourieux et al., 2005; Manzoor et al., 2012), relative luminescence units (RLU) were continuously recorded every second for 60 min. At the end, residual functional aequorin was quantified by adding 300 μL of lysis buffer (10 mM CaCl₂, 2% Nonidet-P40, 10% ethanol v/v), and the resulting increase of luminescence was monitored until it reached the basal level. Luminescence data were transformed into Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]) by using Allen's equation (Allen et al., 1977): $[Ca^{2+}] = \{(L_0/L_{max})^{1/3} + 118(L_0/L_{max})^{1/3} - 1\} / \{7 \times 10^6 - [7 \times 10^6 (L_0/L_{max})^{1/3}]\}$, where L₀ is luminescence intensity (RLU) *per* second, and L_{max} is the total amount of luminescence in 250 μL of cells.

Quantification of H₂O₂ production

H₂O₂ production was determined by chemiluminescence as described previously by Simon-Plas et al. (1997) with a few modifications. After a 2-h equilibration period in I₂ buffer, the cell luminescence background of

the assay was measured. Then, cells were treated with 100 nM CO₄ or 50 nM cryptogein, and 250 µL of cell suspensions were collected and transferred into vials in a luminometer and automatically supplemented with 50 µL of a 0.3 mM luminol solution and 300 µL of I₅₀ buffer (50 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 6.5) for RLU measurements for 60 min. At the end, a calibration curve with known amounts of H₂O₂ was drawn: the luminescence of untreated cells was recorded to convert RLU into H₂O₂. Results were expressed in nanomoles of H₂O₂ equivalents *per* gram of cells.

Protein extraction

Five mL of cell suspension were sampled 0, 5, 10, 30, and 60 min after cryptogein or CO₄ treatment. Cells were harvested by filtration on GF/A fiberglass filters (Whatman International Ltd., UK), frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar. Then 250 mg of cell powder were supplemented with 400 µL of protein extraction buffer (50 mM HEPES pH 7.5; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 50 mM β-glycerophosphate; 1 mM Na₃VO₄; 2 mM DTT; 10 mM NaF and 1 mM PMSF). The extracts were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 23,000×g for 20 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C or supplemented with Laemmli buffer (Laemmli, 1970). Protein concentrations were quantified according to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a reference for protein concentrations.

In-gel kinase activity assays

Ca²⁺-dependent or independent protein kinase activity was analyzed by in-gel kinase activity assays as previously described by Kameshita and Fujisawa (1989), with a few modifications. Twenty µg of protein extracts were analyzed by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) embedded with two different PK substrates: 0.14 mg.mL⁻¹ histone IIIS (HIIIS) or 0.25 mg.mL⁻¹ myelin basic protein (MBP). After electrophoresis, SDS was removed by performing two 30-min washes with buffer A (50 mM Tris–HCl pH 8.0; 20% isopropanol v/v), and then two more 30-min washes with buffer B (50 mM Tris–HCl pH 8.0; 5 mM β-mercaptoethanol). Then, the proteins contained in the gel were denatured by two 30-min washing steps in buffer C (50 mM Tris–HCl pH 8.0; 6 M guanidine; 5 mM β-mercaptoethanol) before being renatured in five successive washes, including one at 4°C with buffer D (50 mM Tris–HCl pH 8.0; 0.04% Tween 40 v/v; 5 mM β-mercaptoethanol) for 16 h. The gels were equilibrated for 1 h at room temperature with phosphorylation buffer E (40 mM HEPES pH 7.5; 20 mM MgCl₂; 2 mM DTT) with 0.5 mM Ca²⁺ or in the absence of Ca²⁺ (0.1 mM EGTA) followed by 1 h in buffer E supplemented with 15 µM ATP and 15 µCi [γ-³²P]-ATP (PerkinElmer, USA). The phosphorylation reaction was stopped by different gel washes with buffer F (5% TCA w/v; 1% potassium pyrophosphate w/v). Gels were dried 1 h at 80°C (GelDryer, Bio-Rad, USA), and PK activity was revealed by exposure to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics Inc, USA). Autoradiography (Amersham Hyperfilm ECL, UK) was also carried out.

Immunoblot analysis

Ten µg of each protein extract were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (HybondC, Amersham, UK) by semi-dry electroblotting transfer (Trans-Blot SD, Bio-Rad, USA) for 40 min at 15V, using transfer solution (48 mM Tris; 39 mM glycine; 0.0375% SDS (m/v), 20% methanol (v/v)). A membrane-blocking step was performed for 1 h in TBS-T buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20 (v/v)) supplemented with 2% BSA (m/v) on a rotary shaker before being incubated 1 h at room temperature, with primary polyclonal phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204) antibody (1/5000, Cell Signaling Technology, USA) or primary polyclonal ERK1/2 (total) antibody (1/1000, ab196883 Abcam plc., UK). Then, 3 washes were performed with TBS-T for 10 min, and the membranes were incubated 1 h at room temperature with an appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1/10000, Bio-Rad, USA). Immunoreactive proteins were revealed by electrochemiluminescence (ECL, LumiGLO, Cell Signaling Technology, USA).

Uptake of radiolabeled sugars by tobacco cells

Radiolabeled sugar uptake was monitored as previously described by Bourque et al. (2002). Sugar uptake was individually measured after the addition of 2 mM of ^{14}C -D-glucose, ^{14}C -D-sucrose or ^{14}C -D-fructose (0.055 MBq.g⁻¹ fresh weight (FW) cells, PerkinElmer, USA) 5 min before CO₄ or cryptogein treatment. After various processing times (0, 15, 30, 60 min), duplicates of 2 mL of cell suspensions were taken and filtered *via* a vacuum pump on GF/A fiberglass filters (Whatman International Ltd., UK). The cells were washed twice: 1 min with 10 mL of I₂ buffer, and then 20 s with 5 mL of I₂ buffer. Cell pellets were harvested, weighed, and placed at 80°C for 16 h. Dry weights were determined, and dried cells were mixed with 10 mL of scintillation liquid (Ultima Gold Ready-Safe Cocktail, PerkinElmer, USA) in scintillation vials to evaluate the radioactivity of each sample using a liquid scintillation counter (Beckman Coulter LS6500 Liquid Scintillation Counter, USA). Sugar uptake measurements were expressed in μmol of glucose/sucrose/fructose *per* gram of cell FW as a function of time.

Cell death measurements

Cell death was determined by simultaneously staining cells with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) dyes, as described previously (Jones and Senft, 1985). Xanthi cells were incubated at room temperature with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FDA and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PI for 5 min. The ratio of dead (red-stained) to viable (green-stained) cells was measured with an epifluorescence microscope (Photomicroscope Axiophot, Zeiss, Germany) using rhodamine (BP546 \pm 12/FT580/LP590 nm) and fluorescein (BP450-490/FT510/LP520 nm) filters, respectively. The experiment was repeated three times with at least 500 cells counted for each assay.

In silico analysis

Putative *NtSUTs* and *NtSWEETs* were screened from the Solanaceae database (<http://solgenomics.net/>) using BLAST algorithms (BLASTN, BLASTP and BLASTX, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with previously published plant *SUT* and *SWEET* sequences as subjects. Microarray data from tobacco cells generated in our laboratory (Agilent 44K chip containing 43,759 probes of tobacco cDNA; unpublished results, K. Bouhidel) led to the identification of 2 putative *NtSWEETs*, named *NtSWEET2A* and *NtSWEET2B*. The accession numbers of the isolated sequences are the following: *NtSUT1-1* (MF140390), *NtSUT1-2* (AF149981.1, published as *NtSUT3*, Lemoine et al., 1999), partial *NtSUT2* (MF140391), *NtSUT4* (AB539539.1, Okubo-Kurihara et al., 2011), *NtSWEET2A* (identified as *N. tabacum* bidirectional sugar transporter SWEET2a-like in the original tobacco genome annotation XM_016629722.1), and *NtSWEET2B* (identified as bidirectional sugar transporter SWEET2-like in the original tobacco genome annotation XM_016634622.1).

RNA extraction and RT-PCR analyses

Five mL of cell suspension were collected 0, 30 min, 2 and 4 h after cryptogein or CO₄ treatment. The biological material was harvested, frozen and ground in the same way as for protein extraction. Total RNAs were extracted and purified using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA solutions were treated with DNase (Ambion, USA) for 30 min at 37°C, following the manufacturer's instructions. Purity and concentrations of RNA fractions were estimated using Nanodrop1000 (ThermoFisher Scientific, USA). Reverse transcription was performed on 1 μg of RNA using the ImpromIITM Reverse Transcriptase kit (Promega, USA), as described by the manufacturer.

Quantitative PCR was carried out on reverse-transcribed RNAs from at least three independent biological replicates and two technical replicates. Quantitative PCR reactions were performed using a ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) apparatus and ViiATM 7 v1.2 software, using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, USA). Relative expression levels were normalized against the average of the two housekeeping genes *NtL25* and *NtEF1 α* (Schmidt and Delaney, 2010) and against untreated cells for each

time-point measurement using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The qPCR primers displayed high amplification efficiency (85-100%); they are listed in Supplementary Table 3.

Statistical analyses

Cell death data were statistically analyzed for differences between treatments using R software (a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, T RCore - Online: <http://www.R-project.org>, 2016) using Student's T-test. Differences were considered as significant with a p -value <0.001 . Gene expression data were analyzed for differences between treatments by ANOVA followed by Tukey's range test. Different letters indicate distinct statistical groups with a p -value <0.05 .

RESULTS

CO₄ induces a rapid and transient cytosolic [Ca²⁺] elevation in tobacco cells

Calcium ions (Ca²⁺) are secondary ubiquitous intracellular messengers that play key roles in signal transduction in response to biotic and abiotic stresses. We investigated the cytosolic free calcium concentrations ([Ca²⁺]_{cyt}) dose-response of *N. tabacum* cv. Xanthi cells expressing cytosolic aequorin (Manzoor et al., 2012) and submitted to CO₄ treatment (Supplementary Figure 1). CO₄ 100 nM induced the highest cytosolic [Ca²⁺] rise, so we chose this concentration for the other experiments. A very sharp, rapid and transient increase in [Ca²⁺]_{cyt} was recorded within the first minute of CO₄ treatment (Figures 1A and B). Then [Ca²⁺]_{cyt} returned to the same basal level as control cells after 5 min of CO₄ treatment. These CO₄-induced [Ca²⁺]_{cyt} variations markedly differed from the bi-phasic variations induced by cryptogein (Figures 1A and B). After a 3-min lag phase, cryptogein induced a first transient [Ca²⁺]_{cyt} increase that peaked after *ca.* 5 min, followed by a second and sustained elevation after 25 min of treatment. The mean [Ca²⁺] peak values obtained with 100 nM CO₄ and 50 nM cryptogein treatments and the corresponding peak times are reported in Supplementary Table 1. This result is in agreement with previous data published by Manzoor et al., (2012). Our findings indicate that undifferentiated tobacco cells perceive signals from CO₄ used as an AMF inducer and cryptogein used as a plant defense inducer, and then may transduce specific responses to these signals.

CO₄ promotes rapid H₂O₂ production mediated by plasma membrane oxidase NtrbohD

ROS production is a well-known signaling event triggered by microbial molecules (Fester and Hause, 2005; Torres, 2006), so we investigated H₂O₂ production in tobacco cells following CO₄ treatment. A rapid and transient increase of the H₂O₂ concentration occurred after 5-10 min, with a maximum of 285 nmoles of H₂O₂.g⁻¹ of FW, followed by a rapid decrease (Figure 2A). In the same conditions, cryptogein treatment induced a higher increase of the H₂O₂ concentration after around 20 min, with a maximum of 1 μmole of H₂O₂.g⁻¹ of FW cells, as previously described by Simon-Plas et al. (1997). The mean H₂O₂ production peak values obtained with 100 nM CO₄ and 50 nM cryptogein treatments and the corresponding peak times are reported in Supplementary Table 2. In order to investigate the origin of H₂O₂ produced in response to CO₄, we used DPI to inhibit ROS production mediated by flavoenzymes such as NADPH oxidases (Pugin et al., 1997). DPI suppressed H₂O₂ production in response to CO₄ (Figure 2B), suggesting the involvement of NADPH oxidases (also named rbohs for respiratory burst oxidase homologs). To support this hypothesis, we examined CO₄-induced H₂O₂ production in the gp15 cell line, which is impaired in *NtrbohD* expression by an antisense strategy. This cell line was previously used to confirm that the major enzymatic source of H₂O₂ in cryptogein signaling is the NtrbohD isoform (Simon-Plas et al., 2002). Likewise, no H₂O₂ production occurred after eliciting gp15 cells with CO₄ (Figure 2B), confirming that NtrbohD activity is also involved in CO₄-induced H₂O₂ production in tobacco cells. Similarly to our previous observations about Ca²⁺ (Figure 1), H₂O₂ production measurements showed that CO₄ and cryptogein induced specific profile of oxidative bursts, confirming that myc-factors and plant defense inducers regulate signaling components in specific manners.

Activation of MAP kinases by CO4 and link with cell death

Protein phosphorylation/dephosphorylation is a major post-translational modification that plays a crucial role in the regulation of physiological processes by intracellular signal transduction.

Using in-gel kinase assays and HPLC in the presence of 0.5 mM Ca^{2+} , we did not detect any Ca^{2+} -dependent protein kinase (PK) specifically activated in response to CO4. The activated Ca^{2+} -dependent PK patterns were similar for CO4-, cryptogein- and non- treated cells. However, in in-gel kinase assays with MBP in the presence of 0.1 mM EGTA, CO4 activated a Ca^{2+} -independent PK with an apparent molecular mass of 48 kDa (Figure 3A). Hence, fast and transient PK activity was detected in response to CO4, with a peak after 5 min of treatment. In contrast, sustained activity of a PK with a similar molecular mass was observed from 10 min and up to 60 min in response to cryptogein (Figure 3A). This PK shared common characteristics with MAPKs. To confirm this hypothesis, we performed immuno-detection of both activated (*i.e.* phosphorylated) and total (activated and non-activated) MAPKs by using anti-human phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2; Thr202/Tyr204) and total MAPK antibodies, respectively (Figure 3B). Two bands corresponding to activated MAPKs with apparent molecular masses of 48 and 46 kDa were detected and confirmed the results obtained in in-gel kinase assays. These PKs could correspond to salicylic-acid-induced protein kinase (SIPK) and wound-induced protein kinase (WIPK), respectively, previously identified in tobacco (Lebrun-Garcia et al., 1998; Zhang and Klessig, 1997, 1998; Zhang et al., 1998, 2000). The use of the antibody raised against total MAPKs revealed bands of similar intensity levels in control, cryptogein-treated and CO4-treated cells, indicating that these MAPKs are constitutively expressed. Therefore, we can conclude that activation of these two MAPKs was due to their phosphorylation in response to CO4 and cryptogein treatments. Several authors hypothesized that MAPK activation was involved in HR-associated cell death (Menke et al., 2005; Yang et al., 2001; Zhang and Liu, 2001; Zhang et al., 2000), so we analyzed the ability of CO4 to induce cell death after 24 h of treatment (Figure 3C). CO4, which induced transient MAPK activity, only induced 10% of cell death, *i.e.* the same percentage as in untreated cells after 24 h. In the same conditions, cell death reached nearly 70% in response to cryptogein, which induced sustained MAPK activity. These results confirm that sustained MAPK activation is necessary to promote cell death, as previously reported by Dahan et al. (2009).

Effect of microbial molecules on sugar uptake

We analyzed the ability of microbial molecules to regulate cellular uptake of the three main plant soluble sugars, namely sucrose, glucose, and fructose. ^{14}C -glucose uptake was totally repressed in cryptogein-treated cells (Figure 4A), as previously described by Bourque et al. (2002). In contrast, glucose uptake was not inhibited in response to CO4 (Figure 4B). Results were similar for ^{14}C -sucrose uptake: CO4 did not modify the sustained sucrose uptake recorded in control cells (Figure 4D), but cryptogein strongly inhibited it (Figure 4C). These results indicate that sucrose transporter activity and glucose transporter activity are differently regulated in response to cryptogein and CO4. Our observations regarding ^{14}C -fructose uptake suggest different modes of regulation. Neither cryptogein treatment (Figure 4E) nor CO4 treatment (Figure 4F) inhibited fructose uptake as compared to control cells, suggesting that the regulation of specific fructose transporters is not modified in response to microbial signals, or that the regulation of hexose transporters only affects their selectivity. Altogether, our results demonstrate that perception of AMF signals or plant defense inducers leads to adverse strategies in terms of sugar transport at the plant cell plasma membrane, which is related to the subsequent outcome of the interaction.

CO4 and cryptogein differentially regulate *SUT* and *SWEET* expression

We focused on the *SUT* (Bitterlich et al., 2014; Doidy et al., 2012a; Garcia et al., 2016; Kühn and Grof, 2010; Lemoine et al., 2013; Zhang and Turgeon, 2009) and *SWEET* (Chandran, 2015; Chen et al., 2015, 2010, 2012; Chong et al., 2014; Doidy et al., 2012a; Manck-Götzenberger and Requena, 2016; Yu et al., 2011; Zhang and Turgeon, 2009) transporter families because they are known to play a key role in sugar partitioning *in planta* and in sugar exchanges/competition in PMIs. We first identified all *SUT* members in the currently available version of the tobacco genome (Sol Genomics Network). Our *in silico* screening led to the

identification of 4 putative tobacco *SUTs* (2 full-length and 2 partial sequences) belonging to the three dicotyledonous SUT clades (Supplementary Figure 2). We built a SUT phylogenetic tree based on the amino acid sequence alignment of different plant SUTs (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* and *N. tabacum*) naming NtSUTs according to their phylogenetic position. NtSUT1-1 and NtSUT1-2 belong to the SUT1 clade (type I; Peng et al., 2014), NtSUT2 to the SUT2 clade (type II; Peng et al., 2014), and NtSUT4 to the SUT4 clade (type III; Peng et al., 2014).

In the same database, we also identified 13 putative tobacco SWEETs (full length or at least with a minimum length of 235 amino acids) belonging to the four SWEET clades (Supplementary Figure 3). We renamed the 13 putative sequences according to their closest orthologs with *S. lycopersicum* (Supplementary Figure 3). Among these candidates, our previous data (Agilent 44K, unpublished results, K. Bouhidel) led to the identification of 2 putative NtSWEETs belonging to SWEET clade 1 (NtSWEET2A and NtSWEET2B), that we further investigated.

We analyzed the transcript accumulation of the 6 selected candidates (4 *NtSUTs* and 2 *NtSWEETs*) in tobacco cells by quantitative reverse transcription PCR following 4 h of cryptogein or CO₄ treatment. After 4 h of cryptogein treatment, *NtSUT1-1* expression remained unchanged (Figure 5A), whereas *NtSUT1-2* transcript levels substantially increased (150-fold change, Figure 5B). Transcript accumulation of *NtSUT2* (Figure 5C) and *NtSUT4* (Figure 5D) also significantly increased after 4 h of cryptogein treatment, with 6- and 2.5- fold changes, respectively. In the same conditions, the transcript levels of the two *NtSWEETs* significantly increased 2.5-fold for both genes (Figures 5E and 5F). The changes observed after 4 h of cryptogein treatment occurred after 2 h of treatment for most of the genes we studied (Figures 5B, C, D and F). In contrast, gene expression of all *NtSUT* members remained unchanged in response to CO₄ throughout the whole experiment (Figures 5A, B, C and D). In addition, the 4-h treatment with this symbiotic signal did not modify *NtSWEET2A* transcript levels (Figure 5E) and only caused *NtSWEET2B* transcripts to increase slightly but significantly (1.8-fold after 4 h, Figure 5F).

DISCUSSION

We compared the impact of two purified microbial molecules that mimicked pathogenic or mutualistic lifestyles on undifferentiated non-legume cells. We took advantage of this simplified system, which circumvents the hurdles linked to a multi-layered organ, to further unfold the early signaling events of PMI. Our data evidenced that CO₄, a myc-factor known to induce the strongest myc responses in root cells (Genre et al., 2013), was recognized by tobacco cells. This recognition resulted in the induction of three signaling events: cytosolic Ca²⁺ production, H₂O₂ production, and MAP kinase phosphorylation.

Early signaling triggered by CO₄ in tobacco cells

Calcium is a key secondary messenger in cell functional processes that transduces early intracellular signaling events in pathogenic and mutualistic PMIs (Vadassery and Oelmüller, 2009). CO₄ triggered calcium concentration increase in its very early stages in cultured tobacco cells. Calcium spiking occurs in rhizodermal cells of legume and non-legume plants in contact with AMF or fungal spore/hyphal exudates (Chabaud et al., 2011; Genre et al., 2013; Kosuta et al., 2008; Sun et al., 2015). Calcium initiates the cross-talk between partners, and induces plant (Parniske, 2008) or fungal (Liu et al., 2013) genes, and is thus necessary for symbiosis to establish in the host plant (Oldroyd and Downie, 2006). AMF spore/hyphal exudates contain a mixture of molecules that trigger cytosolic calcium elevations in cultured non-legume (tobacco and soybean) cells (Francia et al., 2011; Navazio et al., 2007). These works are in line with the present study, which more precisely demonstrates that one compound within this mixture, namely CO₄, is sufficient to trigger early calcium concentration increase in cells. ROS (H₂O₂) production, *i.e.* the so-called oxidative burst, is a powerful plant defense response against pathogenic microbes (Lamb and Dixon, 1997). But ROS are also generated during the early stages of plant root mycorrhization (Belmondo et al., 2015; Fester and Hause,

2005; Kiirika et al., 2012; Salzer et al., 1999). ROS production is related to induction of carotenoid biosynthesis (Strack et al., 2003), bio-protection of AM plants (Dumas-Gaudot et al., 2000), and lateral root development (Montiel et al., 2013). Our results show that CO₄ induced rapid, early H₂O₂ production in cultured tobacco cells. They contrast with the work of Navazio et al. (2007) who showed that *G. margarita* culture medium did not induce ROS production in cultured soybean cells. However, a detectable ROS accumulation was recorded in cultured soybean cells treated with homogenates of fungal spore cell walls (Navazio et al., 2007). The authors concluded that the diffusible fungal molecules, which are thought to be released in the medium, did not induce defense reactions in soybean cells. We may wonder whether this undetectable ROS production in soybean cells was due to the absence/low concentration of CO₄ (or of other diffusible molecules able to trigger ROS production) or to the presence of ROS antioxidants in *G. margarita* medium that suppressed the oxidative burst. We identified isoform D of Ntrboh as the source of CO₄-induced H₂O₂ production (resulting from dismutation of O₂^{•-}). Rboh genes have been described as a major source of ROS during AMF symbiosis (Puppo et al., 2013). In *Phaseolus vulgaris* (Pv), 6 to 9 *Pvrboh* genes were up-regulated during early interaction with the AMF *Rhizophagus irregularis* (Arthikala et al., 2013). *PvrbohB*-RNAi plants developed higher AMF colonization, while *PvrbohB*-overexpressing plants displayed reduced colonization, indicating that *PvrbohB* negatively controlled the late stage of AMF colonization in cortical cells (Arthikala et al., 2013). Conversely, in *Medicago truncatula* the *MtrbohE* isoform played a positive role in arbuscule development (Belmondo et al., 2015). Thus, different members of the rboh family could have distinct – sometimes conflicting – functions in AM symbiosis from the very early recognition of diffusible molecules in rhizodermal cells to arbuscule development in cortical cells. We can notice that *PvrbohB* shares 84.9% of amino acid identity with *PvrbohD* (Montiel et al., 2012), the *NtrbohD* homolog. Our data show that CO₄ treatment induces *NtrbohD*-dependent H₂O₂ production. This result could be seen in the light of the requirement of *PvrbohB* for pre-symbiotic early recognition of AMF by rhizodermal *P. vulgaris* cells.

CO₄ also induced a transient activation of two MAPKs with apparent molecular masses of 48 and 46 kDa that may correspond to SIPK and WIPK, respectively (Lebrun-Garcia et al., 1998). The MAPK cascade is a key element in the transduction of extracellular stimuli into intracellular response mechanisms (Mishra et al., 2006; Pitzschke et al., 2009). Only few studies have described MAPK involvement in plant mutualistic interactions (Bartsev, 2004; Fernandez-Pascual, 2006; Francia et al., 2011). Induction of MAPK transcripts by *R. irregularis* and *Glomus versiforme* has been measured during pre-contact and appressorium stages on *M. truncatula* roots (Liu, 2003; Weidmann et al., 2004). At the protein level, rapid MAPK activation was triggered in lotus and tobacco cells challenged by *G. margarita* GSE exudates (Francia et al., 2011).

CO₄ and cryptogein promote similar signaling events, but with different signatures

Our results indicate that the early, subtle, transient induction of [Ca²⁺]_{cyt} production, H₂O₂ production and MAPK activation in CO₄-challenged tobacco cells was not sufficient to promote tobacco cell death as cryptogein treatment did. The time course and amplitude of these signaling components are decoded by plant cells for them to adapt to different scenarios (Dodd et al., 2010). Interestingly, CO₄ and cryptogein induced specific [Ca²⁺]_{cyt} increases that differed in time courses as well as in peak intensities in tobacco cells. CO₄ induced a sharp and transient [Ca²⁺]_{cyt} peak, whereas cryptogein induced a longer and bi-phasic [Ca²⁺]_{cyt} elevation, as described by Manzoor et al., 2012. Various external biotic stimuli can quickly trigger specific and distinct spatio-temporal patterns of changes in cytosolic Ca²⁺ concentration, i.e. the so-called “Ca²⁺ signatures” leading to specific signaling pathways (McAinsh and Pittman, 2009). Our results are in agreement with Navazio et al. (2007) and Francia et al. (2011), who showed that AMF *G. margarita* exudates induced a transient [Ca²⁺]_{cyt} increase with a specific sharpened profile within a few minutes in cultured cells. CO₄ also induced rapid and transient H₂O₂ production within a few minutes, with a peak after 8 min of treatment. The H₂O₂ production and [Ca²⁺]_{cyt} production profiles were earlier in CO₄-treated cells in cryptogein-challenged cells. Plant rboh genes contain EF-hand motifs for calcium binding (Torres and Dangl, 2005), so we expected a similar time course of CO₄-triggered calcium and ROS production in link with the “conventional” interconnection between Ca²⁺ and ROS (Mazars et al., 2010). CO₄ induced MAPK activation transiently and

more rapidly than cryptogein, with a peak after 5 min, while cryptogein induced sustained MAPK activation. This profile is linked with cell death, as suggested by different authors. Constitutive SIPK activation promoted the induction of genes involved in HR cell death (Yang et al., 2001; Zhang and Liu, 2001). Nuclear activation of SIPK resulted in cryptogein-mediated tobacco cell death (Dahan et al., 2009). Moreover, one of the targets of SIPK is WRKY1, a transcription factor involved in HR (Menke et al., 2005). The higher second $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation, which only occurred in cryptogein-treated cells, may be involved in sustained MAPK activation, defense gene expression, and cell death (Lecourieux et al. 2002).

Impact of microbial molecule origin on early sugar partitioning

Treatment of tobacco cells with CO4 and cryptogein allowed us to characterize the early sugar partitioning events in opposite PMI types. Our tobacco cells perceived the two types of molecules, but the subsequent effects on sugar uptake differed. We showed for the first time that, as previously reported for glucose, sucrose uptake was negatively impacted by cryptogein treatment, whereas fructose uptake was not affected. To discuss our results in the context of competition for apoplastic sugars between plants and microbes, we can hypothesize that (i) microbes inhibit glucose and sucrose re-uptake by mimicking an avirulent pathogen attack so as to divert plant sugars, and/or (ii) plant cells inhibit glucose and sucrose re-uptake to confine pathogen development within the surrounding tissues, and thereby probably promote cell death, as proposed by Bourque et al. (2002). Unlike cryptogein treatment, CO4 treatment did not modify sugar uptake by plant cells. Sugar transfer from the plant to the fungal symbiont is essential for mutualism to develop and lead to reciprocal nutrient exchanges between the two partners. Inhibition of sugar transfer would dramatically impact the outcome of mutualistic symbiosis. Therefore, it is no surprise that plants should maintain sugar flows and maintain sugars available in the apoplast in response to an AMF molecule, so that symbiosis may durably establish. Furthermore, no cell death occurred in CO4-treated cells, in line with the biotrophic obligate lifestyle of AMF. Interestingly, fructose uptake remained unchanged in response to both cryptogein and CO4. Fructose is a by-product of sucrose known as a secondary sugar; it is less competitive than glucose for microbial nutrition. Glucose is mostly used by beneficial microbes, but also diverted by pathogens (Hall and Williams, 2000; Nehls et al., 2010; Schübler et al., 2006; Sutton et al., 1999; Voegelé et al., 2001). The lower selection pressure for fructose uptake may have led to a weaker regulation of fructose re-uptake. This idea is reinforced by the fact that so far only one fructose transporter has been reported in symbiotic or pathogenic fungi, namely BcFRT1 (*Botrytis cinerea* fructose transporter 1; Doehlemann et al., 2005).

CO4 and cryptogein differentially regulate sugar transporters

Plant glucose and sucrose uptake levels can be modified by PMIs such as cryptogein. To offset the ensuing stress, cells may adopt two strategies: (i) favor the synthesis of “other” sugar transporters (located at the plasma membrane and/or tonoplast), or (ii) favor less selective sugar transporters present at the plasma membrane. Additionally, sugar transport proteins may also be regulated at the post-translational level. For instance, phosphorylation of the AtSTP13 sugar transporter in Arabidopsis increased sugar re-uptake by plant cells, and this limited competition with bacterial transporters (Yamada et al., 2016). Our results suggest that at least the first strategy occurs in tobacco cells since cryptogein induced significant up-regulation of 3 *NtSUTs* and 2 *NtSWEETs*, while CO4 only induced a slight but significant increase of *NtSWEET2B* transcripts. Although the expression of 6 transporters was analyzed in our original cell system, it is also interesting to discuss their putative roles at the whole plant level. SUT1 transporters, which belong to the first clade of specific transporters of dicotyledonous plants, are sucrose/proton symporters. Some of them are mainly involved in phloem loading and long-distance transport (Kühn and Grof, 2010). We identified two members of the SUT1 clade, namely *NtSUT1-1* and *NtSUT1-2*. *NtSUT1-1* was not regulated after short (4 h) treatment with either microbial molecule, whereas *NtSUT1-2* was upregulated after cryptogein treatment, but not after CO4 treatment. Phylogenetic grouping with particular protein orthologs (Supplementary Figure 2) suggests that *NtSUT1-1* is the main sucrose-loading transporter in the phloem, and could be less subject to transcriptional regulation as reported in several higher plants (Doidy et al., 2012b; Zhang and Turgeon, 2009).

NtSUT1-2 is more subject to regulation at both the spatial (*e.g.* pollen tube; Lemoine et al. 1999) and environmental (*e.g.* biotic stress as suggested by our results) scales. The main role of SUT2 members remains unknown *in planta*. Regarding our results and the previously proposed negative control of AMF development by SUT2 (Bitterlich et al., 2014), it is tempting to speculate a role for *NtSUT2* in the cost/benefit balance of PMIs and its subsequent outcome. CO₄ treatment had no effect on SUT2 expression, whereas cryptogin treatment strongly upregulated it. The plasma membrane localization of SUT1 and SUT2 members is clear *in planta*, but localization of SUT4 members is still controversial : they are thought to be localized in the tonoplast, in the plasma membrane, or both (Chincinska et al., 2013; Endler, 2006; Schneider et al., 2012). In cultured tobacco cells, Okubo-Kurihara et al. (2011) suggested that tonoplastic *NtSUT4* had a potential role in sucrose export from the vacuole lumen to the cytosol. Interestingly, Schulz et al. (2011) showed that SUT4 proton symporter was not only responsible for sucrose efflux from the vacuole but acted in coordination with TMT1/2, a proton-coupled antiporter (a member of the MST family) that can load glucose and sucrose into the vacuole with a high capacity. Regulation of *NtSUT4* by cryptogin, but not by CO₄, suggests an impact on the allocation of sucrose and hexose storage to deplete plant cell sucrose and thereby limit access to carbon sources to fight against a potential pathogen, as previously hypothesized.

Besides SUTs, SWEET transporters represent a novel and widespread type of sugar uniporters in plants. Four plant SWEET subclasses have been identified. Members of subclasses I, II, and IV are mainly monosaccharide transporters, while subclass III proteins are sucrose transporters (Chen et al., 2010, 2012). The physiological roles of SWEETs are multiple, yet they seem specifically involved in diverting nutritional resources from plants in their interactions with both pathogenic and beneficial microbes (Feng and Frommer, 2015). In the present study, the 2 *NtSWEETs* (A and B) belonging to subclass I were upregulated in response to cryptogin. The orthologous protein in *Arabidopsis* (*AtSWEET2*) encodes a tonoplast protein whose expression is induced in response to infection by the pathogenic oomycete *Pythium irregulare*, and *Atsweet2* mutants are more susceptible to the pathogen (Chen et al., 2015). Thus, *AtSWEET2* activity contributes to *Pythium* resistance by preventing sugar loss in the rhizosphere. In our case, only *NtSWEET2B* was upregulated after CO₄ treatment. Interestingly, in potato, *SWEET2C* (the closest ortholog of *NtSWEET2B*) is up-regulated during mycorrhization (Manck-Götzenberger and Requena, 2016) and maintains a favorable sucrose gradient in arbuscule-containing cells by mobilizing hexoses in the vacuole. Regulation of *NtSWEET2B* in response to CO₄ may initiate the subsequent “sucrose highway”. To sum up, this supports the hypothesis that SWEET2 members may be specifically involved in rerouting nutritional resources from plants in their interactions with both pathogenic and beneficial microbes.

Our study should be placed within a broader contextual framework of PMIs, in which hosts and microbes may develop opposite strategies to acquire carbon molecules at the apoplastic interface (Azevedo et al., 2005; Chen et al., 2010; Doidy et al., 2012a; Fotopoulos et al., 2003; Manck-Götzenberger and Requena, 2016; Truernit et al., 1996; Wittek et al., 2017). The present paper reports for the first time that a myc-factor can be recognized by non-root cells, showing that undifferentiated cells, whatever their origin, are able to perceive the origin of a microbial molecule.

At first, our simplified system was useful to show that in a “mimetic” beneficial symbiotic relationship, signaling features differ from the features of a pathogenic interaction although the signaling cascade involves the same early components as in a pathogenic interaction. This supports the recent hypothesis of a possible overlap between defense and symbiotic responses (Chen et al., 2017).

In a second step, microbes may influence the host transport capacities, whereas plants may respond at later stages by inducing their own transport system most probably through *de novo* synthesis of sugar transporters. The present study contributes to deciphering the complex regulation of sugar exchanges by showing for the first time that two microbial molecules mobilizing the same early signaling events with specific time courses and intensity levels have different impacts on PMI set-up. A way to further unravel the black box of sugar movements across plant membranes during early microbial treatment would be to achieve the functional

characterization and the spatio-temporal localization of these key transporters. In the course of evolution, plant-microbe interactions have resulted from long exchanges. While mutualistic (friendly) microbes need to be recognized by plants to be accepted, pathogenic microbes (cheaters) try to mislead the plant so as to be "recognized" as mutualists. Our work illustrates that the "evolutionary battle" is huge and starts with the first signals exchanged by plants and microbes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CP performed the experiments and wrote the paper; SB designed the radiolabeled sugar uptake and in-gel kinase assays; OC, AC and JF technically supported CP for some experiments; DvT and CP performed *in silico* analyses; DW and NLC designed the work and wrote the paper; all authors reviewed and approved the final manuscript.

FUNDING

CP was supported by a grant from the French Research Ministry.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Prof. Guillaume Bécard (**LRSV**, Castanet-Tolosan) and Fabienne Maillet (LIPM, Castanet-Tolosan) for providing CO₄ and helpful hints, Cécile Blanchard for technical help for in-gel kinase experiments, Karim Bouhidel for the Agilent 44K chip data and discussions, Pierre-Emmanuel Courty for discussions, and Joan Doidy for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Allen, D., Blinks, and Prendergast, F. (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration—a calcium-independent component. *Science* 195, 996–998. doi: 10.1126/science.841325
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., and Quinto, C. (2013). *PvRbohB* negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 54, 1391–1402. doi: 10.1093/pcp/pct089
- Azevedo, H., Conde, C., and Tavares, R.M. (2005). The Non-host Pathogen *Botrytis cinerea* Enhances Glucose Transport in *Pinus pinaster* Suspension-cultured Cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 290–298. doi: 10.1093/pcp/pci248
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., and Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Bartsev, A.V. (2004). NopL, an Effector Protein of *Rhizobium sp.* NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions. *Plant Physiol.* 134, 871–879. doi: 10.1104/pp.103.031740
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., and Lanfranco, L. (2015). The *Medicago truncatula* *MtRbohE* gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta.* 243, 251–262. doi: 10.1007/s00425-015-2407-0
- Biemelt, S., and Sonnewald, U. (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163, 307–318. doi: 10.1016/j.jplph.2005.10.011

- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., and Kühn, C. (2014). The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J.* 78, 877–889. doi: 10.1111/tpj.12515
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.-P., and Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 181–192. doi: 10.1104/pp.110.2.365
- Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S., and Pugin, A. (2002). The Elicitor Cryptogein Blocks Glucose Transport in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 130, 2177–2187. doi: 10.1104/pp.009449
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Wendehenne, D. (2011). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol.* 192, 127–139. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03788.x
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Büttner, M. (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 581, 2318–2324. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.016
- Büttner, M., and Sauer, N. (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 263–274. doi: 10.1016/s1360-1385(00)01681-2
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., Barker, D.G., and Bonfante, P. (2011). Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytol.* 189, 347–355. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03464.x
- Chandler, M.T., Marsac, N.T. de, and Kouchkovsky, Y. de (1972). Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Can. J. Bot.* 50, 2265–2270. doi: 10.1139/b72-294
- Chandran, D. (2015). Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance: role of sweet in pathogen nutrition and stress tolerance. *IUBMB Life* 67, 461–471. doi: 10.1002/iub.1394
- Chen, H.-Y., Huh, J.-H., Yu, Y.-C., Ho, L.-H., Chen, L.-Q., Tholl, D., Frommer, W.B., and Guo, W.-J. (2015). The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *Plant J.* 83, 1046–1058. doi: 10.1111/tpj.12948
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532. doi: 10.1038/nature09606
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., and Frommer, W.B. (2012). Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* 335, 207–211. doi: 10.1126/science.1213351
- Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., and Zhang, Z. (2017). Interplay of Pathogen-induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Front. Microbiol.* 8, 973. doi: 10.3389/fmicb.2017.00973
- Chincinska, I., Gier, K., Krügel, U., Liesche, J., He, H., Grimm, B., Harren, F.J.M., Cristescu, S.M., and Kühn, C. (2013). Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Front. Plant Sci.* 4, 26. doi: 10.3389/fpls.2013.00026
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., and Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 65, 6589–6601. doi: 10.1093/jxb/eru375

- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., and Bourque, S. (2009). Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* 418, 191–200. doi: 10.1042/bj20081465
- Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 593–620. doi: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628
- Doehlemann, G., Molitor, F., and Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 601–610. doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.001
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., and Wipf, D. (2012a). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* 17, 413–422. doi: 10.1016/j.tplants.2012.03.009
- Doidy, J., van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., and Wipf, D. (2012b). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant* 5, 1346–1358. doi: 10.1093/mp/sss079
- Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Cordier, C., Gianinazzil, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2000). Modulation of Host Defence Systems. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Y. Kapulnik, and D.D. Douds, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), 173–200. doi: 10.1007/978-94-017-0776-3_9
- Endler, A. (2006). Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiol.* 141, 196–207. doi: 10.1104/pp.106.079533
- Feng, L., and Frommer, W.B. (2015). Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends Biochem. Sci.* 40, 480–486. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.005
- Fernandez-Pascual, M. (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J. Exp. Bot.* 57, 2735–2742. doi: 10.1093/jxb/erl038
- Fester, T., and Hause, G. (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15, 373–379. doi: 10.1007/s00572-005-0363-4
- Fotopoulos, V., Gilbert, M.J., Pittman, J.K., Marvier, A.C., Buchanan, A.J., Sauer, N., Hall, J.L., and Williams, L.E. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atβfruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132, 821–829. doi: 10.1104/pp.103.021428
- Francia, D., Chiltz, A., Lo Schiavo, F., Pugin, A., Bonfante, P., and Cardinale, F. (2011). AM fungal exudates activate MAP kinases in plant cells in dependence from cytosolic Ca²⁺ increase. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 963–969. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.04.008
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S.D., Wipf, D., and Courty, P.-E. (2016). Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of Mycorrhiza. *Trends Plant Sci.* 21, 937–950. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.010
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 711–724. doi: 10.1094/mpmi-19-0711
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., et al. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198, 190–202. doi: 10.1111/nph.12146
- Gough, C., and Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 867–878. doi: 10.1094/mpmi-01-11-0019
- Hall, J.L., and Williams, L.E. (2000). Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Funct. Plant Biol.* 27, 549. doi: 10.1071/pp99140
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286

- Jones, K.H., and Senft, J.A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 77–79. doi: 10.1177/33.1.2578146
- Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1989). A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 183, 139–143. doi: 10.1016/0003-2697(89)90181-4
- Kiirika, L.M., Bergmann, H.F., Schikowsky, C., Wimmer, D., Korte, J., Schmitz, U., Niehaus, K., and Colditz, F. (2012). Silencing of the Rac1 GTPase *MtROP9* in *Medicago truncatula* Stimulates Early Mycorrhizal and Oomycete Root Colonizations But Negatively Affects Rhizobial Infection. *Plant Physiol.* 159, 501–516. doi: 10.1104/pp.112.193706
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9823–9828. doi: 10.1073/pnas.0803499105
- Kühn, C., and Grof, C.P. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 287–297. doi: 10.1016/j.pbi.2010.02.001
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48, 251–275. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.251
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 15, 773–781. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00269.x
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14, 2627–2641. doi: 10.1105/tpc.005579
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38, 527–538. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.036
- Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1465, 246–262. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00142-5
- Lemoine, R., Bürkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kühn, C., Regnacq, M., Gaillard, C., Delrot, S., and Frommer, W.B. (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett.* 454, 325–330. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00843-1
- Lemoine, R., Camera, S.L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., et al. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 4, 272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272
- Liu, J. (2003). Transcript Profiling Coupled with Spatial Expression Analyses Reveals Genes Involved in Distinct Developmental Stages of an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Cell Online* 15, 2106–2123. doi: 10.1105/tpc.014183
- Liu, Y., Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Wipf, D., Zhao, B., and van Tuinen, D. (2013). Fungal genes related to calcium homeostasis and signalling are upregulated in symbiotic arbuscular mycorrhiza interactions. *Fungal Biol.* 117, 22–31. doi: 10.1016/j.funbio.2012.11.002
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Maillet, F., Poinsot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., et al. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469, 58–63. doi: 10.1038/nature09622
- Manck-Götzenberger, J., and Requena, N. (2016). Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. *Front. Plant Sci.* 7:487. doi: 10.3389/fpls.2016.00487

- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., and 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. doi: 10.1016/j.ceca.2012.02.006
- Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., and Bourque, S. (2010). Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Mol. Plant* 3, 706–718. doi: 10.1093/mp/ssq024
- McAinsh, M.R., and Pittman, J.K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181, 275–294. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x
- Menke, F.L.H., Kang, H.-G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D., and Klessig, D.F. (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 18, 1027–1034. doi: 10.1094/mpmi-18-1027
- Mishra, N.S., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 452, 55–68. doi: 10.1016/j.abb.2006.05.001
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M.-K., Santana, O., Sánchez, F., and Quinto, C. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol.* 53, 1751–1767. doi: 10.1093/pcp/pcs120
- Montiel, J., Arthikala, M.-K., and Quinto, C. (2013). *Phaseolus vulgaris* RbohB functions in lateral root development. *Plant Signal. Behav.* 8, 1–3. doi: 10.4161/psb.22694
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., and Mariani, P. (2007). A Diffusible Signal from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicits a Transient Cytosolic Calcium Elevation in Host Plant Cells. *Plant Physiol.* 144, 673–681. doi: 10.1104/pp.106.086959
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., and Dietz, S. (2010). Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review: Fungal carbohydrates in the ectomycorrhizal symbiosis. *Plant Biol.* 12, 292–301. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x
- Okubo-Kurihara, E., Higaki, T., Kurihara, Y., Kutsuna, N., Yamaguchi, J., and Hasezawa, S. (2011). Sucrose transporter NtSUT4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture. *J. Plant Res.* 124, 395–403. doi: 10.1007/s10265-010-0377-7
- Oldroyd, G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 351–357. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.003
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 763–775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Peng, D., Gu, X., Xue, L.-J., Leebens-Mack, J.H., and Tsai, C.-J. (2014). Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Front. Plant Sci.* 5:615. doi: 10.3389/fpls.2014.00615
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 421–426. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.008
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997). Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* 9, 2077–2091. doi: 10.1105/tpc.9.11.2077
- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013). Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide: Key Regulators of the Legume—*Rhizobium* and Mycorrhizal Symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2202–2219. doi: 10.1089/ars.2012.5136
- Roitsch, T., and González, M.-C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606–613. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.009

- Ruan, Y.-L. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 33–67. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251
- Salzer, P., Corbière, H., and Boller, T. (1999). Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208, 319–325. doi: 10.1007/s004250050565
- Sauer, N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581, 2309–2317. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.048
- Schmidt, G.W., and Delaney, S.K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics* 283, 233–241. doi: 10.1007/s00438-010-0511-1
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., Schmitt, B., Batz, S., Wolf, S., Hedrich, R., et al. (2012). Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters: SUC4-type sucrose transporters in the tonoplast. *Plant Biol.* 14, 325–336. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00506.x
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Büttner, M., Schneider, S., Sauer, N., and Hedrich, R. (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 68, 129–136. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04672.x
- Schübler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., and Wipf, D. (2006). Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444, 933–936. doi: 10.1038/nature05364
- Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M.-L., Humbert, C., Montillet, J.-L., and Blein, J.-P. (1997). Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ.* 20, 1573–1579. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-45.x
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.-P. (2002). The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137–147. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01342.x
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., and Walter, M.H. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* 29, 1955–1979. doi: 10.1023/a:1025695032113
- Sun, J., Miller, J.B., Granqvist, E., Wiley-Kalil, A., Gobbato, E., Maillet, F., Cottaz, S., Samain, E., Venkateshwaran, M., Fort, S., et al. (2015). Activation of Symbiosis Signaling by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Legumes and Rice. *Plant Cell* 27, 823–838. doi: 10.1105/tpc.114.131326
- Sutton, P.N., Henry, M.J., and Hall, J.L. (1999). Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* 208, 426–430. doi: 10.1007/s004250050578
- Torres, M.A. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378. doi: 10.1104/pp.106.079467
- Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397–403. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.014
- Truernit, E., Schmid, J., Eppele, P., Illig, J., and Sauer, N. (1996). The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* 8, 2169–2182. doi: 10.1105/tpc.8.12.2169
- Vadassery, J., and Oelmüller, R. (2009). Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions. *Plant Signal. Behav.* 4, 1024–1027. doi: 10.4161/psb.4.11.9800
- Van Bel, A.J.E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ.* 26, 125–149. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00963.x
- Voegelé, R.T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8133–8138. doi: 10.1073/pnas.131186798

- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Fungal Elicitation of Signal Transduction-Related Plant Genes Precedes Mycorrhiza Establishment and Requires the *dmi3* Gene in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 1385–1393. doi: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1385
- Wittek, A., Dreyer, I., Al-Rasheid, K.A.S., Sauer, N., Hedrich, R., and Geiger, D. (2017). The fungal UmSrt1 and maize ZmSUT1 sucrose transporters battle for plant sugar resources: Competition of fungal and plant sugar transporters. *J. Integr. Plant Biol.* 6, 422–435. doi: 10.1111/jipb.12535
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H., and Takano, Y. (2016). Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science*. 354, 1427–1430. doi: 10.1126/science.aah5692
- Yang, K.-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 741–746. doi: 10.1073/pnas.98.2.741
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., Feng, J., Verdier, V., and Szurek, B. (2011). Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 *Os11N3* Gene. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 1102–1113. doi: 10.1094/mpmi-11-10-0254
- Zamioudis, C., and Pieterse, C.M.J. (2012). Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 139–150. doi: 10.1094/mpmi-06-11-0179
- Zhang, C., and Turgeon, R. (2009). Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18849–18854. doi: 10.1073/pnas.0904189106
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809–824. doi: 10.1105/tpc.9.5.809
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7225–7230. doi: 10.1073/pnas.95.12.7225
- Zhang, S., and Liu, Y. (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 13, 1877–1889.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D.F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10, 435–450. doi: 10.1105/tpc.10.3.435
- Zhang, S., Liu, Y., and Klessig, D.F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J.* 23, 339–347. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00780.x
- Zipfel, C., and Oldroyd, G.E.D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543, 328–336. doi: 10.1038/nature22009

FIGURES AND LEGENDS

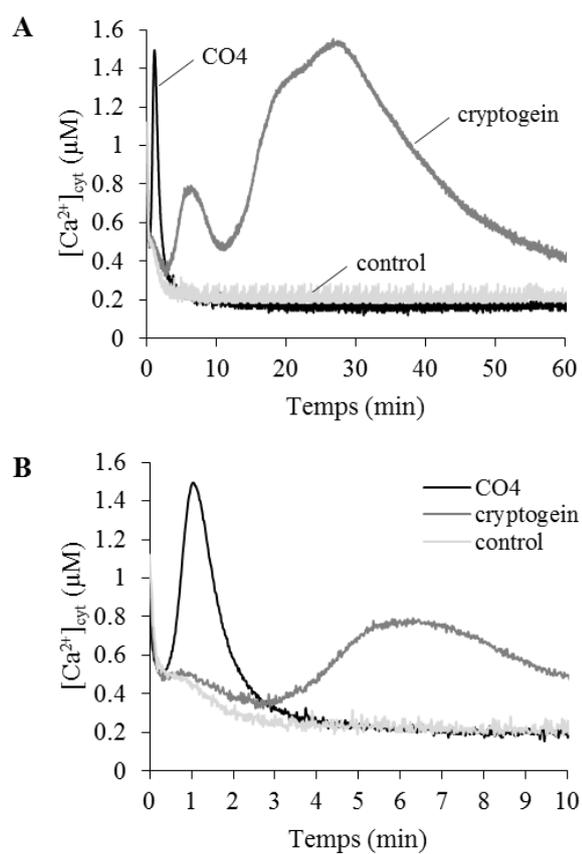


FIGURE 1. Time courses of cytosolic free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) induced by CO4 and cryptogein. Control, 100-nM CO4- and 50-nM cryptogein- treated cells. (A) $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was measured for 60 min in an *N. tabacum* cv. Xanthi cell line expressing cytosolic aequorin and based on a bioluminescence calibration curve. The curves in graph (B) correspond to the first of graph A. Data correspond to one representative experiment out of four. Mean values \pm SEs are given in Supplementary Table 1.

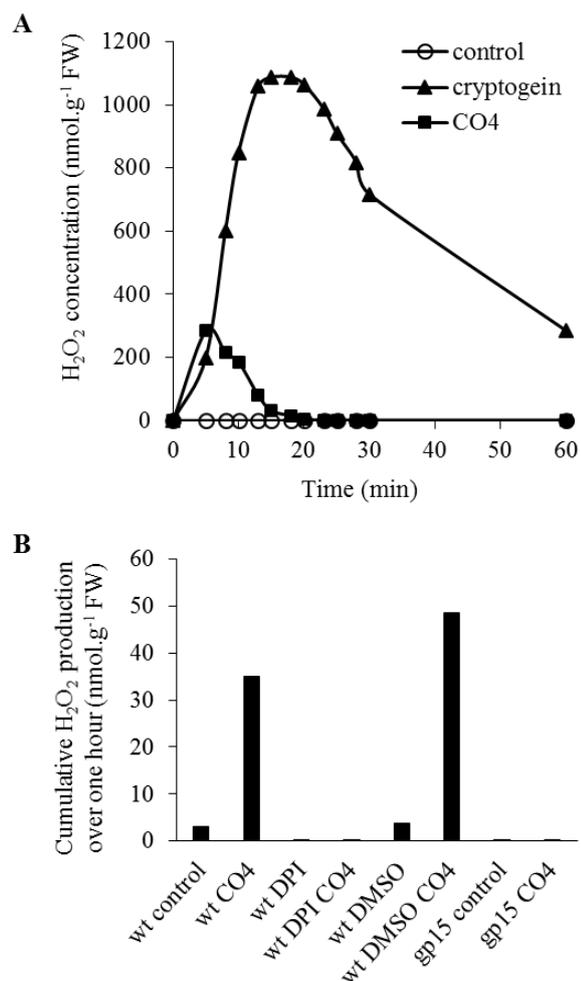


FIGURE 2. CO₄-induced H₂O₂ production is mediated by NADPH oxidase (NtrbohD) activity in tobacco cells. (A) Time courses of H₂O₂ accumulation in wild-type cells treated with 100 nM CO₄ or 50 nM cryptogein. H₂O₂ concentrations were measured by luminescence. Data correspond to one representative experiment out of five. Mean values ± SEs are given in Supplementary Table 2. (B) Impact of NtrbohD activity on CO₄-mediated H₂O₂ production. Wild-type (wt) and *NtrbohD* antisense (gp15) cell lines were pre-incubated or not with 5 μM diphenyl iodonium (DPI) before CO₄ treatment. Mean cumulative H₂O₂ production was measured for 1 hour. Data correspond to one biological replicate out of three.

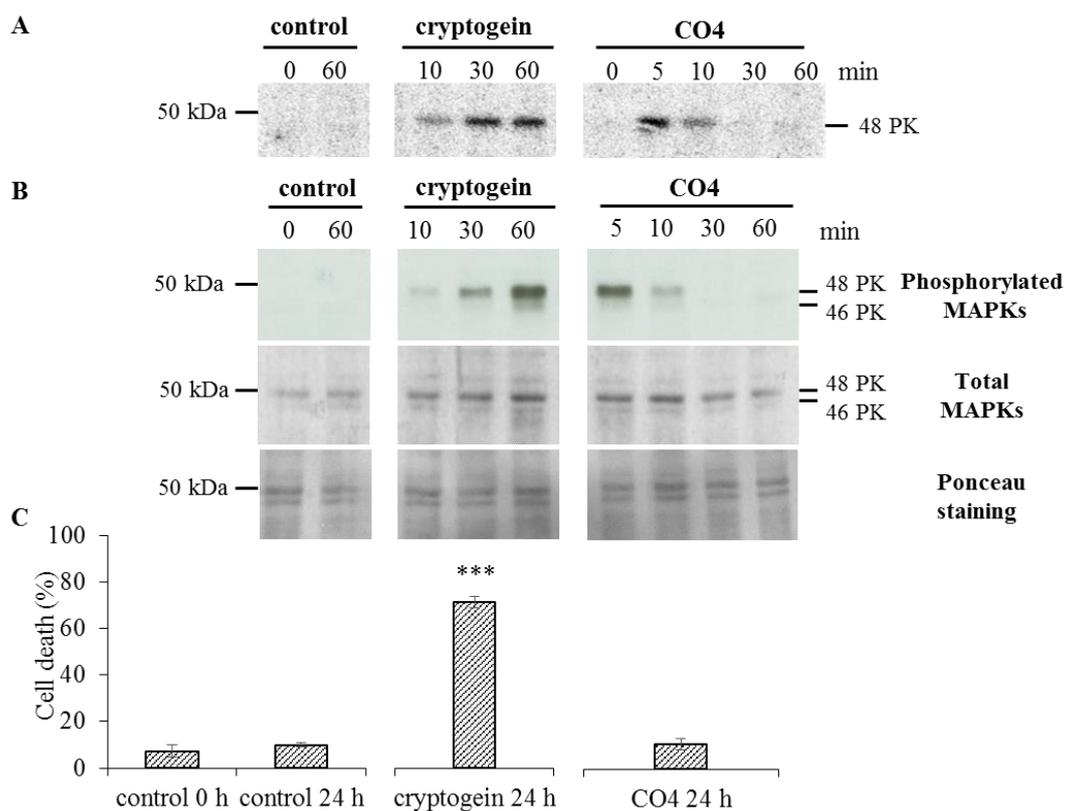


FIGURE 3. CO4 induces a rapid and transient activation of MAPKs but does not induce cell death. Tobacco cells were left untreated (control) or treated with 50 nM cryptogein or 100 nM CO4, sampled at different time points, and then global protein extracts were prepared. **(A)** Protein kinase (PK) activity levels were analyzed by in-gel kinase assay using MBP as a substrate. The phosphorylation reaction was performed in the absence of Ca^{2+} in the medium. Twenty μg of total proteins were loaded *per* lane. The molecular mass (in kDa) is indicated on the left-hand side of the gels. The entire experiment was repeated independently three times. **(B)** Phosphorylated (active forms) and total MAPKs were immuno-detected using anti-human phospho-p44/42 and total MAPK antibodies, respectively. These data are representative of three independent experiments. **(C)** Cell death was measured by double staining using fluorescein diacetate and propidium iodide in tobacco cells treated or not with cryptogein or CO4 for 24 hours. Data are the mean values \pm SEs of three biological replicates. Statistical analysis was performed using Student's T-test ($p^{***} < 0.001$, $n=3$).

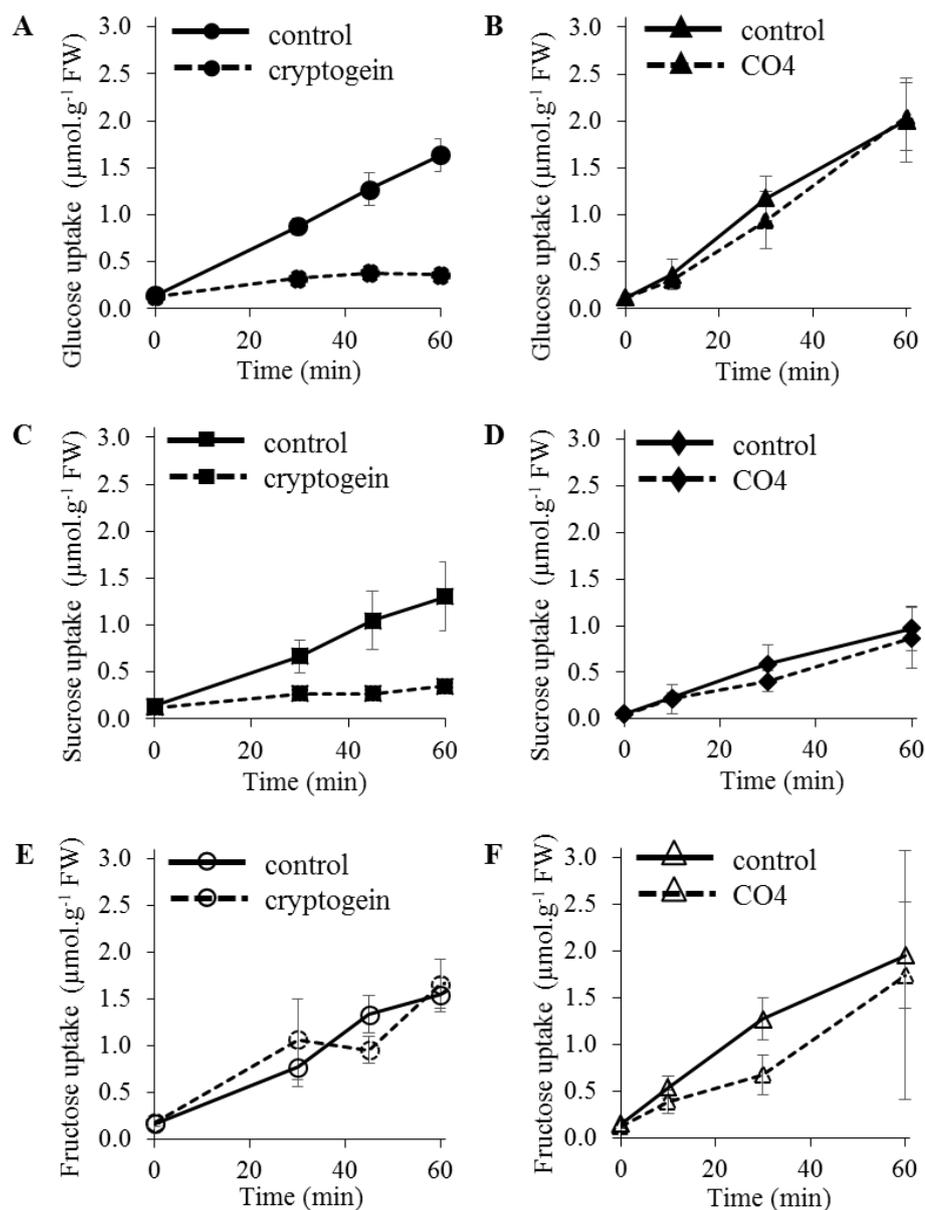


FIGURE 4. Effects of cryptogein and CO4 on glucose, sucrose, and fructose uptake in tobacco cells. (A and B) Time course of ^{14}C -glucose uptake. **(C and D)** Time course of ^{14}C -sucrose uptake. **(E and F)** Time course of ^{14}C -fructose uptake. For all experiments, cells were pre-incubated with 2 mM ^{14}C -sugar ($0.055\text{ MBq}\cdot\text{g}^{-1}\text{ FW}$ cells), and then 50 nM cryptogein (A, C, E) or 100 nM CO4 (B, D, F) were added. Controls correspond to the time course of ^{14}C -sugar uptake in the absence of cryptogein or CO4. Data represent the means \pm SEs of at least three biological replicates.

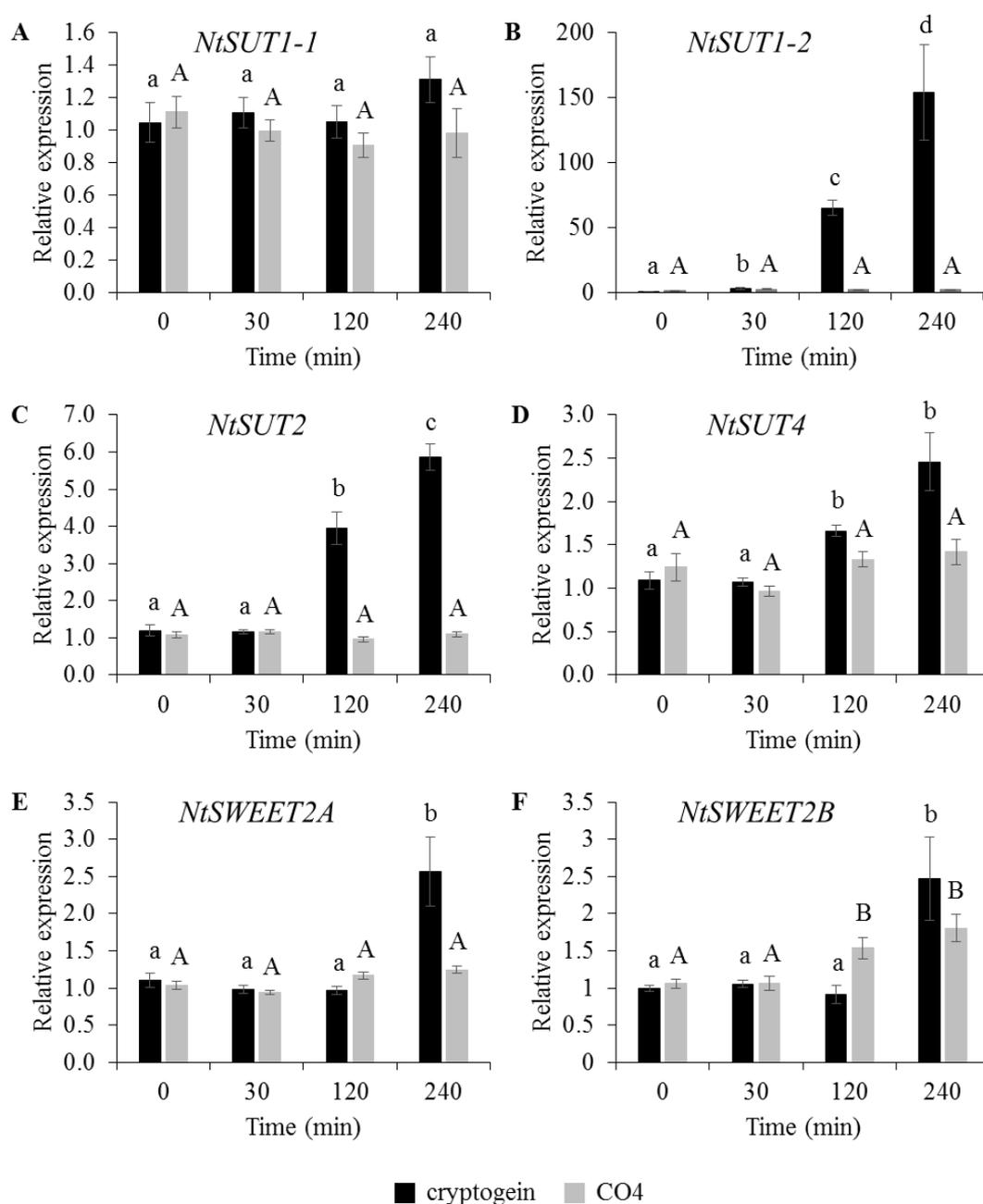
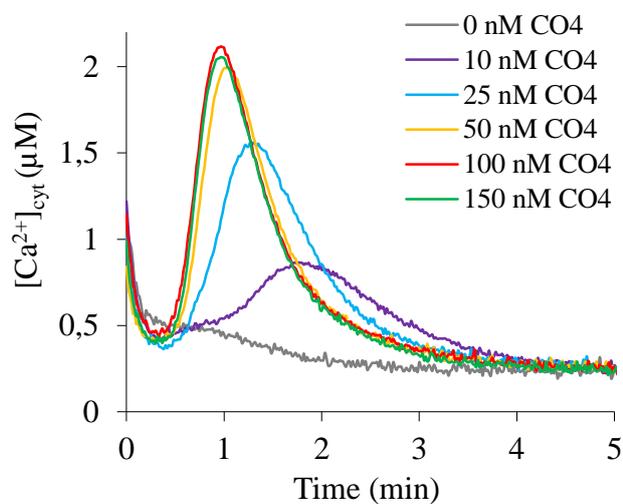


FIGURE 5. Transcript level of *NtSUTs* and *NtSWEETs* in tobacco cells 0, 30, 120 and 240 min after cryptogein or CO4 treatment. Relative expression of *NtSUT1-1* (A), *NtSUT1-2* (B), *NtSUT2* (C) and *NtSUT4* (D), *NtSWEET2A* (E) and *NtSWEET2B* (F). Transcript levels were measured in tobacco cells treated with 50 nM cryptogein (black bars) or 100 nM CO4 (grey bars). *NtEF1 α* and *NtL25* were used as housekeeping genes, and expression data were further normalized to untreated cells for each time point measurement. These data represent the means \pm SEs of three independent experiments. Statistical analysis was carried out using ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Capital or lower-case letters correspond to statistical groups following CO4 or cryptogein treatment, respectively.

Supplementary Material**Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells**

Carole Pfister*, Stéphane Bourque, Odile Chatagnier, Annick Chiltz, Jérôme Fromentin, Diederik Van Tuinen, Daniel Wipf and Nathalie Leborgne-Castel

* **Correspondence:** Carole Pfister (carolejulie.pfister@gmail.com)

**Supplementary Figure 1. Dose-response effect of CO4 on cytosolic free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) in Xanthi cells expressing cytosolic aequorin.**

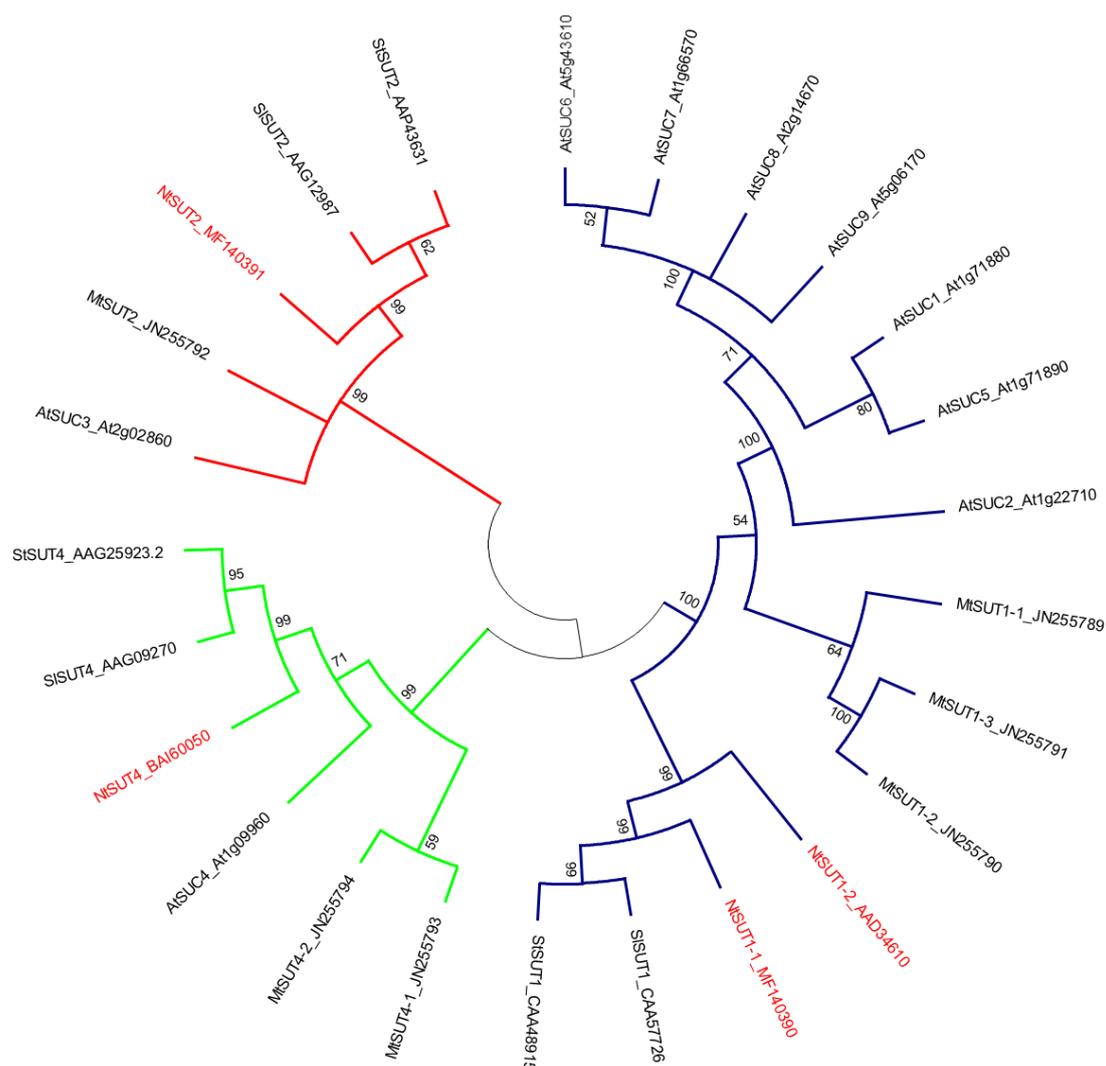
Cells were treated with 0, 10, 25, 50, 100, and 150 nM CO4. $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was measured in an *N. tabacum* cv. Xanthi cell line expressing aequorin in the cytosol and based on a bioluminescence calibration curve.

Supplementary Table 1. Cryptogein- and CO4-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ variations. Times and amplitudes of the Ca^{2+} peaks (mean values \pm SEs, n = 4-5) are given for 50 nM cryptogein (Cry) and 100 nM CO4 concentrations. Peaks 1 and 2 correspond to the first and second $[Ca^{2+}]_{cyt}$ elevations in response to cryptogein, respectively.

	Peak 1		Peak 2	
	Time (min)	Amplitude (μ M)	Time (min)	Amplitude (μ M)
Cry-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ variations	6.90 \pm 0.40	0.76 \pm 0.09	28.51 \pm 2.29	1.69 \pm 0.09
CO4-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ variations	0.99 \pm 0.05	2.03 \pm 0.36	-	-

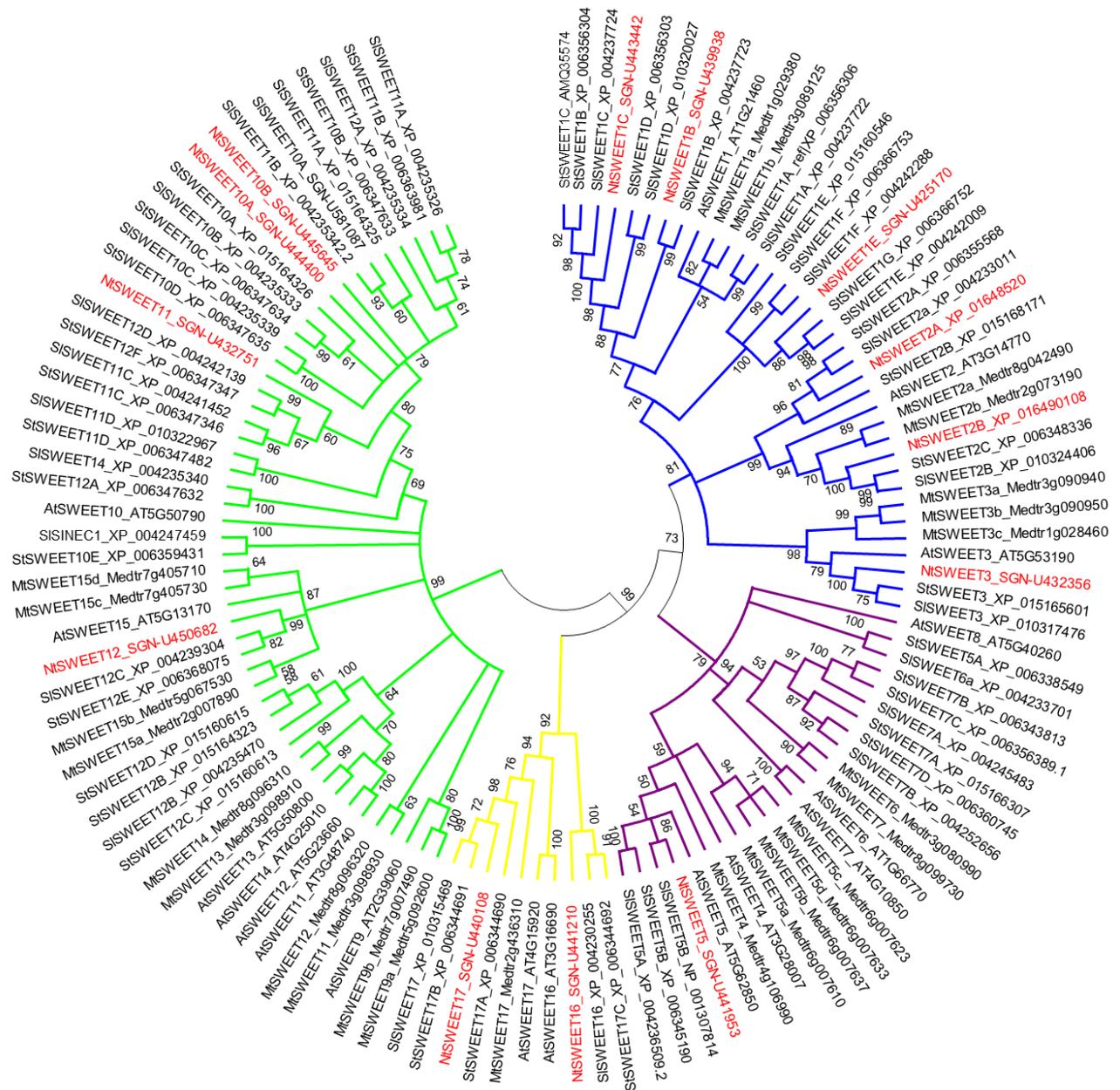
Supplementary Table 2. Cryptogein- and CO4-induced H_2O_2 production. Time and amplitude of H_2O_2 production peaks (mean values \pm SEs, n = 5-6) are given for 50 nM cryptogein (Cry) and 100 nM CO4 concentrations.

	H_2O_2 peaks	
	Time (min)	Amplitude (nmoles of $H_2O_2 \cdot g^{-1}$ FW)
Cry-induced H_2O_2 production	21.00 \pm 2.08	719.33 \pm 119.18
CO4-induced H_2O_2 production	5.60 \pm 0.01	236.20 \pm 61.56



Supplementary Figure 2. Phylogenetic tree of the plant SUT family (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*).

SUT proteins can be divided into 3 distinct clades represented by different colors: SUT1 (blue) (type I; Peng et al., 2014), SUT2 (red) (type II; Peng et al., 2014), and SUT4 (green) (type III; Peng et al., 2014). The 4 tobacco SUTs are written in red. The phylogenetic tree was constructed using the MEGA7 (Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054) program. Amino acid sequences were aligned using the multiple sequence alignment program ClustalW. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method corrected by Poisson statistical model and by applying the Neighbor-Joining and BioNJ algorithms with a bootstrap value of 500. The analysis was performed on a total of 25 sequences with 446 phylogenetically informative amino acids. Trees with branches with a robustness value below 50% were removed to obtain strong branches.



Supplementary Figure 3. Phylogenetic tree of the plant SWEET family (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*).

SWEET proteins can be divided into 4 distinct clades represented by different colors: clade 1 (blue); clade 2 (magenta); clade 3 (green), and clade 4 (yellow). The 13 tobacco SWEETs are written in red. The phylogenetic tree was constructed using the MEGA7 (Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054) program. Amino acid sequences were aligned using the multiple sequence alignment program ClustalW. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method corrected by Poisson statistical model and by applying the Neighbor-Joining and BioNJ algorithms with a bootstrap value of 500. The analysis was performed on a total of 119 sequences with 188 phylogenetically informative amino acids. Trees with branches with a robustness value below 50% were removed to obtain strong branches.

Supplementary Table 3. Primers used in the present study, related to Figure 5.

Primer names	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	References
NtSUT1-1	GGTTCCTACTCCCGCCTCTA	TTTTCGCGGACGACGGTTAGG	this work
NtSUT1-2	GTTCCAGTACTGCCACCACG	GCTGAACAATCATTCCAGAAATAGG	this work
NtSUT2	AGGTTGGCACAGATGGTTTC	AGCGATTGGTTTGCTTGAGT	this work
NtSUT4	AGCCTCTAGATCCCAATCATTGCTC	CACCATAAATTTCTCGACCAAACCA	Okubo-Kurihara et al., 2011
NtSWEET2A	AAGATGCAGCTGGAATCG CC	CCATATATGTATGGCAATCCTGAG	this work
NtSWEET2B	GATAGGAGCAATTCTTGGCATCAT	TTCCCGCACAAGAAAAAGAATCAG	this work
NtL25	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	AAGGGTGTGTTGTCCTCAATCTT	Schmidt et al., 2010
NtEF1 α	TGAGATGCACCACGAAGCTC	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG	Schmidt et al., 2010

Schéma récapitulatif illustrant l'ensemble des résultats se trouvant dans l'article.

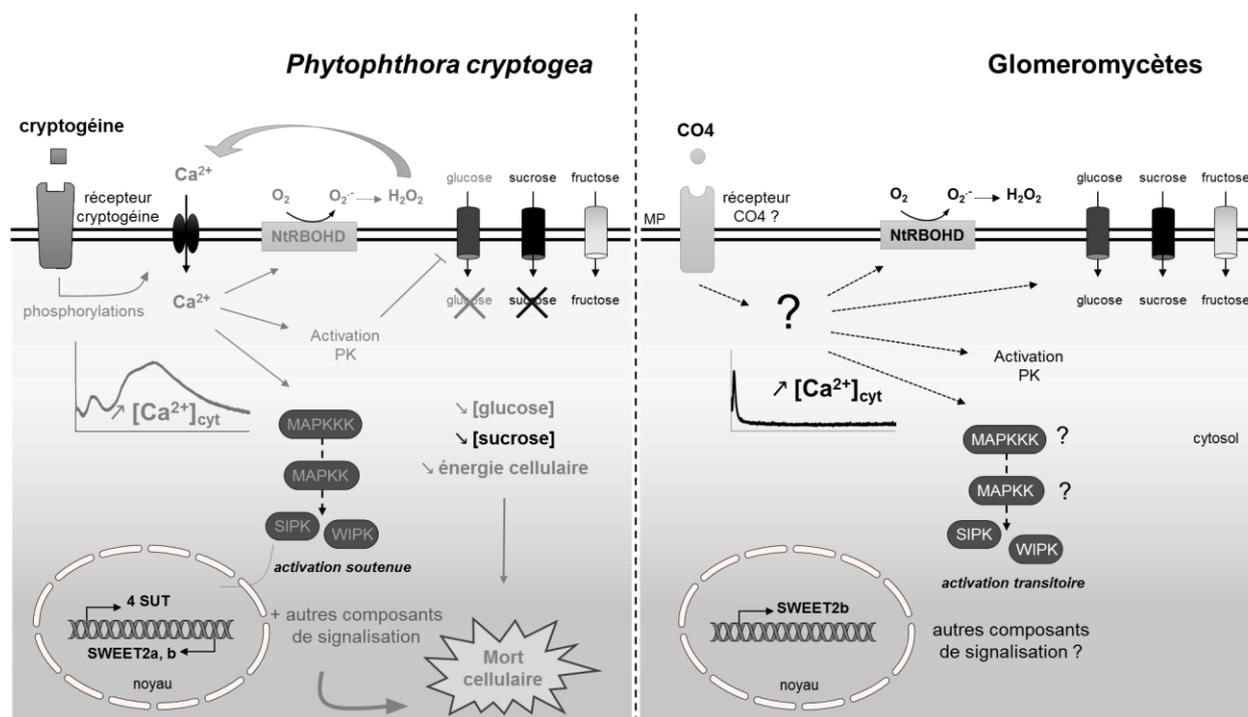


Figure I.1 : Résumé des événements déclenchés par la cryptogéine (éliciteur mimant la présence de *P. cryptogea*) et par le CO4 (molécule mimant la présence de Glomérormycètes) (Publication Pfister *et al.*, 2017, début de chapitre).

Les événements déclenchés par la cryptogéine déjà connus dans la littérature sont représentés en gris, et les événements étudiés et identifiés dans mon étude ont été représentés en noir.

A gauche - La fixation de la cryptogéine sur son récepteur (homologue à l'ELR identifié chez la pomme de terre) induit rapidement des phosphorylations de protéines, ayant pour conséquence un influx massif de Ca^{2+} dans le cytosol en 2 vagues. L'influx de Ca^{2+} influe sur la production de formes actives de l'oxygène (activation de la NADPH oxydase, NtrbohD), l'activation de la cascade des MAPK, la modulation à 4h de l'expression de gènes codant des transporteurs de sucres, et également une inhibition de l'entrée de sucres pouvant entraîner une diminution de la concentration en glucose et saccharose intracellulaire (non observé pour le fructose). Cette diminution liée à une altération de l'activité respiratoire mitochondriale participerait au déclenchement de la mort cellulaire (Bourque *et al.*, 2002).

A droite - La fixation du CO4 sur son récepteur, non identifié à ce jour, provoque des événements de signalisation précoces avec des profils très transitoires distincts de ceux plus soutenus déclenchés par la cryptogéine : une modification très rapide et transitoire de la concentration en Ca^{2+} dans le cytosol, une production d' H_2O_2 dépendante de l'activité de la NtrbohD, une activation de protéines kinases dont deux MAPK (SIPK et WIPK), et une modification à 4h de l'expression du gène codant un transporteur de sucre, de la famille des SWEET. Par contre le CO4 ne modifie pas l'absorption de sucres testés et ne déclenche pas la mort cellulaire.

III. Informations et résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article « Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells »

1. Identification et analyse *in silico* des transporteurs de sucres putatifs chez *N. tabacum* et étude de la régulation de ces transporteurs en réponse aux molécules microbiennes

L'objectif de l'étude est d'identifier les séquences putatives des transporteurs de sucres chez le tabac à partir des séquences des transporteurs de sucres connus dans d'autres espèces végétales sur la base de similarités de séquences. Pour cela, la base de données des Solanaceae, Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/>) a été interrogée en utilisant les algorithmes BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) avec différentes séquences « sujet ». Concernant l'identification des NtSUT putatifs, nous avons interrogé cette base de données avec les séquences nucléiques et protéiques des 6 SUT de *M. truncatula* (Mt) et les 9 SUT d'*A. thaliana* (At) publiées par Doidy et collaborateurs (2012b), et les 3 SUT de *Solanum lycopersicum* (Sl) publiés par Reuscher *et al* (2014). Concernant la recherche des NtSWEET putatifs, nous avons utilisé les séquences protéiques des 17 AtSWEET (TAIR10, <https://www.arabidopsis.org/>), publiées par Chen et collaborateurs (2010) et des 25 MtSWEET publiées par Manck-Götzenberger & Requena (2016) et disponibles sur la version de la base de données Mt4.0 (<http://jcv.org/medicago/>). Pour finir, nous nous sommes servis des séquences protéiques codant les 53 AtMST, publiées par Büttner (2007) pour les analyses *in silico* concernant l'identification des candidats NtMST putatifs.

Etant donné que l'annotation du génome du tabac n'est pas complète à ce jour, l'identification d'autres séquences de transporteurs de sucres chez le tabac sera à parachever dans les années à venir.

1.1 Identification de membres de la famille NtSUT

Les recherches *in silico* des NtSUT ont permis l'identification de 4 séquences de SUT putatives. La séquence *NtSUT1-1* est une séquence synthétique établie à partir d'un alignement de différentes séquences provenant de séquençages du même gène codant NtSUT1. Elle a été complétée manuellement avec une partie du génome du tabac (alignée avec ces séquences, Sierro *et al*, 2014). Nous avons déposé cette séquence dans GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) avec le numéro d'accèsion MF140390. La séquence *NtSUT1-2* (AF149981.1) est complète et avait anciennement été publiée sous le nom *NtSUT3* par Lemoine *et al* (1999). La séquence *NtSUT2* est partielle et a été déposée dans GenBank avec le numéro d'accèsion MF140391. La quatrième séquence *NtSUT4* (AB539539.1) est complète et a été publiée par Okubo-Kurihara et collaborateurs (2011). Une analyse phylogénétique des SUT, basée sur l'alignement des séquences en acides aminés de différents SUT de plantes, nous a permis de classer les séquences de tabac par clade (ou type, selon

la classification de Peng *et al.*, 2014) en fonction de leur position phylogénétique. L'arbre phylogénétique des NtSUT se trouve dans l'article présenté en début de chapitre (en Supplementary Figure 2).

1.2 Identification de membres de la famille NtSWEET

A ce jour, l'analyse *in silico* des NtSWEET putatifs a permis l'identification de 19 séquences partielles. Parmi ces 19 séquences, nous avons pu réaliser les analyses phylogénétiques uniquement sur 13 séquences possédant une longueur minimum de 235 acides aminés. L'analyse phylogénétique des SWEET se trouve également dans l'article figurant en Supplementary Figure 3. Les séquences *NtSWEET* ont été nommées en se basant sur la proximité phylogénétique avec les SWEET de tomate (SISWEET), plante phylogénétiquement proche du tabac.

1.3 Identification de membres de la famille NtMST

Les analyses *in silico* des transporteurs MST ont permis chez le tabac d'identifier 50 séquences putatives de longueurs différentes. Une analyse phylogénétique de MST basée sur l'alignement de séquences en acides aminés de différentes plantes (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *S. lycopersicum* et *N. tabacum*) a pu être réalisée sur 20 séquences plus ou moins pleines longueurs, avec une longueur minimum de 200 acides aminés. Les séquences codant les NtMST ont été renommées en se basant sur la proximité phylogénétique avec les MST de tomate (SIMST, Figure I.2). Les 20 séquences codant les NtMST figurent en rouge et sont réparties dans 6 des 7 sous-familles de MST de la manière suivante : 6 séquences de *NtMST* dans la sous-famille STP, 5 séquences de *NtMST* dans la sous-famille PLT, 2 séquences de *NtMST* dans la sous-famille VGT, 2 séquences de *NtMST* dans la sous-famille TMT, 2 séquences de *NtMST* dans la sous-famille ERD6-like et 3 séquences de *NtMST* dans la sous-famille pGlcT/SGB1. La sous-famille INT ne contient pas de séquence de MST de tabac.

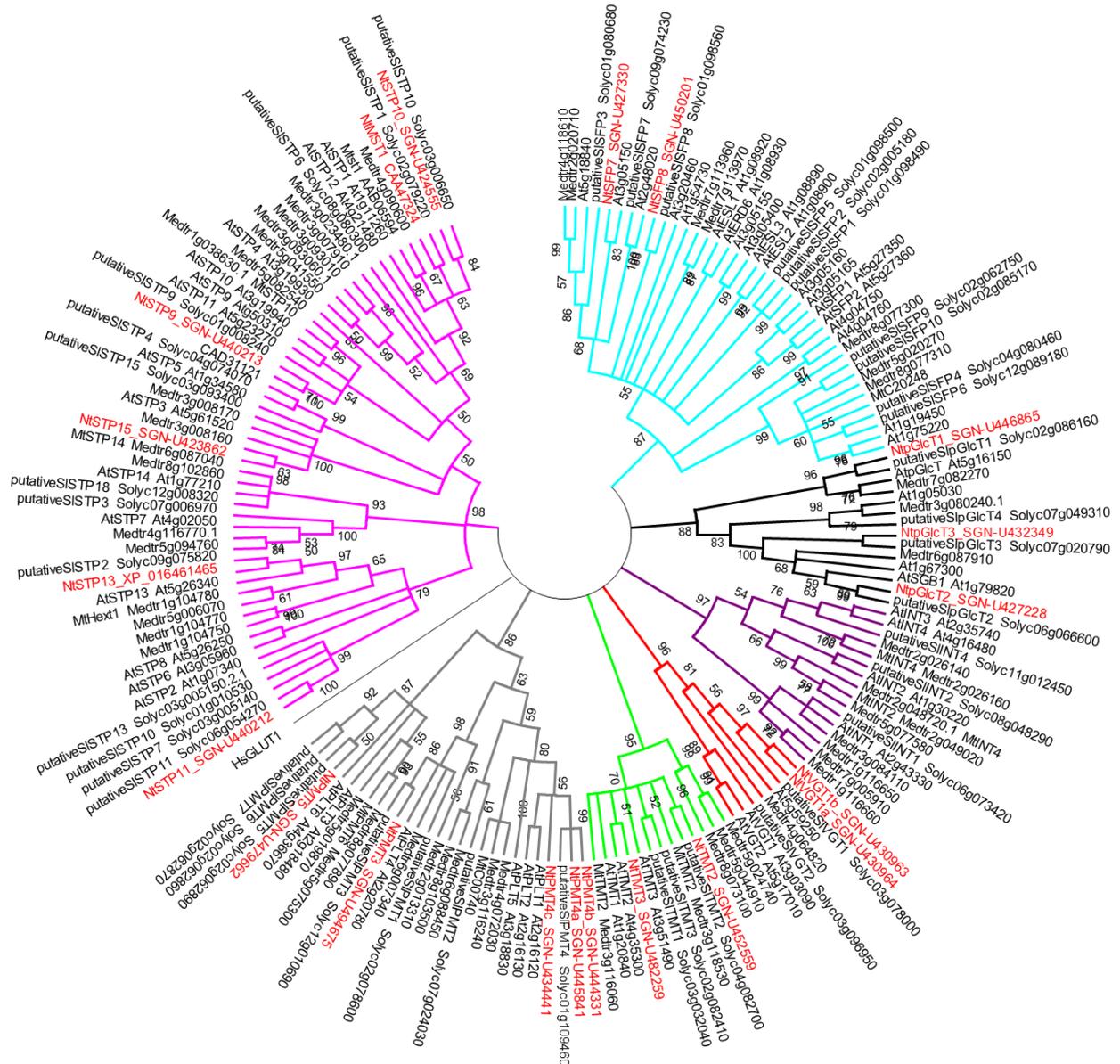


Figure I.2 : Analyse phylogénétique des transporteurs de monosaccharide MST de plantes (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *N. tabacum*, *S. lycopersicum*). Les protéines MST sont divisées en 7 sous familles : STP (Sugar Transporter Protein) en rose, PLT (Polyol Transporter) en gris, TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter) en vert, VGT (Vacuolar Glucose Transporter) en rouge, INT (Inositol Transporter) en violet, pGlcT/SGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G protein B1) en noir et ERD6-like (Early Responsive to Dehydration) en bleu. Les 20 séquences codant les NtMST figurent en rouge. La construction de l’arbre phylogénétique a été réalisée avec le programme MEGA 7 (Kumar *et al*, 2016). L’alignement des séquences d’acides aminés a été exécuté à l’aide du programme d’alignement multiple de séquences ClustalW. L’arbre a été construit en utilisant la méthode de vraisemblance maximale (Maximum Likelihood method) corrigée par le modèle statistique de correction de Poisson, et par l’application des algorithmes Neighbor-Joining et BioNJ, avec une valeur de « bootstrap » de 500. L’analyse a été réalisée sur un nombre total de 174 séquences avec 162 acides aminés phylogénétiquement informatifs.

2. Etude de la régulation de transporteurs de sucres putatifs chez *N. tabacum* en réponse aux molécules microbiennes

Ici, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'expression de certains transporteurs de sucres dans des cellules de tabac en réponse à 4 h de traitement avec la cryptogéine ou le CO₄, par RT-qPCR. Dans l'article figurant dans la première partie de ce chapitre nous avons seulement présenté les mesures d'expression relative des transcrits des gènes codant les 4 NtSUT, et les *NtSWEET2A* (XM_016629722.1 dans l'annotation originale du génome du tabac) et *NtSWEET2B* (XM_016634622.1 dans l'annotation originale du génome du tabac). En effet, à partir des 13 séquences de *NtSWEET* putatives identifiées par les analyses *in silico*, nous avons créé des amorces spécifiques de chaque séquence, mais uniquement 2 couples ont montré une amplification et bonne efficacité de PCR. Concernant la famille des MST, qui est la plus grande parmi les transporteurs de sucres, nous avons fait le choix de cibler spécifiquement quelques transporteurs ayant un rôle démontré dans les IPM : MtST1 (Harrison, 1996), *Triticum aestivum* Lr67 transporteur d'hexose (Moore *et al*, 2015), AtSTP4 (Truernit *et al*, 1996 ; Fotopoulos *et al*, 2003) et AtSTP13 (Lemonnier *et al*, 2014), et de rechercher leurs séquences orthologues chez le tabac. Nous avons identifié 4 séquences de NtMST mais seul le couple ciblant NtMST1 a montré une amplification et une bonne efficacité de PCR. Après 4 h de traitement par la cryptogéine ou au CO₄, les niveaux d'expression des transcrits du gène *NtMST1* demeurent inchangés (Figure I.3). L'analyse de l'expression de ce gène à échelle de la plante entière, a montré qu'il était pratiquement indétectable dans les feuilles sources mais fortement induit dans des tissus puits tels que les racines ou les jeunes feuilles (Sauer & Stadler, 1993). Ceci est en accord avec la forte expression de ce gène que nous observons chez les cellules indifférenciées Xanthi (expression similaire à celle de la moyenne des deux gènes de références) qui peuvent être considérées comme des jeunes cellules provenant de feuilles. Par contre, nos données indiquent que la protéine NtMST1, qui est un co-transporteur putatif d'hexoses (glucose/H⁺ et galactose/H⁺) et de pentose (xylose/H⁺), ne semble pas être impliquée dans la signalisation déclenchée par les molécules microbiennes testées dans ce travail, du moins à un stade précoce.

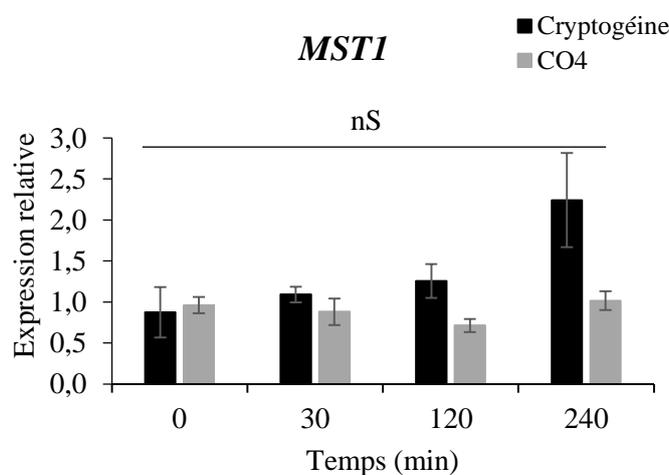


Figure I.3 : Expression relative des transcrits du gène *NtMST1* dans des cellules Xanthi traitées avec de la cryptogéine ou du CO₄ après 4h de traitement. Le niveau d'expression des messagers a été normalisé par les gènes de références NtEF1 α et NtL25, et rapporté à celui des cellules témoins non traitées à chaque point de mesure (méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Ces données représentent les moyennes de trois répétitions biologiques \pm l'erreur standard. L'analyse statistique a été effectuée par une ANOVA suivie d'un test de TUKEY ($p < 0,05$).

3. Etude des évènements de signalisation en réponse aux LCO dans des cellules Xanthi

Au début de ce projet, en collaboration avec G. Bécard (LRSV, Toulouse) et F. Maillet (LIPM, Toulouse), des essais ont été débutés avec des lipochitoooligosaccharides (LCO), ayant une structure très proche des facteurs Nod, appelés myc-LCO (Maillet *et al*, 2011). Il s'agit d'oligomères de chitine acylés (NAG reliés par des liaisons β 1;4), et peuvent être sulfatés ou non et posséder un acide oléique (C18) ou un acide palmitique (C16) sur l'extrémité non réductrice du résidu NAG. L'utilisation de LCO exogènes a montré que ces molécules semblent avoir un rôle dans l'établissement de la symbiose MA puisqu'elles peuvent stimuler la mycorhization ainsi que le développement de racines latérales de plantes légumineuses et non légumineuses (Maillet *et al*, 2011; Sun *et al*, 2015; Tanaka *et al*, 2015). Ces LCO ont été testées sur cellules en suspension afin de déterminer si ces dernières pouvaient être utilisées pour étudier les évènements de signalisation déclenchés par ces molécules et de déterminer leur rôle dans l'immunité végétale (Liang *et al*, 2013).

Dans la partie suivante, les résultats obtenus pour différents lots de LCO préparés par hémi-synthèse par H. Driguez au CERMAV (centre de recherches sur les macromolécules végétales) à Grenoble ont été présentés et détaillés en fonction du lot de LCO.

3.1 Premiers tests avec un mélange LCO_{mix} (lot 1)

Le premier lot utilisé était un mélange équimolaire de 4 formes de LCO (LCO_{mix}): LCO-C16:0 et LCO-C18:1 sulfatés et LCO-C16:0 et LCO-C18:1 non sulfatés. Ces molécules n'ayant jamais été étudiées sur suspensions cellulaires, nous avons dans un premier temps testé la réponse à ces molécules en mélange (LCO_{mix}) *via* la mesure de la production d'H₂O₂, événement de signalisation démontré sur plantes entières (Puppo *et al*, 2013; Belmondo *et al*, 2016; Montiel *et al*, 2013; Arthikala *et al*, 2013; Kiirika *et al*, 2014; Fester & Hause, 2005; Peleg-Grossman *et al*, 2012). D'après des données de la littérature, ces molécules ont été utilisées à des concentrations de 0,1, 1 et 10 nM permettant de stimuler la ramification des racines de *M. truncatula* (Maillet *et al*, 2011). Nous avons décidé de tester des concentrations plus élevées sur les cellules Xanthi afin de favoriser la visualisation d'un signal. En réponse à des concentrations de LCO_{mix} allant de 50 à 250 nM, nous avons observé une rapide augmentation d'H₂O₂ avec un pic maximal à 10 min après traitement, suivi d'une diminution très rapide. Au pic, une production de 14,5, 39 et 41 nmoles d'H₂O₂.g⁻¹ de cellules ont été mesurées respectivement en réponse à 50, 100 et 250 nM en LCO_{mix} (Figure I.4). Les valeurs équivalentes des deux dernières concentrations sembleraient indiquer une saturation de la réponse. Cette première expérience prometteuse sur la perception des LCO *via* la mesure de la production d'H₂O₂, par les cellules de tabac, nous a encouragé à déterminer quelle(s) forme(s) de LCO présente(s) dans le mélange étai(en)t à l'origine de la réponse.

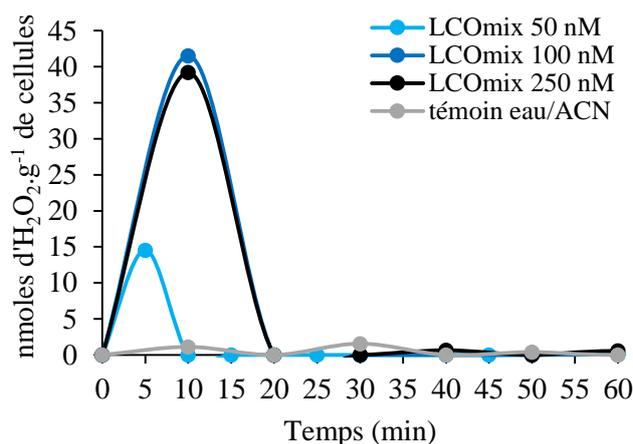


Figure I.4 : Cinétique de production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans des cellules Xanthi traitées avec des concentrations croissantes en LCO_{mix} (lot 1). Les cellules à 7 jours de culture ont été diluées au demi pendant 1 jour, puis équilibrées dans du tampon d'équilibration durant 2h avant d'être traitées avec 50, 100 ou 250 nM en LCO_{mix} (mélange équimolaire de 4 formes de LCO : C16:0, C18:1 sulfatés et C16:0, C18:1 non sulfatés). Une seule expérience biologique a été effectuée.

3.2 Analyse des 4 formes isolées de LCO et du CO4 sur cellules Xanthi (lot 2)

Les 4 formes de LCO (LCO-C16:0 et LCO-C18:1 sulfatés et LCO-C16:0 et LCO-C18:1 non sulfatés) ainsi que le CO4 ont été utilisés (les résultats complets obtenus avec le CO4 sont présentés dans la publication en début de ce chapitre).

La production d'H₂O₂ sur cellules traitées avec 100 nM de chaque LCO isolé, et 100 nM de CO4 a été mesurée, et comparée avec celle induite par 100 nM de LCO_{mix} (du lot 1). Comme précédemment, une augmentation rapide et transitoire d'H₂O₂ entre 5 et 10 min après traitement des différentes molécules, suivi d'une diminution très rapide, a été observée pour tous les facteurs myc testés avec des différences d'amplitudes de réponses (Figure I.5). Le CO4 a engendré la plus forte production en H₂O₂ (290 nanomoles d'H₂O₂·g⁻¹ de cellules au pic) (Figure I.5, courbe bleue foncée). Le mélange LCO_{mix} (du lot 1) a montré une production de 145 nanomoles d'H₂O₂·g⁻¹ de cellules (Figure I.5, courbe orange). Par contre, les cellules traitées avec les LCO isolés ont produit 15 et 60 nanomoles d'H₂O₂·g⁻¹ de cellules au pic (Figure I.5, courbes grise, jaune, bleu claire et verte). Cependant, les profils de production d'H₂O₂ quelque soit la molécule, montre une « signature » équivalente.

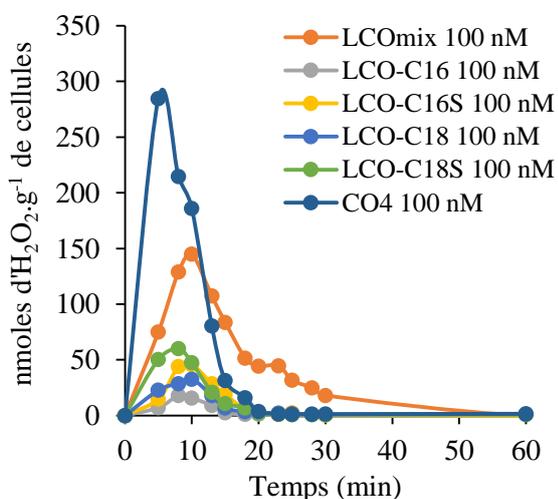


Figure I.5 : Cinétique de production d'H₂O₂ dans des cellules Xanthi traitées avec les facteurs myc LCO et CO4 (lot 2). Les conditions de culture et de traitement sont les mêmes que ceux cités précédemment (Figure I.4). Les cellules ont été traitées avec 100 nM en LCO isolés (C16:0, C18:1 sulfatés, C16:0, C18:1 non sulfatés) ou LCO_{mix} (du lot 1) ou 100 nM de CO4. Ces graphiques sont représentatifs d'une répétition biologique sur 4.

Toutefois, au cours de répétitions biologiques, il a été noté de fortes variabilités dans les mesures de la production d' H_2O_2 suite au traitement par les LCO isolés et LCO_{mix} (du lot 1) (Figure I.6) alors que le CO4 engendrait à chaque répétition une forte production d' H_2O_2 avec un profil de production reproductible dans le temps.

Nous nous sommes donc interrogés sur i) la stabilité de ces molécules, ou ii) une éventuelle dégradation des LCO en COs plus courts dans certains échantillons (voir plus bas).

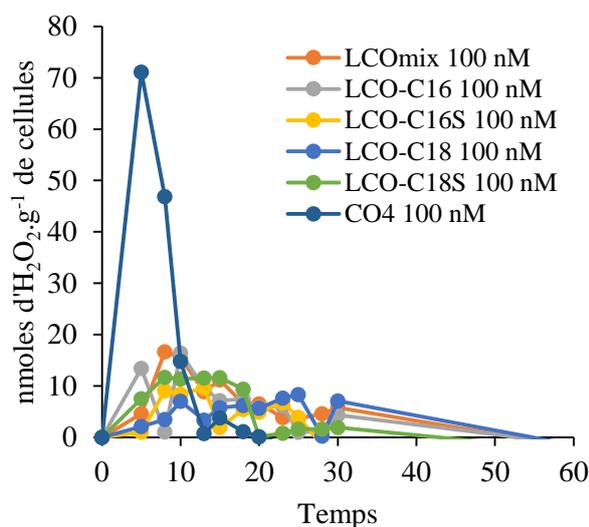


Figure I.6 : Cinétique de production d' H_2O_2 dans des cellules Xanthi traitées avec les facteurs myc-LCO et CO4 (lot 2). Les conditions de culture et de traitements sont les mêmes que cités précédemment (Figure I.4). Graphique représentatif d'une répétition biologique.

3.3 Utilisation d'un troisième lot en LCO isolés et CO4 (lot 3)

Des tests avec des nouveaux lots en LCO isolés (C16:0 et C18:1 sulfatés et C16:0 et C18:1 non sulfatés) ainsi qu'avec un nouveau lot de CO4 ont été menés. En raison des fortes variabilités dans la production d' H_2O_2 en réponse à une forme donnée de LCO, nous avons décidé d'utiliser un mélange équimolaire à 100 nM des 4 formes nommé LCO_{mix} (du lot 3), pour vérifier s'il était possible de reproduire les réponses cellulaires obtenues précédemment avec le lot 1 qui semblait plus stable. Ce mélange a été utilisé pour la mesure non seulement de la production d' H_2O_2 mais également de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$.

Concernant la mesure de la production en H_2O_2 , le nouveau mélange LCO_{mix} (du lot 3) n'a engendré qu'une production très faible (1,5 nanomoles d' $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$ de cellules) en réponse à 50 nM en LCO_{mix} , et même non dosable pour des concentrations de 100 et 200 nM LCO_{mix} (courbes en 'yoyo', données non montrées).

Nous nous sommes interrogés sur la réponse des cellules en fonction de leur « âge physiologique », car habituellement utilisées à 7 jours après repiquage et diluées au demi, qui représentent les conditions optimales de traitements pour la cryptogéine sur cellules Xanthi (Pugin *et al*, 1997; Bourque *et al*, 2002; Kulik *et al*, 2015). Nous avons donc analysé la production d' H_2O_2 de cellules à différents jours de culture en réponse aux LCO_{mix} (du lot 3) et au CO4 à 50, 100 et 200 nM (voir Tableau I.1 et la Figure I.7) mais sans amélioration de la réponse, les cellules à 7 jours de culture répondant de manière plus « importante ». Ce résultat peut indiquer, comme pour l'élicitation par la cryptogéine, que l'âge physiologique des cellules est important pour

leur perception de molécules microbiennes. Ces expériences nous ont toutefois permis de valider et d'utiliser ces conditions expérimentales pour tous les essais ultérieurs avec le CO4 (publication en début de chapitre).

Tableau I.1 : Valeurs des mesures d'H₂O₂ au pic entre 5 et 10 min après traitement avec 50, 100 et 200 nM en myc-LCO et CO4 (lot 3) sur cellules Xanthi à différents jours de culture. Cette production a été mesurée à 2, 4, 5, 6 et 7 jours après repiquage des cellules et à 6 et 7 jours après repiquage suivi d'une dilution au demi dans du milieu frais pendant 24 h avant le jour de l'expérience. En raison de grandes variations dans les mesures (courbe en 'yoyo') la production n'a pas toujours pu être mesurée (mention n.m pour non mesurée).

Jours de cultures	J2	J4	J5	J6	J6 diluées au demi	J7	J7 diluées au demi
CO4 50 nM	n.m	5,5	0,6	0,6	40	0,13	5,1
CO4 100 nM	n.m	2,52	0,7	n.m	1,6	0,40	27,8
CO4 200 nM	n.m	2,8	1,2	n.m	3,2	n.m	1,87
LCO mélange 50 nM	n.m	n.m	n.m	n.m	0,6	n.m	1,5
LCO mélange 100 nM	n.m	n.m	0,22	n.m	0,4	0,026	n.m
LCO mélange 200 nM	n.m	1,6	0,2	1	0,4	0,082	2,24

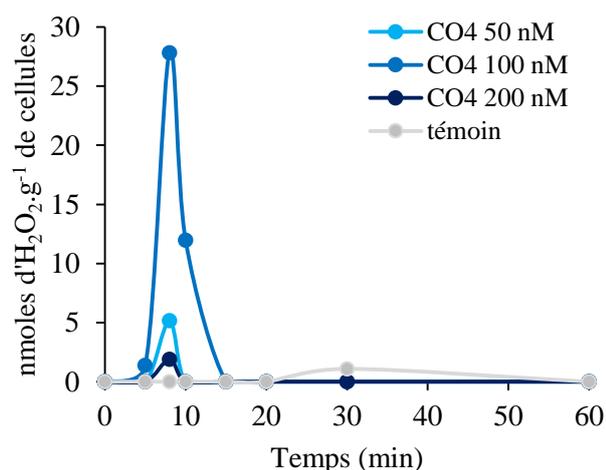


Figure I.7 : Cinétique de production d'H₂O₂ dans des cellules Xanthi traitées avec 50, 100 ou 200 nM en CO4 (lot 3). Les conditions de culture et de traitement sont les mêmes que cités précédemment. Les cellules ont été traitées avec 3 concentrations croissantes en CO4. Les cellules témoins correspondent à des cellules non traitées. Ce graphique est représentatif d'une répétition biologique.

Nous avons également analysé l'effet des facteurs Myc sur la variation de la [Ca²⁺]_{cyt} à l'aide de cellules Xanthi exprimant la forme non fonctionnelle de l'aequorine cytosolique (Manzoor *et al*, 2012). La suspension cellulaire a été réinitialisée au cours de ma thèse à partir de feuilles provenant de germinations, et analysée quant à sa réponse à l'éliciteur cryptogéine (publication en début de chapitre). Une suspension de cellules Xanthi exprimant la forme nucléaire de l'aequorine n'a malheureusement pas pu être utilisée car les cellules ne reconstituaient plus l'aequorine comme décrit dans Lecourieux et collaborateurs (2005).

Les mesures des variations de la [Ca²⁺]_{cyt} en réponse au CO4, dès 1 minute de traitement ont été présentées dans l'article en début du chapitre (Figure I.8) et indiquent une signature transitoire et rapide. Par contre, quelque soit la concentration en LCO_{mix} ou isolés (du lot 3), aucune variation de [Ca²⁺]_{cyt} n'a pu être montrée (Figure I.8).

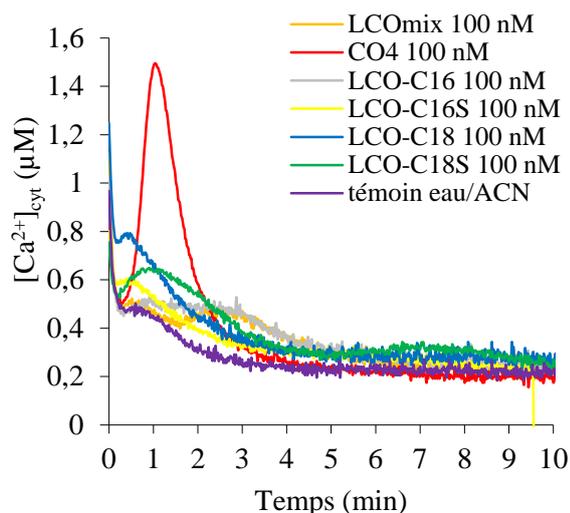


Figure I.8 : Mesure de la concentration en calcium libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) en réponse à 100 nM en myc-LCO et CO4 (lot 3). Les conditions de culture et de traitement sont les mêmes que cités précédemment. La $[Ca^{2+}]_{cyt}$ a été mesurée dans la lignée Xanthi exprimant l'aéuorine dans le cytosol par bioluminescence. Résultat représentatif de 5 répétitions biologiques.

La variabilité des réponses cellulaires en fonction des différents lots en LCO, ne nous a pas permis d'exploiter les données obtenues avec ces molécules. De plus, cette variabilité observée nous a conduits à nous interroger sur la stabilité des LCO dans le temps. En effet, les LCO peuvent se dégrader partiellement en CO courts (communication personnelle de G. Bécard), ce qui pourrait expliquer les réponses variables observées au cours des essais utilisant les LCO mais non observées avec le CO4.

Afin de tester la stabilité des LCO dans le temps, nous avons traité les cellules Xanthi avec 100 nM de LCO-C18S (du lot 2) et nous avons effectué un prélèvement du milieu extracellulaire immédiatement après traitement (T0) puis à 60 min (T60). Les surnageants lyophilisés ont été ensuite analysés par V. Puech-Pagès au LRSV de Toulouse afin de détecter la stabilité de la molécule dans le temps. En parallèle, l'analyse des autres molécules des lots 1 et 2 a été réalisée par A. Bascaules au LRSV de Toulouse par des analyses LC-MS/MS sur un système UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse Q-Trap 4500 (AB Sciex). Chaque échantillon a été analysé en triplicat pour une recherche de CO courts (CO2, CO3, CO4, CO5 et CO6) et de LCO (C16:0 et C18:1 non sulfatés, C16:0 et C18:1 sulfatés).

Dans un premier temps les analyses des lyophilisats de surnageants au temps 0 et 60 min ont montré que les LCO-C18S sont stables dans le temps puisque aucune accumulation de CO n'a été détecté au cours de la cinétique (données non montrées). Par contre l'analyse des lots 1 et 2 a permis de détecter la présence de 1 à 3 % de CO3 et CO4 (Tableau I.2). Les analyses ont révélé que le premier mélange LCO_{mix} fourni (lot 1), où nous avons pu mesurer une production d' H_2O_2 , contenait une contamination en CO courts de type CO3, CO4 et CO5. Le lot 2 (comprenant les 4 formes isolées en LCO), où des productions d' H_2O_2 variables ont été mesurées, contenait également une contamination en CO courts de type CO3, CO4, CO5 pour le LCO-C16, de type CO3 pour le LCO-C16 sulfaté et de type CO3 et CO4 pour le LCO-C18 sulfaté. Aucune présence de CO courts n'a été observée dans le reliquat LCO-C18. De plus, les CO2 et CO6 n'ont pas été détectés de façon fiable (communication d'A. Bascaules). Le lot 3 n'a pas été analysé.

A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ces faibles quantités en CO courts détectées dans les différents lots 1 et 2 permettent d'expliquer la réponse des cellules après un traitement LCO ainsi que la variabilité dans les mesures d'H₂O₂ observées au cours des différents essais.

Tableau I.3 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats en réponse aux différents lots en LCO et l'analyse de leur contenu.

Lot n° LCO	LOT 1	LOT 2	LOT 3
Type de molécules	LCO _{mix} (un mélange de 4 formes)	4 LCO isolés	4 LCO isolés
Production d'H ₂ O ₂	OUI	OUI avec variabilité dans les mesures	variabilité dans les mesures et production très faible d'H ₂ O ₂
Signal calcique	pas testé	pas testé	non
Analyses des lots	2,2% de CO3 2,7% de CO4 4,3% de CO5	C16 : 1,5% de CO3 ; 8,8% de CO4 ; 3,7% de CO5 C16S : 6,8 % de CO3 C18 : pas de COs détecté C18S : 1 à 3% de CO3 et CO4	non analysé

IV. Conclusions

Le travail présenté dans ce premier chapitre s'inscrit dans une meilleure compréhension des interactions entre les plantes et les microorganismes par le déchiffrement d'événements de signalisation et/ou les échanges de sucres liés à différents modes de vie microbiens ainsi que les résultats de ces interactions (pathogénèse *versus* mutualisme).

Nous avons mis en évidence que les CO4 sont bien perçus par les cellules indifférenciées de tabac. En raison des variabilités dans les réponses de la production d'H₂O₂ (peut être dues à des composés de dégradation résultant en une contamination en CO) nous n'avons pas pu aller plus loin dans la caractérisation des événements de signalisation précoces en réponse aux LCO.

Toutefois, ce travail a permis de montrer, par un comparatif CO4/cryptogéine, que deux molécules microbiennes provenant de microbes à stratégies trophiques différentes mobilisent les mêmes événements de signalisation précoce (H₂O₂, calcium, MAPK) mais avec des réponses temporelles différentes. Ces dernières pouvant avoir un impact distinct sur les relations trophiques entre les plantes et les microorganismes dont ils découlent. Cela ouvre la voie à de nouvelles recherches visant à élucider de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place des IPMs et de leur devenir.

CHAPITRE II

Étude détaillée de réponses cellulaires, suite à l'élicitation par la cryptogéine, dans des lignées de tabac perturbées dans le trafic membranaire

I. Avant-propos

La membrane plasmique, à l'interface entre la cellule et son environnement, perçoit les multiples signaux extérieurs qui sont propagés vers l'intérieur de la cellule pour mettre en place des réponses appropriées. Elle est le lieu de remaniements dynamiques constants qui mettent « en relation » le milieu intérieur et le milieu extérieur de la cellule en gardant l'isolement des deux milieux. Une arrivée constante à la membrane plasmique (ou dans l'apoplasme) de composés (protéines, lipides, sucres) se fait *via* le système endomembranaire de sécrétion. Le départ des composés de la membrane plasmique par endocytose est nécessaire pour leur dégradation vers la vacuole ou leur recyclage. Cette dynamique membranaire est notamment finement contrôlée lors des IPM (Leborgne-Castel and Bouhidel, 2014).

Un de nos questionnements a été d'appréhender un potentiel rôle régulateur, dans la signalisation et le transport de sucres lors de l'élicitation par la cryptogéine, de la dynamique membranaire, et plus particulièrement les processus du trafic membranaire liés à la clathrine (par exemple l'endocytose à clathrine). Pour cela, nous avons utilisé des lignées cellulaires de tabac Xanthi perturbées dans les processus liés à la clathrine (précédemment obtenues, mais non caractérisées, au laboratoire lors de la thèse de T. Adam, 2012).

L'endocytose correspond à l'internalisation de régions de la membrane plasmique sous forme de vésicules libérées dans le cytoplasme permettant l'entrée de composés solubles extracellulaires, mais également le recyclage ou la dégradation de constituants membranaires. La voie d'endocytose majoritaire chez les plantes est l'endocytose liée à la clathrine (Clathrin-Mediated Endocytosis ; CME), appelée ainsi car la protéine majoritaire impliquée dans ce processus est la clathrine. Cette protéine comprend des chaînes lourdes (Clathrin Heavy Chain ; CHC) et des chaînes légères (Clathrin Light Chain ; CLC) qui se lient entre elles. Ces chaînes forment un triskèle de clathrine après association de trois chaînes lourdes de clathrine et de trois chaînes légères (Figures II.1 et II.2). Plusieurs triskèles s'associent entre eux afin d'entourer la vésicule, en cours de formation et contenant des cargos (par exemple PRR), d'un manteau de clathrine, formant ainsi une « cage ». La CME se déroule en différentes étapes qui sont présentées en Figure II.1. La clathrine contribue avec d'autres protéines accessoires et un complexe adaptateur AP-2 (composés de 4 sous-unités) à déformer la membrane plasmique permettant successivement la formation d'une invagination, puis d'une vésicule qui va se détacher de la membrane plasmique vers le TGN/EE, permettant le recyclage/dégradation de la protéine endocytée.

Il est à noter qu'en plus des vésicules mantelées de clathrine se formant à la membrane plasmique pour l'endocytose, la clathrine s'assemble également au TGN (Figure E.17 présentant le trafic global) mais leur fonction exacte dans cet organite n'est pas encore élucidée (Robinson and Pimpl, 2014).

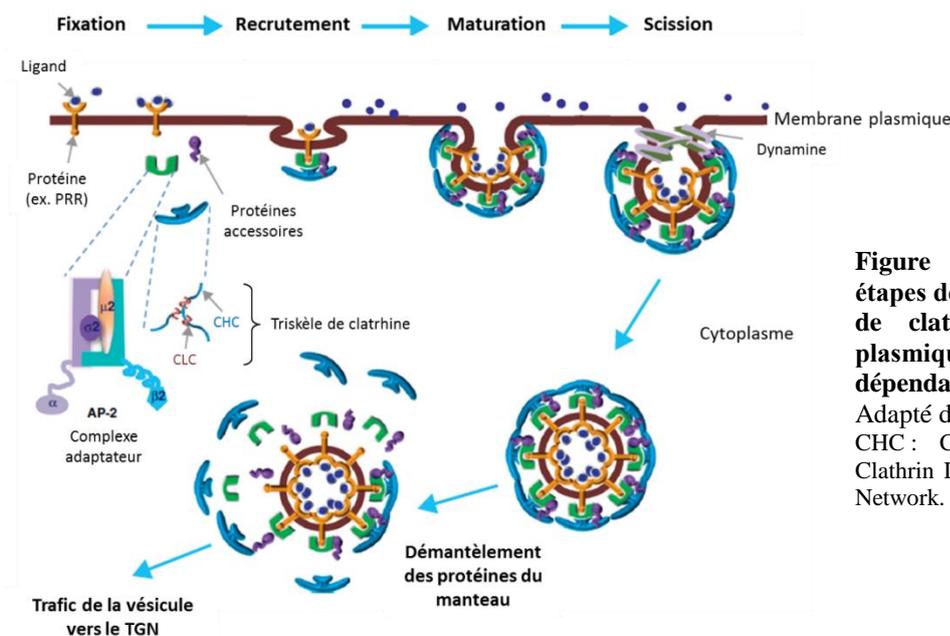


Figure II.1 : Représentation des étapes de la formation d'une vésicule de clathrine à la membrane plasmique reflétant l'endocytose dépendante de la clathrine (CME). Adapté de Chen *et al.*, 2011. CHC : Clathrin Heavy Chain ; CLC : Clathrin Light Chain ; TGN : Trans Golgi Network.

Un historique des travaux précédemment réalisés au laboratoire et notamment par Thibaud Adam (2012), qui a obtenu les lignées de tabac que j'ai utilisé dans mes travaux de thèse, est présenté ci-dessous.

Historique d'obtention des lignées exprimant le domaine Hub

Des travaux menés au laboratoire ont mis en évidence une augmentation de l'endocytose d'un marqueur membranaire fluorescent dans des cellules de tabac cv. BY-2 élicitées par la cryptogéine (Leborgne-Castel *et al.*, 2008). Une analyse en microscopie électronique a montré que cette endocytose induite était de type CME (Leborgne-Castel *et al.*, 2008). Une version tronquée de la CHC appelée domaine Hub, possédant le domaine d'attache à la CLC et le domaine de trimérisation des CHC (Liu *et al.*, 1995), a été exprimée dans les cellules BY-2 (Adam *et al.*, 2012) dans le but de perturber l'assemblage des triskèles de clathrine (Figure II.2) et de réduire, voire d'inhiber, la CME. L'expression du Hub n'a pas eu d'effet notable sur l'endocytose constitutive mais a eu un effet dominant négatif sur l'endocytose induite par la cryptogéine.

Lors de sa thèse, T. Adam a généré également des lignées surexprimant le domaine « Hub » (appelées lignées ou cellules Hub par la suite) à partir du cv. Xanthi, par la transformation de disques foliaires *via Agrobacterium tumefaciens*. Les plantules ont été criblées et sélectionnées en fonction du niveau le plus élevé d'expression du transcrit codant le domaine Hub sans que cela n'affecte leur viabilité. Des lignées transgéniques indépendantes ont ainsi été obtenues et nommées respectivement Hub1.5, Hub7.6 et Hub14.11 (Thèse T. Adam, 2012). Il est à noter que, par rapport aux deux autres lignées, la lignée Hub14.11 exprimait plus fortement le domaine Hub (données thèse T. Adam 2012).

Les lignées cellulaires Hub utilisées pour mes travaux ont été obtenues à partir des feuilles de plantes transgéniques F2 *via* un milieu d'induction de la callogenèse (thèse T. Adam 2012). J'ai donc entrepris leur caractérisation vis-à-vis de l'endocytose et leurs réponses dans les premières heures suivant la perception de la cryptogéine. L'étude a été menée principalement avec deux lignées indépendantes Hub1.5 et Hub14.11.

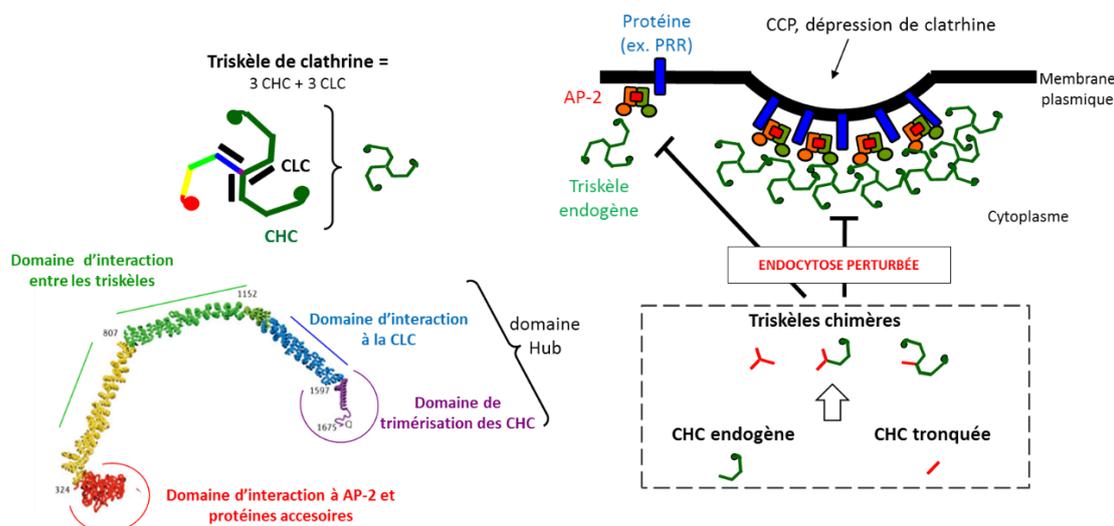


Figure II.2 : Schéma explicatif de la stratégie génétique utilisée pour modifier l'endocytose à clathrine. Expression de la CHC tronquée (domaine Hub) formant des triskèles de clathrine chimères avec les CHC endogènes pouvant perturber l'endocytose (d'après la thèse de T. Adam, 2012). AP2 : complexe adaptateur 2 ; CHC : Clathrin Heavy Chain ; CLC : Clathrin Light Chain ; CCP : puits mantelé de clathrine.

II. L'expression d'une version tronquée de la CHC, le domaine Hub, réduit l'endocytose induite par la cryptogène dans des cellules Xanthi

1. Les transcrits du domaine Hub sont présents dans les cellules transgéniques Hub

Le niveau d'expression du domaine Hub a été estimé dans les lignées transgéniques Hub1.5 et Hub14.11 afin de s'assurer de la présence du transgène (Figure II.3). Les 2 lignées cellulaires expriment bien le domaine Hub avec des niveaux d'expression statistiquement différents, de 0,34 pour les cellules Hub1.5 et de 0,40 pour les cellules Hub14.11 (Figure II.3). Aucune expression du domaine Hub n'est mesurée dans les cellules contrôles non transformées appelées par la suite Xanthi. Ces résultats confirment les résultats obtenus lors de la thèse T. Adam (2012), où les plantules Hub14.11 exprimaient également plus fortement le transcrit Hub par rapport à la lignée Hub1.5.

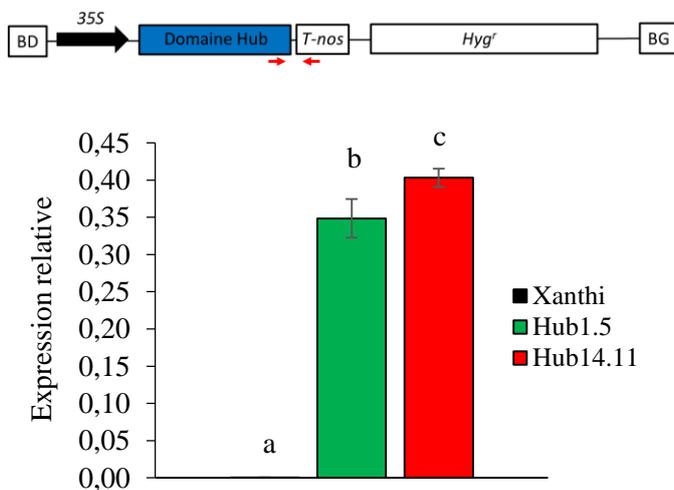


Figure II.3 : Niveau d'expression du Hub par RT-qPCR. Les niveaux d'expression du Hub ont été normalisés en utilisant les gènes de références *NtEF1a* et *NtL25* par la méthode $2^{-\Delta Ct}$ et déterminés à l'aide d'un couple d'amorces (flèches rouges) se trouvant à cheval entre la fin de la séquence du Hub et le début du terminateur *nos* de la construction génétique, qui n'amplifie que le Hub sans amplifier le gène CHC endogène. Ces données correspondent à la moyenne de 4 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. L'analyse statistique a été effectuée par une ANOVA suivie d'un test de TUKEY, les lettres indiquent les groupes statistiquement différents ($p < 0,05$). BD : bord droit de l'ADN-T; BG : bord gauche de l'ADN-T; Hyg^r : gène de résistance à l'hygromycine ; 35S : promoteur *CaMV 35S* ; T-nos : terminateur de la nopaline synthase.

2. Analyse de l'endocytose

L'analyse de l'endocytose a été effectuée par visualisation et mesure de l'internalisation du FM4-64, un marqueur membranaire fluorescent de l'endocytose (Bolte *et al.*, 2004). Le FM4-64 pénètre dans les cellules en quelques minutes et marque des structures ponctiformes appelées endosomes (Figure II.4). Les endosomes fluorescents sont dénombrés, à différents temps à la périphérie de cellules non juxtaposées (Figure II.4B). Le périmètre des cellules où les endosomes sont comptés est mesuré (Figure II.4C) et le nombre d'endosomes pour 100 μm de membrane est ensuite calculé.

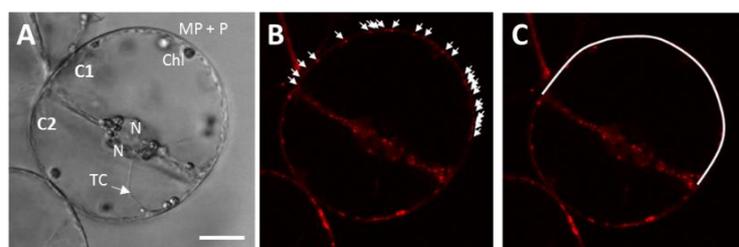


Figure II.4 : Acquisition et traitement d'images pour la quantification de l'endocytose dans les cellules Xanthi. A. Image en contraste différentiel interférentiel (Nomarski) de cellules Xanthi. B. Dénombrement des endosomes fluorescents (flèches blanches) à la périphérie de la cellule. C. Traçage et mesure du périmètre cellulaire où les endosomes sont dénombrés. Pour rappel l'auto-fluorescence de la chlorophylle n'a pas été prise en compte dans les mesures de l'internalisation du FM4-64. C1 & C2 : cellule 1 et cellule 2 ; N : noyau; Chl : chloroplaste ; TC : travée cytoplasmique ; MP : membrane plasmique ; P : paroi. Barre = 15 μm . Images C. Der.

3. La cryptogéine stimule l'endocytose dans les cellules Xanthi

Dans des cellules non élicitées, le nombre d'endosomes marqués augmente légèrement dans les premières minutes de la cinétique ce qui traduit la pénétration progressive du FM4-64 dans les différents compartiments de la voie endocytique et reflète l'endocytose dite constitutive (Figure II.5, colonnes bleues).

Après ajout de la cryptogéine, une augmentation significative du nombre de structures fluorescentes a été observée par rapport aux cellules Xanthi non élicitées après 10 min, soulignant une endocytose induite par l'éliciteur (Figure II.5, colonnes rouges). Ce résultat est similaire à celui obtenu lors d'une précédente étude menée sur des cellules de tabac BY-2 (Leborgne-Castel *et al.*, 2008). Nous ne pouvons cependant pas affirmer, même si cela a été démontré chez la lignée tabac BY-2, que seule l'endocytose liée à la clathrine est induite. Des analyses plus poussées par microscopie électronique seraient nécessaires pour cela, mais elles n'étaient pas envisageables au cours de ma thèse.

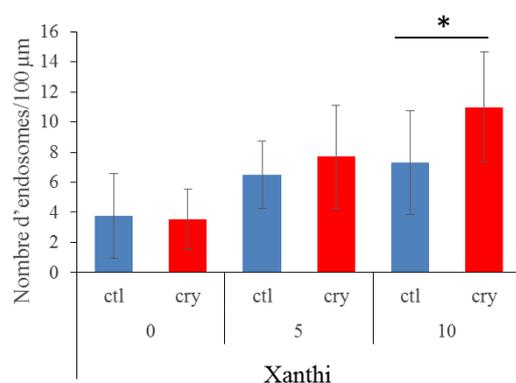


Figure II.5 : Cinétique d'internalisation du FM4-64 dans les cellules Xanthi élicitées par la cryptogéine. Dénombrement des endosomes marqués au FM4-64 dans l'environnement de la membrane plasmique chez les cellules Xanthi traitées (cry) ou non (ctl) par la cryptogéine durant 15 min. Les données correspondent à la moyenne de 5 répétitions biologiques \pm l'erreur-standard. L'astérisque indique une différence statistiquement significative entre les cellules non élicitées et élicitées (Test Mann-Whitney, $p < 0.05$).

4. L'endocytose constitutive n'est pas inhibée dans les cellules exprimant le domaine Hub

Après application du FM4-64, la présence de structures ponctiformes fluorescentes dans le cytoplasme des cellules exprimant le domaine Hub (Figure II.6), témoigne de l'internalisation du marqueur par endocytose. Nous avons constaté que l'endocytose constitutive est plus importante dans les cellules Hub1.5, et statistiquement différente des lignées Hub14.11, et Xanthi (Figure II.6). Nous n'avons pas d'explication directe à ce phénomène. Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent que l'expression du domaine Hub ne bloque pas l'endocytose constitutive. En effet, un blocage complet de l'endocytose, processus essentiel pour la cellule, est létal. Les travaux de Tahara et collaborateurs (2007) ont montré que l'expression forte du domaine Hub dans les cellules BY-2 provoquait en plus des altérations de la morphologie, de la croissance et de la division cellulaire, un blocage de l'internalisation de la sonde FM4-64. De même chez *Arabidopsis* le mutant *chc2* ainsi qu'une lignée exprimant le *Hub* sous la dépendance d'un promoteur inductible sont inhibés pour l'endocytose constitutive, l'internalisation et le recyclage de protéines dont les transporteurs d'auxine. Cette inhibition entraînant des altérations de la polarité cellulaire et de l'organogénèse (Kitakura *et al.*, 2011).

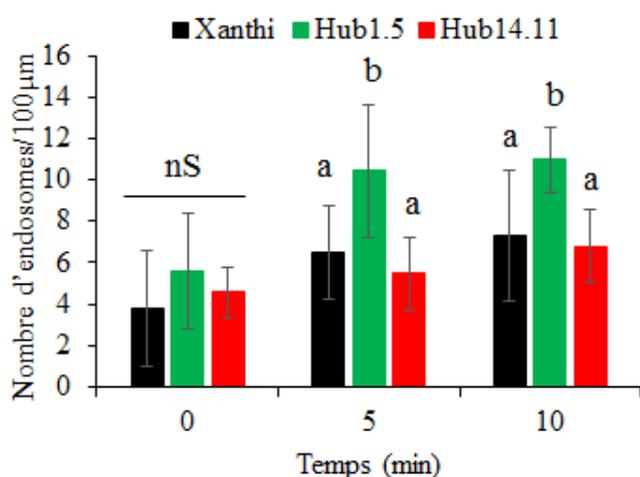


Figure II.6 : Cinétique d'internalisation du FM4-64 dans les 2 lignées Hub comparée à la lignée Xanthi.

Les données correspondent à la moyenne de 5 répétitions biologiques \pm l'erreur-standard. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative entre les lignées cellulaires (Test Mann-Whitney, $p < 0.05$).

5. L'endocytose induite par la cryptogéine est réduite dans les cellules exprimant le domaine Hub

Nous avons dénombré les endosomes fluorescents dans les différentes lignées après l'ajout, ou non, de cryptogéine. Puis nous avons calculé un facteur d'induction égal au rapport du nombre d'endosomes dans les cellules élicitées sur le nombre d'endosomes dans les cellules non élicitées. Le facteur d'induction à 10 min est proche de la valeur 1 pour les lignées Hub témoignant d'une non-stimulation de l'endocytose (Figure II.7). Nous pouvons conclure que les lignées Hub1.5 et Hub14.11 sont perturbées dans l'endocytose induite en réponse à la cryptogéine.

Cette perturbation atteste que l'endocytose induite dans les cellules Xanthi est une composante majeure de type CME. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules de tabac BY-2 exprimant le domaine Hub à un niveau tel que ces cellules ne présentent pas d'altération de l'endocytose constitutive (visualisée par l'expression de la CLC fusionnée à la GFP et par dénombrement des puits mantelés de clathrine à la

membrane plasmique par microscopie électronique à transmission), ni de la croissance cellulaire alors que l'endocytose à clathrine induite par la cryptogéine est altérée (Adam *et al.*, 2012).

L'une des hypothèses expliquant l'altération de l'endocytose induite sans modification de l'endocytose constitutive est que l'expression du domaine Hub perturbe la mise en place rapide de l'endocytose lorsque les cellules sont dans un contexte de demande importante, comme lors d'un stress. Dans des conditions de croissance « normale », les cellules des lignées Hub contiennent une quantité de domaine Hub ne perturbant pas leur croissance (ratio entre les CHC endogènes et le domaine Hub avec peu ou pas d'impact dans la mise en place du manteau de clathrine).

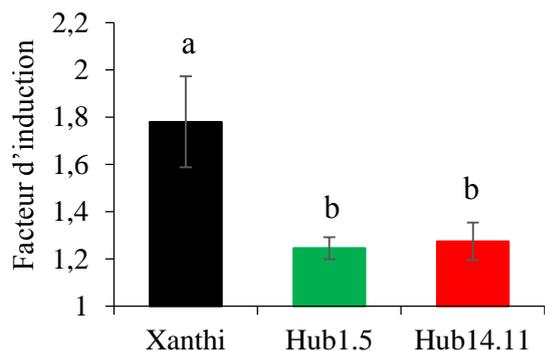


Figure II.7 : Perturbation de l'endocytose induite en réponse à la cryptogéine dans les cellules exprimant le domaine Hub. Ce graphique présente les facteurs d'induction de l'endocytose après 10 min d'élicitation pour la lignée Xanthi et les 2 lignées Hub. Ces valeurs correspondent à la moyenne de rapports calculés pour 5 répétitions biologiques ± erreur standard. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative entre les lignées cellulaires (Test Mann-Whitney, $p < 0.05$).

III. Les événements de signalisation cellulaires déclenchés par la cryptogéine sont-ils perturbés dans les lignées Hub ?

1. Production d' H_2O_2 et flux ioniques dans les lignées Hub

Les cellules Xanthi produisent transitoirement de l' H_2O_2 , en réponse à la cryptogéine, avec un pic maximal de production se situant entre 20 et 30 min (Simon-Plas *et al.*, 1997). La production d' H_2O_2 dans les 2 lignées cellulaires indépendantes Hub1.5 et Hub14.11 en réponse à cet éliciteur montre des réponses similaires, mais avec des amplitudes différentes comparées au témoin Xanthi (Figure II.8). En effet, 441 nmoles d' $H_2O_2 \cdot g^{-1}$ de cellules ont été mesurées pour la lignée Hub1.5 et 145 nmoles d' $H_2O_2 \cdot g^{-1}$ de cellules pour la lignée Hub14.11 contre 278 nmoles d' $H_2O_2 \cdot g^{-1}$ de cellules pour la lignée Xanthi.

Nous pouvons conclure que la stratégie génétique altérant l'endocytose induite par la perception de la cryptogéine ne semble pas altérer le « burst oxydatif ». L'expression du domaine Hub ne permet pas d'expliquer la différence de production modifiée positivement chez les cellules Hub1.5 et négativement chez les cellules Hub14.11 par rapport aux cellules Xanthi. Cela pourrait être expliqué par un état physiologique différent des cellules Hub1.5 comme en témoigne leur endocytose constitutive plus importante décrite plus haut.

Précédemment, aucune différence de production d' H_2O_2 entre cellules BY-2 sauvages et cellules BY2-Hub traitées à la cryptogéine n'a été montrée (thèse T. Adam, 2012). Toutefois, un lien entre les FAO et la CME a été établi à l'aide d'une lignée BY-2 invalidée pour la production d' H_2O_2 où, après élicitation à la

cryptogéine, la formation *de novo* de puits mantelés de clathrine est abolie. Ceci suggère que l' H_2O_2 produit par l'éliciteur agit en amont et est nécessaire pour déclencher la CME (Leborgne-Castel *et al.*, 2008).

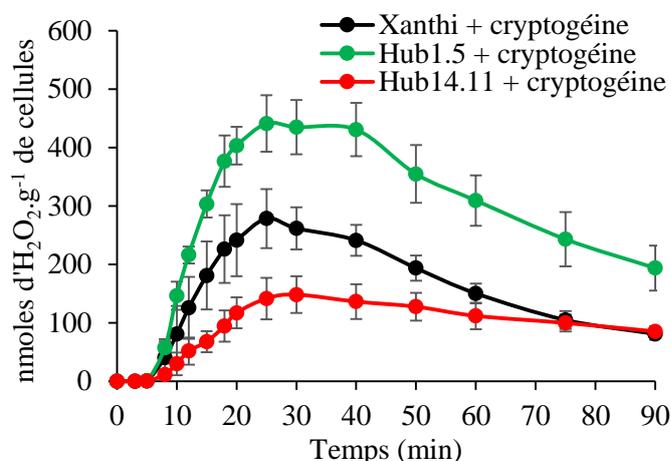


Figure II.8 : Cinétique de production d' H_2O_2 dans des cellules Xanthi WT et Xanthi-Hub élicitées par la cryptogéine. Les cellules non traitées de chaque lignée n'ont pas montré de production d' H_2O_2 au cours du temps (non indiqué sur la Figure). Ces données représentent la moyenne de quatre répétitions biologiques \pm l'erreur standard.

L'augmentation du pH extracellulaire, autre événement de signalisation déclenché par la cryptogéine (Simon-Plas *et al.*, 1997), est également observée après 60 min dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11, comme dans les cellules sauvages (Figure II.9, gauche) mais avec des différences d'amplitude, par rapport au témoin, similaires à celles observées pour les FAO (Figure II.8). Les mesures de la conductivité extracellulaire, reflétant les flux d'ions sortant déclenchés par l'éliciteur (Blein *et al.*, 1991; Wendehenne *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2007), ont montré une augmentation de la concentration en ions extracellulaires pour l'ensemble des trois lignées sans différence d'amplitude de réponse (Figure II.9, droite). Les cellules Hub1.5 et Hub14.11 répondent donc par alcalinisation du milieu extracellulaire et flux globaux d'ions de la même façon que les cellules Xanthi WT en réponse à la cryptogéine montrant que ces événements de signalisation ne sont donc pas affectés par l'expression du domaine Hub.

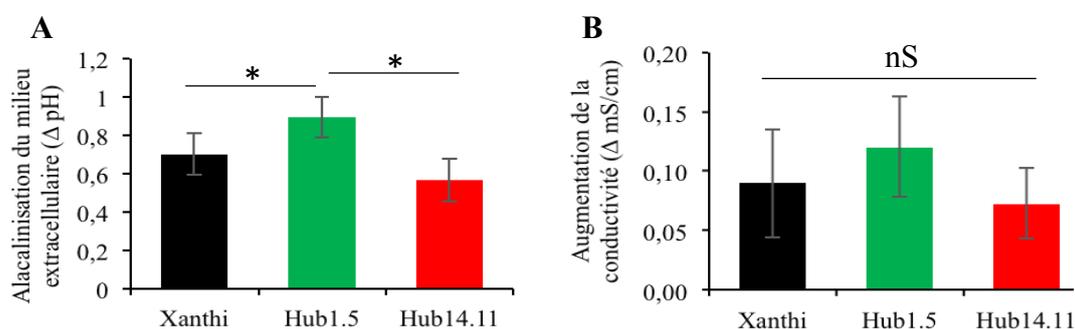


Figure II.9 : Alcalinisation du milieu extracellulaire (A) et augmentation de la conductivité dans le milieu extracellulaire (Δ conductivité, B) dans des cellules Xanthi et Hub élicitées par la cryptogéine durant 60 min. Les données du pH extracellulaire [présenté en variation de pH (Δ pH) entre 0 et 1 h de cryptogéine] et de la conductivité [présenté en variation de conductivité (Δ mS/cm) entre 0 et 1 h de cryptogéine] correspondent à la moyenne de 4 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les cellules non traitées par la cryptogéine de chaque lignée n'ont pas montré de variation de pH ni de conductivité au cours du temps. Les étoiles indiquent une différence statistiquement significative entre les lignées cellulaires (Test Mann-Whitney, $p < 0.05$).

2. L'expression du domaine Hub impacte négativement la mort cellulaire induite par la perception de la cryptogéine

La perception de la cryptogéine induit dans les tissus de plants de tabac des nécroses assimilables à une réponse de type hypersensible (Bonnet *et al.*, 1996). Chez les cellules cultivées en suspension, l'application de cryptogéine induit également la mort au bout de 24 h (Binet *et al.*, 2001). Nous avons cherché à savoir si cette réponse tardive de cellules mises en présence de l'éliciteur était modifiée dans nos lignées Hub. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la Figure II.10. Pour les cellules Xanthi, le taux de mort cellulaire était d'environ 75 % après 24 h de traitement à la cryptogéine et d'environ 20 % sans traitement. Les lignées Hub ont présenté un taux de mort statistiquement inférieure à celui du Xanthi, de l'ordre de 25 % et 50 % pour les cellules Hub1.5 et Hub14.11, respectivement. Nous avons confirmé ce résultat à l'aide d'une troisième lignée Hub, indépendamment obtenue et appelée Hub7.6, qui a présenté une mortalité de 35 % après 24 h d'élicitation (données non montrées).

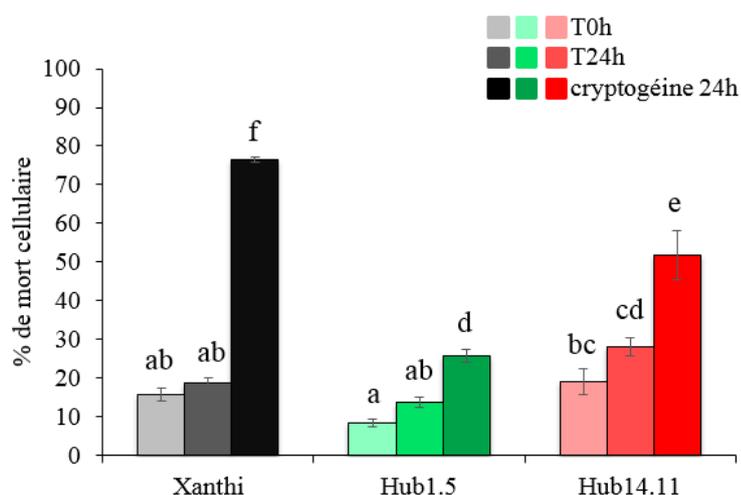


Figure II.10 : Analyse de la mortalité cellulaire induite par la cryptogéine dans les lignées Hub. Le pourcentage de cellules mortes a été déterminé par une double coloration au FDA et IP, dans des lignées Xanthi, Hub1.5 et Hub14.11, traitées par la cryptogéine pendant 24h. Les données correspondent à la moyenne de 4 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. L'analyse statistique a été effectuée par une ANOVA suivie d'un test de TUKEY. Les lettres indiquent les groupes statistiquement différents ($p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent que l'expression du domaine Hub altère le programme conduisant à la mort cellulaire. De façon intéressante, il a été observé que les plantes exprimant le domaine Hub étaient plus sensibles à certains pathogènes (*Phytophthora parasitica*, *Peronospora tabacina* et *Chalara elegans*), ce qui pourrait indiquer une mise en place de la défense plus faible chez ces lignées (Adam, 2012). Nos résultats sont en accord avec ceux de Sharfman et collaborateurs (2011) montrant une diminution de la mort cellulaire induite par l'éliciteur EIX (xylanase) de *Trichoderma viride* chez les cellules Xanthi cultivées en présence d'inhibiteurs d'endocytose et chez cellules exprimant de façon transitoire le domaine Hub. De manière intéressante, le récepteur à la xylanase, LeEIX, est internalisé après fixation à son ligand EIX, ce qui est nécessaire à la mise en place de la HR (Ron and Avni, 2004; Bar and Avni, 2009). Il est tentant de postuler que l'endocytose du récepteur de la cryptogéine, dont l'orthologue ELR a été récemment identifié chez la pomme de terre (Du *et al.*, 2015) et qui est un RLP comme LeEIX, serait affectée dans les cellules Hub impactant la mise en place de la mort. Le récepteur ELR du tabac, quand il sera identifié pourra être un bon candidat à étudier.

3. Activation des MAPK dans les lignées Hub

L'activation des MAPK joue un rôle clé dans la transduction du signal conduisant à l'expression des gènes de défense (Pitzschke *et al.*, 2009) et à la RH. En effet, une activation soutenue des MAPK chez le tabac est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire, comme rapporté par les travaux de Dahan et collaborateurs (2009). La cryptogéine active chez le tabac deux protéines kinases de la famille des MAPK dans le cytosol ; SIPK (Salicylic acid-Induced Protein Kinase) de 48 kDa orthologue de AtMPK6, et WIPK (Wound-Induced Protein Kinase) de 46 kDa orthologue de AtMPK3 (Zhang *et al.*, 1998:19; Lebrun-Garcia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) .

Chez les cellules Xanthi, la cryptogéine induit la phosphorylation des 2 protéines, dès 10 min après l'élicitation (voir chapitre I). Les profils obtenus jusqu'à 180 min après l'élicitation sont globalement semblables dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11 (Figure II.11). Toutefois, l'activation des protéines PK46 et PK48 semble plus précoce dans les lignées Hub et légèrement moins soutenue à 180 min.

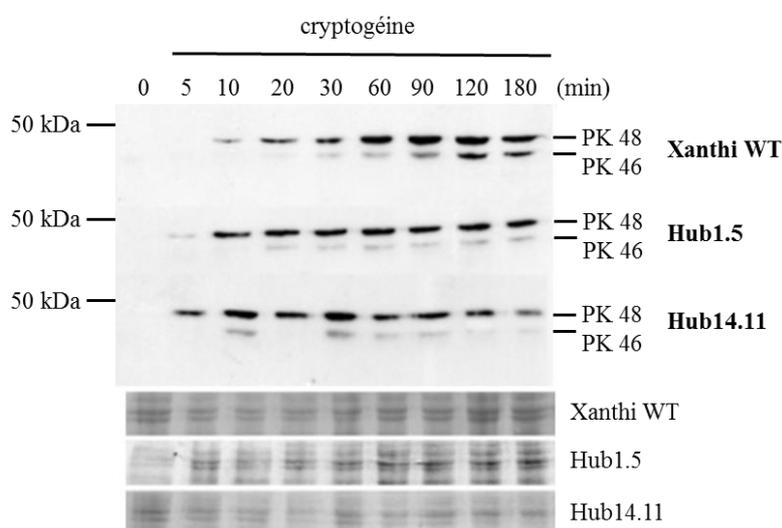


Figure II.11 : Cinétique d'activation de MAPK dans des lignées cellulaires Xanthi WT et Xanthi-hub (Hub1.5 et Hub 14.11) en réponse à la cryptogéine. Les conditions de culture et de traitement sont les mêmes que celles citées précédemment. L'immunodétection des MAPK a été réalisée en utilisant un anticorps anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) reconnaissant les MAPK phosphorylées (actives) présentes dans les extraits cellulaires. Les colorations au rouge Ponceau des dépôts sont présentées en bas de la figure. Ce résultat est représentatif de trois expériences réalisées à partir d'extraits obtenus indépendamment.

Il est difficile de dire si de telles différences sont susceptibles d'engendrer des réponses cellulaires spécifiques. Toutefois, Müller et collaborateurs (2009) ont montré que la protéine MPK6 d'Arabidopsis est, en plus de sa localisation cytosolique, associée à la membrane plasmique et au TGN et co-localise avec la CLC dans ces compartiments (Müller *et al.*, 2009). De même, ces auteurs ont mis en évidence des acteurs du trafic membranaire (SNARE et protéine du complexe exocyste) qui contiennent des sites canoniques de phosphorylation par les MAPK. Ceci nous encourage à penser qu'il existe un lien entre trafic et/ou localisation cellulaire et activité/activation de la MPK6. En effet, le ratio présent dans cytosol/présence dans membranes de la MPK6 *via* son association à la clathrine pourrait être important pour son activation et une perturbation de ce ratio dans les cellules Hub pourrait induire des différences d'activation. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure l'intervention d'un, ou plusieurs acteurs, non identifié(s) dans nos cellules.

4. L'index mitotique n'est pas impacté par l'expression du domaine Hub

Sachant que la mort des cellules exposées à la cryptogéine dépend du stade du cycle cellulaire dans lequel elles se trouvent (Kadota *et al.*, 2005), nous avons analysé l'index mitotique dans les différentes lignées (Figure II.12) durant 7 jours de culture, et au 7^{ème} jour où les cellules ont été diluées au demi durant 24 h (7j + 1, conditions d'analyse de la mortalité). Nos résultats n'indiquent pas de différences notables entre les lignées Hub et la lignée Xanthi.

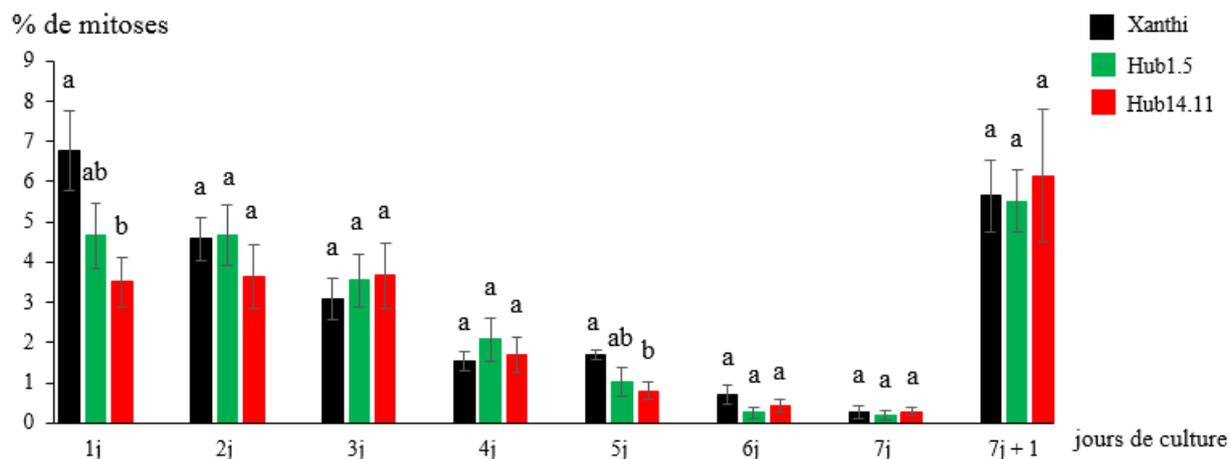


Figure II.12 : Index mitotique des cellules Xanthi et exprimant le domaine Hub. Les cellules ont été repiquées au 1^{er} jour et au 7^{ème} jour elles ont été diluées au demi dans du milieu neuf (7j + 1) dans du milieu neuf. Chaque jour, les cellules ont été fixées dans un mélange éthanol absolu/acide acétique puis colorées au DAPI. Les données correspondent à la moyenne de 5-8 répétitions biologiques d'un dénombrement de 500 à 600 cellules/jour/lignée \pm erreur standard. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative entre les lignées cellulaires à chaque jour de culture (Test Mann-Whitney, $p < 0.05$).

5. Analyse de l'expression de gènes liés à la défense et à l'induction de la mort cellulaire

Nous avons voulu voir si la perturbation de la CME induite par la cryptogéine avait un impact sur l'expression de certains gènes associés aux réponses de défense des plantes et d'autres dont l'activité est corrélée à l'induction de la « mort cellulaire ». Pour certains de ces gènes, leur expression était connue comme étant régulée par l'application de cryptogéine (voir Tableau II.1). Nous avons donc entrepris une analyse comparative de l'expression de ces gènes dans nos 3 lignées cellulaires à 0 et 6 h de traitement à la cryptogéine. De plus, nous avons constaté une variation de l'expression des gènes de références *NtEF1 α* et *NtL25* au cours de la cinétique dans les lignées Hub (données non présentées). Nous avons donc entrepris de tester d'autres gènes de référence. Le gène *NtubC2* proposé par Schmidt and Delaney (2010) comme gène de référence pour le tabac, s'est révélé être le seul dont l'expression était stable dans nos conditions expérimentales, et ce pour les 3 lignées cellulaires utilisées.

Deux répétitions biologiques et deux répétitions techniques par répétition biologique nous ont permis d'obtenir les résultats présentés ci-dessous.

Nom du gène	Gène associé à la
<i>NtPAL</i>	défense
<i>NtLOX</i>	mort cellulaire
<i>NtPR1</i>	défense
<i>NtPR3</i>	défense
<i>NtPR10</i>	défense
<i>NtATG3a</i>	mort cellulaire (autophagie)
<i>NtATG3b</i>	mort cellulaire (autophagie)
<i>NtATG4a</i>	mort cellulaire (autophagie)
<i>NtATG7</i>	mort cellulaire (autophagie)
<i>NPat1</i>	mort cellulaire
<i>NtPat2</i>	mort cellulaire
<i>NtPat3</i>	mort cellulaire
<i>NtVPE family</i>	mort cellulaire
<i>NtHD2a</i>	mort cellulaire
<i>NtHSR203J</i>	défense

Tableau II.1 : Liste des gènes de défense ou associé à la mort en réponse régulés en réponse à la cryptogéine.

5.1 La lignée Hub14.11 surexprime un grand nombre de gènes en réponse à la cryptogéine

Sur les 15 gènes testés, 13 sont bien plus exprimés dans la lignée Hub14.11 et 9 gènes (*NtLox*, *NtPat2*, *NtPat3*, *NtVPE family*, *NtATG3a*, *NtATG3b*, *NtATG4a*, *NtATG7* et *NtPR3*) ont un niveau d'expression relative de 3 à 140 fois supérieur à celui observé dans les autres lignées (résultats non présentés). En exemple de ces résultats, sont présentées les données obtenues pour le gène *NtLOX* (Figure II.13).

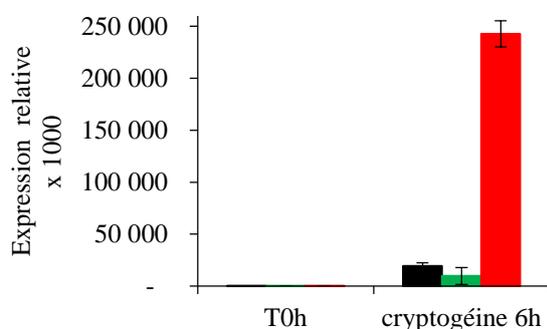


Figure II.13 : Quantification relative des transcrits des gènes *NtLOX* dans les lignées Hub traitées à la cryptogéine. L'abondance des transcrits a été mesurée dans les cellules Xanthi (noir), Hub1.5 (vert) et Hub14.11 (rouge) après 6 h de traitement à la cryptogéine. Le graphe illustre l'abondance des transcrits *NtLOX* relativement à celle des transcrits du gène de référence *NtubC2* (méthode $2^{-\Delta Ct}$). Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques \pm l'erreur standard.

La lipoxygénase (LOX) est une enzyme intervenant dans la peroxydation des lipides, induite par la cryptogéine dans des feuilles de tabac, et responsable du développement de la HR (Rustérucchi *et al.*, 1999). La figure II.13 montre que les transcrits du gène *NtLOX* sont 12 fois plus abondants dans la lignée Hub14.11 par rapport à la lignée sauvage, et 25 fois plus abondants par rapport à ceux de la lignée Hub1.5. Ces résultats proviennent d'expériences préliminaires et doivent être encore répétés avant de pouvoir discuter du réel effet de l'expression du domaine Hub sur l'expression des gènes liés à la défense ou à la mort dans les lignées Hub en réponse à la cryptogéine. Des travaux préliminaires d'analyse de ploïdie de ces cellules ont montré une augmentation du degré de ploïdie pour la lignée Hub14.11, qui pourrait être due à une plus forte expression du domaine Hub dans cette lignée, comme cela a été montré chez les levures (Lemmon *et al.*, 1990). Des travaux sont en cours pour déterminer l'impact réel de l'expression de Hub sur ce degré de ploïdie.

5.2 La régulation négative du gène *NtHD2a/b* en réponse à la cryptogéine est plus exacerbée dans les cellules exprimant le Hub

Les histones désacétylases (HDAC) sont des enzymes qui catalysent les réactions de désacétylation des protéines histones, ayant pour effet une compaction de la chromatine empêchant l'expression de gènes cibles. Deux isoformes d'HDAC de type 2, appelées HD2a et HD2b, ont été identifiées comme étant rapidement phosphorylées dans le noyau en réponse à la cryptogéine, et les niveaux d'expression des transcrits sont fortement réduits après traitement (Bourque *et al.*, 2011). Il a également été montré que l'inactivation de leur expression, par une approche d'interférence à l'ARN, augmente l'intensité de la HR en réponse à la cryptogéine, suggérant que ces enzymes réguleraient négativement le déclenchement de la mort cellulaire (Bourque *et al.*, 2011). Leur rôle exact dans le contrôle de cet événement reste néanmoins encore inconnu. Nous avons quantifié l'expression conjointe des gènes *HD2a/b* dans nos trois lignées par l'utilisation d'un unique couple d'amorces ciblant les deux gènes. Après 6 h de traitement à la cryptogéine, une baisse d'un facteur 2,4 de la quantité des transcrits *HD2a/b* a été observée dans les cellules sauvages (Figure II.14, colonnes noires). Des baisses plus importantes de facteur 6,4 et 10,5, ont été observées respectivement dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11 (Figure II.14, colonnes vertes et rouges).

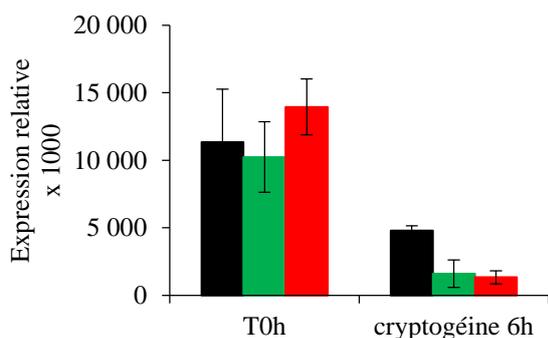


Figure II. 14 : Quantification relative des transcrits des gènes *NtHD2a/b* dans les lignées Hub traitées à la cryptogéine.

Les conditions expérimentales et de mesures des niveaux d'expression des transcrits sont les mêmes qu'en Figure II.11. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques \pm l'erreur standard.

Cette diminution, après traitement à la cryptogéine, de l'expression des *HD2a/b*, dont les protéines ont été décrites comme ayant un rôle de régulateur négatif de la mort cellulaire, est en accord avec la mise en place de la mort cellulaire. Toutefois, comme la mortalité déclenchée par la cryptogéine dans les lignées Hub est moindre par rapport aux cellules sauvages, nous aurions pu nous attendre à une expression de *HD2* plus élevée que chez les cellules sauvages. Ces résultats en transcriptomique, s'ils se confirment lors de répétitions futures, ne semblent ne pas s'accorder à ceux obtenus par Bourque et collaborateurs (2011). Mais il est à noter qu'au niveau protéique, les HDAC sont proposées comme ayant un rôle de « variateurs » pouvant moduler l'intensité de la mort cellulaire. Il serait donc nécessaire d'analyser l'abondance des protéines HD2 qui pourraient être « stabilisées » ou moins dégradées dans les cellules Hub.

Par rapport à l'ensemble des gènes étudiés, c'est uniquement pour ces deux gènes que les différences d'expression entre les 2 lignées Hub et la lignée sauvage sont visibles, de même nature et d'ampleur comparable. Ces différences suggèrent donc que l'expression du Hub pourrait moduler l'induction de la mort cellulaire dans les cellules Xanthi après élicitation par la cryptogéine *via* les HD2 mais les mécanismes sous-jacents restent à déterminer.

IV. Impact de l'expression du domaine Hub sur la réponse des cellules à l'application de la cryptogéine, en termes de flux de sucres et d'expression des gènes associés

En plus des événements déclenchés par la cryptogéine présentés précédemment, Bourque et collaborateurs (2002) ont démontré une inhibition de l'entrée de glucose (chapitre 1) associée à l'inhibition de l'activité mitochondriale, pouvant participer à l'induction de la RH. Nous avons donc analysé les flux de glucose et de saccharose, principaux sucres utilisés par les microorganismes, mais également les flux de fructose, produit de l'hydrolyse du saccharose, en réponse à ce même éliciteur.

1. L'expression du domaine Hub impacte de façon différentielle les flux de sucres dans les cellules Xanthi

Dans le chapitre 1, nos travaux décrivent dans les cellules Xanthi, une régulation différentielle de flux de sucres par la cryptogéine en fonction du type de sucre : une inhibition de l'absorption du glucose et du saccharose mais pas d'effet sur l'absorption de fructose (Tableau II.2). Ces mêmes expériences ont été menées avec les lignées Hub afin de déterminer si la dynamique membranaire liée à la clathrine conditionnait les flux de sucres. En absence de cryptogéine, une différence d'absorption de glucose (Figure II.15 A) et de saccharose (Figure II.15 B) est observée chez les cellules Hub (courbes vertes et rouges, traits pleins) par rapport au Xanthi (courbes noires, traits pleins). Par contre, comme observé chez les cellules Xanthi, l'application de la cryptogéine sur les cellules Hub1.5 et Hub14.11 inhibe fortement l'absorption de glucose (Figure II.15 A) et de saccharose (Figure II.15 B, traits discontinus).

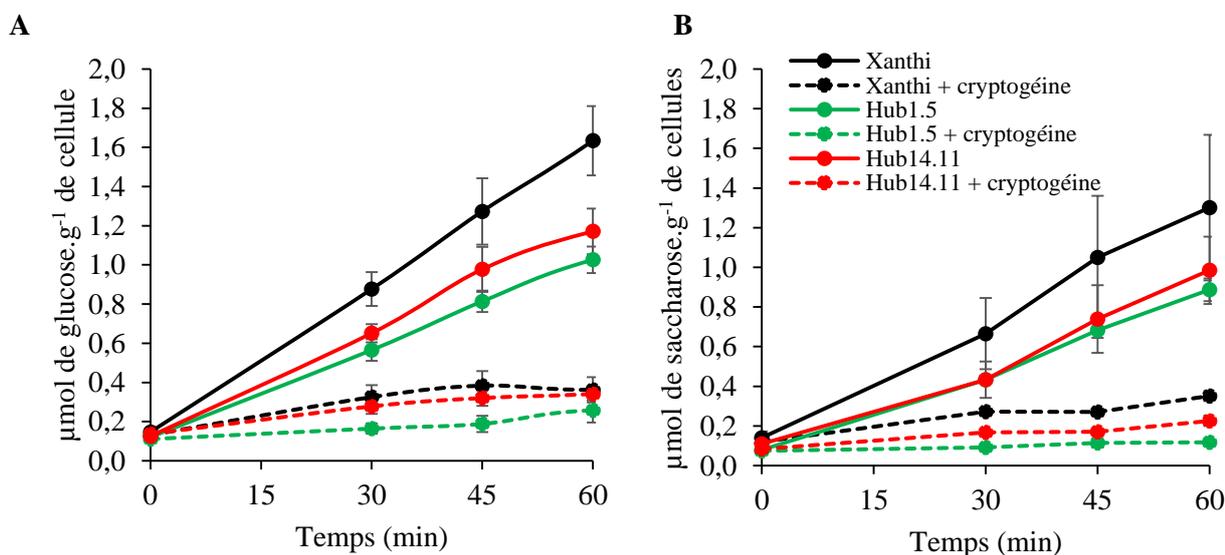


Figure II.15 : Cinétique d'absorption du glucose (A) et du saccharose (B) dans les lignées Hub en présence ou non de cryptogéine. Pour toutes les expériences, et après l'étape d'équilibration de 2h, les cellules ont été pré-incubées avec 2 mM de glucose/saccharose radiomarqué au ^{14}C ($0,055 \text{ MBq.g}^{-1}$ de cellule) durant 5 min avant l'ajout de la cryptogéine. Les contrôles correspondent aux cellules non traitées mais avec la même durée d'absorption en sucres radiomarqués. Ces données représentent les moyennes de 4 répétitions biologiques \pm l'erreur standard.

L'expression du domaine Hub semble impacter négativement l'absorption de sucres, ce qui pourrait être la conséquence d'une composition membranaire en transporteurs modifiée par la perturbation des voies de recyclage/dégradation dépendantes de la clathrine. Parmi les rares exemples de dynamique de transporteurs connus à ce jour, on peut citer le transporteur SUT2 de la tomate qui est internalisé et recyclé lors d'une interaction avec un CMA (Bitterlich *et al.*, 2014), et SUT1 de la pomme de terre qui a été retrouvé dans des microdomaines membranaires qui peuvent être en lien (direct ou indirect) avec l'endocytose (Liesche *et al.*, 2010 ; Krügel *et al.*, 2012). L'application de la cryptogéine sur des cellules Hub1.5 et Hub14.11 résulte en l'inhibition de l'absorption du glucose et du saccharose, tout comme pour les cellules Xanthi. Cette inhibition pourrait être liée à un effet directe de l'éliciteur (mimant une attaque d'un agent pathogène non virulent) sur le transport, dans le but de détourner l'absorption de sucre de l'hôte afin d'en garder un maximum disponible dans l'apoplasme pour sa nutrition (voir la discussion de l'article dans le chapitre 1, Wittek *et al.*, 2017). Ces résultats soulignent que la cryptogéine impacterait les flux de sucres par d'autres événements que ceux liés à l'endocytose à clathrine ; peut être par des mécanismes tels que les phosphorylations de transporteurs de sucres dépendante du Ca^{2+} , comme suggéré par Bourque et collaborateurs (2002).

L'analyse de l'absorption de fructose, a montré des profils de régulation différents par rapport aux deux sucres précédents. En absence de cryptogéine, l'absorption de fructose est peu impactée par l'expression du domaine Hub (Figure II.16, traits pleins). Ce résultat montre que la plus faible absorption de glucose et de saccharose observées chez les cellules Hub, comme décrit précédemment, n'est pas un phénomène s'appliquant à l'ensemble des sucres mais spécifique à certains sucres et/ou leurs transporteurs. Le fructose, provenant de l'hydrolyse du saccharose, est un sucre à priori moins « disputé » pour la nutrition microbienne au cours des IPM (voir la discussion de l'article dans le chapitre 1 ; Sutton *et al.*, 1999; Hall and Williams, 2000; Voegelé *et al.*, 2001; Schübler *et al.*, 2006; Nehls *et al.*, 2010). De plus, aucun transporteur spécifique du fructose n'a été décrit à la membrane plasmique des cellules végétales. Le fructose serait alors toujours transporté par des transporteurs à spectre large (probablement non identifiés à ce jour), ce qui en fait un sucre dont le transport est difficile, voir impossible, à réguler de façon spécifique par la plante.

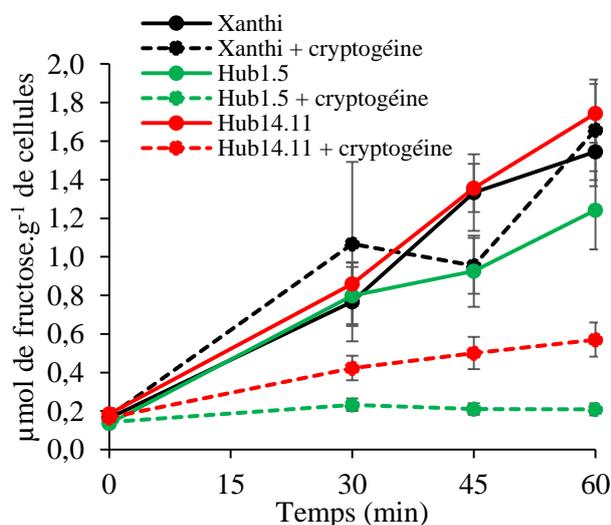


Figure II.16 : Cinétique d'absorption de fructose radiomarqués dans les différentes lignées en réponse à la cryptogéine. Les conditions de cultures, de traitements et le protocole utilisé sont les mêmes que dans la Figure II.15. Ces données représentent les moyennes de quatre répétitions biologiques pour le saccharose et de trois pour le fructose \pm l'erreur standard.

En présence de cryptogéine, l'absorption de fructose est inhibée chez les lignées Hub1.5 et Hub14.11 (Figure II.16, courbes verte et rouge, traits discontinus) alors qu'elle ne l'est pas chez les cellules Xanthi (Figure II.16, trait discontinu noir). C'est la première fois que nous observons une différence de régulation de l'absorption d'un sucre suite au traitement à la cryptogéine, entre les cellules Xanthi et celles exprimant le domaine Hub. L'une des hypothèses que nous pouvons avancer est que l'inhibition de l'absorption du saccharose et du glucose entraîne un « stress sucre » lié à une baisse de l'énergie cellulaire, au sein de la cellule. En effet, les travaux de Bourque et collaborateurs (2002) ont montré que l'inhibition de l'absorption de glucose est accompagnée par une inhibition de la phosphorylation oxydative et donc de la diminution de la production d'ATP. Pour tenter de compenser ce stress, la cellule pourrait déclencher l'adressage ou la remobilisation de « nouveaux » transporteurs véhiculant entre autres le fructose. Ceci permettrait une possible entrée de fructose dans la cellule (comme observé chez les cellules Xanthi). Cependant, si les lignées Hub, de par la perturbation du trafic membranaire lié à la clathrine, sont perturbées dans cet adressage/remobilisation, ce stress ne pourrait être compensé.

N.B. : Les résultats de l'absorption des différents sucres dans les trois lignées sont résumés dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : Résumé des résultats obtenus lors des cinétiques d'absorption de glucose, de saccharose et de fructose radiomarqués dans des cellules Xanthi, Hub1.5 et Hub14.11 en présence ou non de cryptogéine. Les résultats obtenus dans les cellules Xanthi WT figurent dans l'article dans le chapitre 1.

Légende : ↗⁺⁺⁺ : augmentation de l'absorption du sucre ; → 0 : inhibition de l'absorption du sucre ; ↘⁺ diminution de l'absorption de sucre plus faible par rapport aux cellules contrôles.

Traitements	Lignées cellulaires	Type de sucre absorbé		
		GLUCOSE	SACCHAROSE	FRUCTOSE
Contrôle	Xanthi	↗ ⁺⁺⁺	↗ ⁺⁺⁺	↗ ⁺⁺⁺
	Hub1.5/Hub14.11	↗ ⁺ (effet Hub)	↗ ⁺ (effet Hub)	↗ ⁺⁺⁺
Cryptogéine	Xanthi	→ 0	→ 0	↗ ⁺⁺⁺
	Hub1.5/Hub14.11	→ 0	→ 0	→ 0 (effet Hub)

2. Modifications de l'expression des transporteurs de sucres chez les cellules exprimant le domaine Hub en réponse à la cryptogéine

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de gènes codant différents transporteurs de sucres chez les cellules exprimant le domaine Hub en réponse à la cryptogéine. Dans le chapitre 1 nous avons mesuré les niveaux d'expression relatifs de 7 gènes codants les transporteurs de sucres dans les cellules Xanthi en réponse à la cryptogéine (présentés dans l'article Pfister *et al.*, 2017, et partie les informations et résultats complémentaires du chapitre 1). Les expressions relatives de ces gènes (4 *NtSUTs*, 2 *NtSWEETs* et 1 *NtMST*) ont été analysées dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11 suivant les mêmes conditions expérimentales que dans le chapitre 1, à savoir traitées ou non à la cryptogéine sur 3 cinétiques indépendantes de 4 h.

2.1 Expression des gènes *NtSUT*

A l'inverse de ce qui a été observé dans la lignée Xanthi, le niveau d'expression relatif du gène *NtSUT1-1* diminue significativement après 2 et 4 h d'élicitation dans la lignée Hub14.11 par rapport aux lignées Hub1.5 et Xanthi (Figure II.17 A). Une augmentation de l'abondance des transcrits *NtSUT1-2* dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11 est observée après 4 h de traitement à la cryptogéine, tout comme dans la lignée Xanthi (Figure II.17 B). Toutefois, cette augmentation était significativement plus faible pour les lignées exprimant le domaine Hub et significativement différente de la lignée Xanthi. Nous remarquons encore une fois une diminution plus marquée pour le Hub14.11.

En ce qui concerne le gène *NtSUT2*, son niveau d'expression augmente de manière similaire pour les deux lignées Hub à 2 et 4h de traitement, tout comme dans la lignée Xanthi (Figure II.17 C).

A l'inverse, les transcrits *NtSUT4* qui augmentent significativement chez les cellules Xanthi, sont significativement réprimés après 4 h de traitement à la cryptogéine dans les deux lignées Hub (Figure II D).

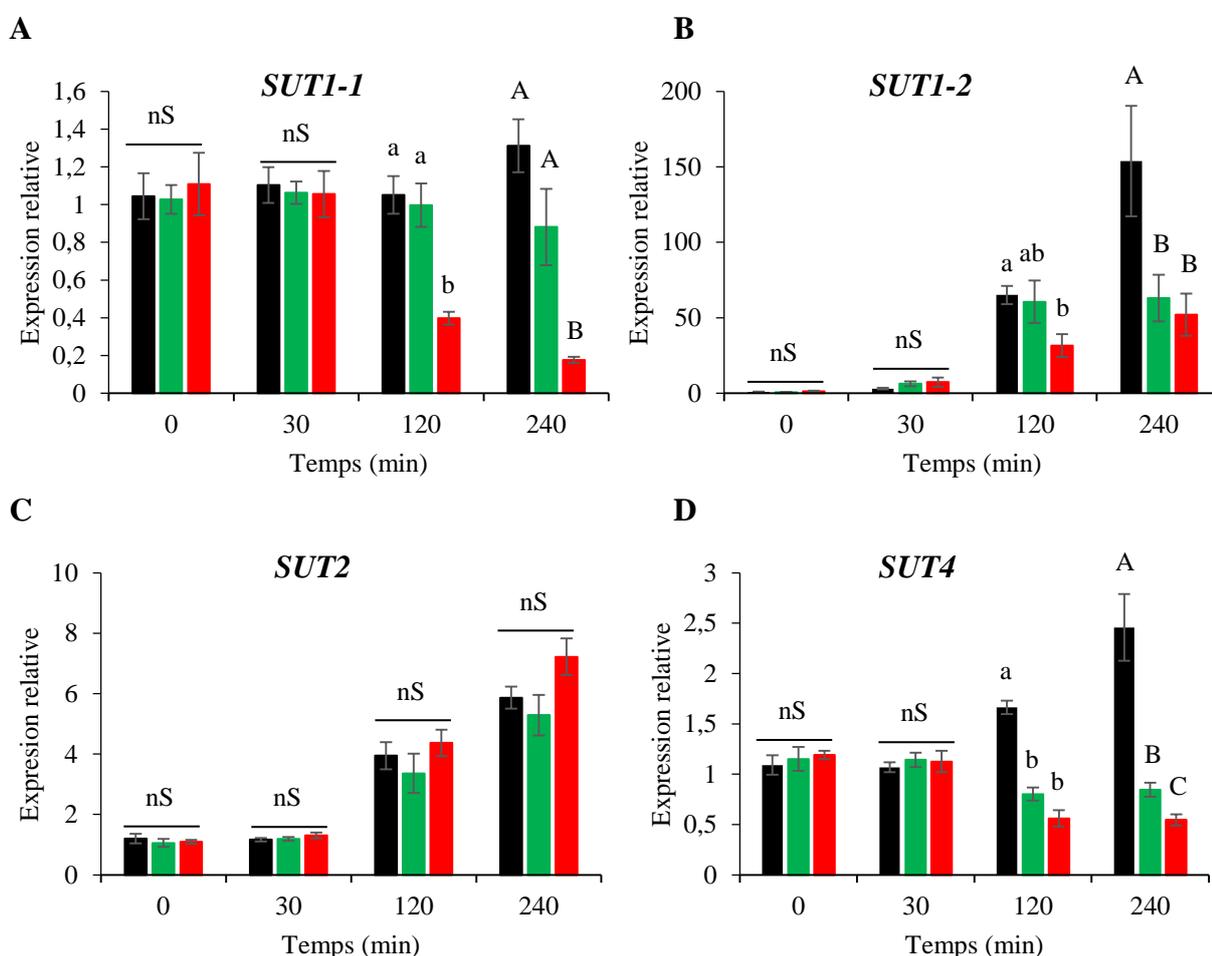


Figure II.17 : Expression relative des transcrits des gènes *NtSUT1-1* (A), *NtSUT1-2* (B), *NtSUT2* (C) et *NtSUT4* (D) dans les différentes lignées traitées à la cryptogéine. Les niveaux d'expression des transcrits ont été mesurés dans les cellules de tabac WT (noir), Hub1.5 (vert) et Hub14.11 (rouge) après différents temps de traitement par la cryptogéine. Le niveau d'expression des transcrits a été normalisé par les gènes de références *NtEF1a* et *NtL25* et rapporté à celui des cellules témoins non traitées à chaque point de mesure (méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Ces données représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), et les lettres représentent des groupes significativement différents au sein des 3 lignées pour chaque temps de la cinétique.

NtSUT1-1 code un transporteur plasmalemmique de la classe SUT1. Certains membres de cette classe sont impliqués *in planta* dans les étapes de chargement du phloème et du transport du saccharose à longue distance (Kühn and Grof, 2010). Comme discuté dans l'article scientifique figurant dans le chapitre 1, suite à l'analyse phylogénétique dans transporteurs SUT nous avons émis l'hypothèse que *NtSUT1-1* serait responsable chez le tabac du chargement et du transport du saccharose dans le phloème. Le gène *NtSUT1-1* serait donc moins sujet à des régulations transcriptionnelles comme rapporté par Doidy et collaborateurs (2012b) chez *M. truncatula* et comme observé chez les cellules Xanthi (voir l'article scientifique chapitre 1, et/ou Figure II.17 A). Par contre la répression de *NtSUT1-1* dans les lignées Hub après 2 h et 4 h de traitement à la cryptogéine, qui est plus forte dans la lignée Hub14.11, laisse supposer que l'expression du domaine Hub impacte de façon différentielle l'expression de ce gène.

NtSUT1-2 code également un transporteur plasmalemmique de la classe SUT1, qui semble être régulé de la même façon au cours du temps suite à l'application de la cryptogéine dans les trois lignées. Cependant l'expression de *NtSUT1-2* est plus faible dans les 2 lignées Hub par rapport à la lignée Xanthi après 2 h et 4 h d'élicitation. Cette régulation différente pourrait être liée à l'expression du domaine Hub dans les 2 lignées, et certainement à l'expression du Hub qui est plus forte dans la lignée Hub14.11 et dont la perturbation de l'expression de *NtSUT1-2* est clairement plus visible après 2 h d'élicitation.

NtSUT4 codant un transporteur localisé au tonoplaste chez les cellules BY-2 (Okubo-Kurihara *et al.*, 2011), la répression de *NtSUT4* dans les lignées Hub pourrait refléter la non compensation (de par la perturbation du trafic membranaire lié à la clathrine dans les lignées Hub) du « stress sucres » engendré par la cryptogéine. Ce qui aurait, dans les lignées Hub, pour effet une inhibition du stockage de réserves de sucres dans les vacuoles (et donc la non-nécessité de SUT4 pour remobiliser des réserves)

2.2 Expression des gènes *NtSWEET*

Le niveau d'expression des gènes *NtSWEET2A* et *NtSWEET2B* diminue de manière significative après 2 h de traitement à la cryptogéine pour la lignée Hub14.11 mais ne change pas dans les lignées Hub1.5 et Xanthi (Figure II A et B). Après 4 h de traitement, une augmentation des transcrits *NtSWEET2A* et *NtSWEET2B* a été mesurée dans les lignées Hub1.5 et Hub14.11, comparable à celle de la lignée Xanthi (Figure II A et B). Les deux gènes *SWEET* semblent être régulés de la même façon au cours du temps et dans les différentes lignées ; seule la lignée Hub14.11 montre une expression différente de ces deux gènes après 2 h d'élicitation. Cette régulation différente à ce point de mesure pourrait être liée à la force de l'expression du domaine Hub dans les différentes lignées Hub. La lignée Hub1.5 se comporte comme la lignée Xanthi pour les 2 gènes *SWEET*, alors que la lignée Hub14.11 engendre une régulation négative significative à 120 min qui revient au niveau des deux autres lignées par la suite.

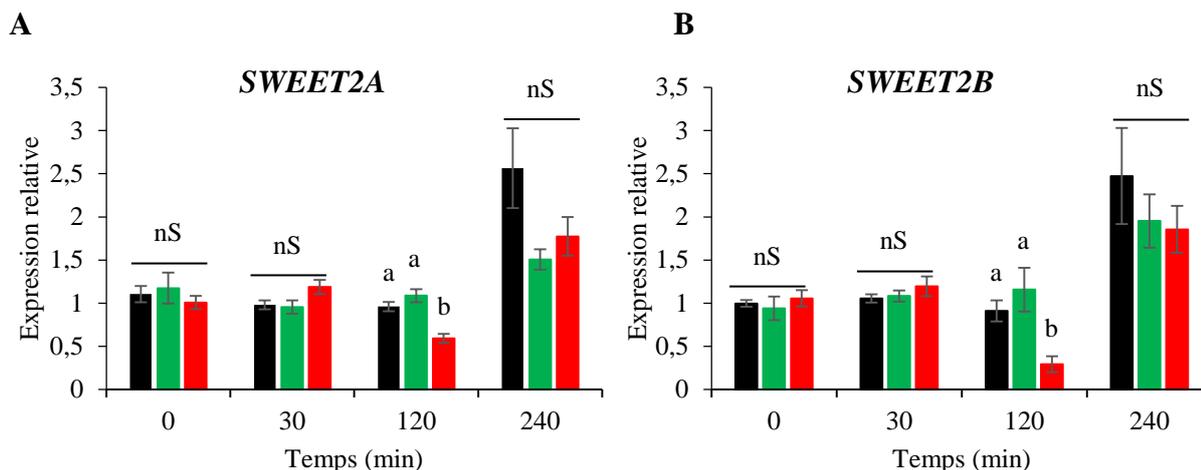


Figure II.18 : Expression relative des transcrits des gènes *NtSWEET2A* (A), *NtSWEET2B* (B) dans les différentes lignées traitées à la cryptogéine. La légende ainsi que les calculs des niveaux d'expression des messagers sont les mêmes que dans Figure II.17. Ces données représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), et les lettres représentent des groupes significativement différents au sein des 3 lignées pour chaque temps de la cinétique.

2.3 Expression de *NtMST1*

Le niveau d'expression relatif du gène *NtMST1* a montré une augmentation similaire pour les lignées Hub1.5 et Xanthi durant les 4 h de traitement à la cryptogéine. A l'inverse, dans la lignée Hub14.11, les transcrits *NtMST1* sont significativement réprimés à partir de 2 h de traitement à la cryptogéine (Figure II.19). Nous pouvons supposer que la différence des niveaux d'expression entre les lignées Hub1.5 et Hub14.11 pourraient résulter d'un différentiel d'expression plus forte du transgène dans une des deux lignées.

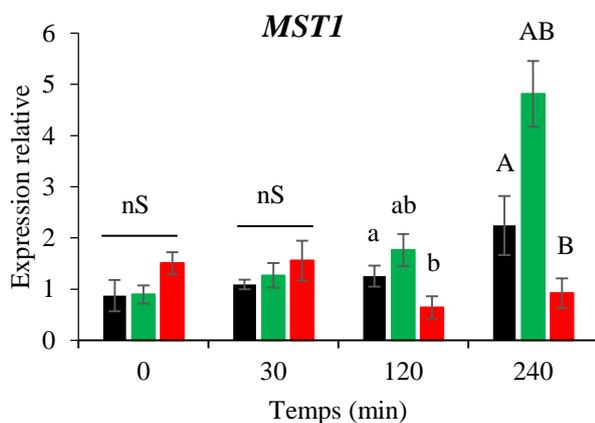


Figure II.19 : Expression relative des transcrits du gène *NtMST1* dans les différentes lignées traitées à la cryptogéine. La légende ainsi que les calculs des niveaux d'expression des messagers sont les mêmes que dans la Figure II.17. Ces données représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques \pm l'erreur standard. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), et les lettres représentent des groupes significativement différents au sein des 3 lignées pour chaque temps de la cinétique.

En conclusion, ces analyses montrent que l'expression du domaine Hub n'a pas d'effet sur les niveaux d'expression des 7 transporteurs analysés durant les 30 premières minutes de traitement à la cryptogéine. Par contre, nous avons pu observer des différences d'expression significatives entre 2 et 4 h après traitement, en fonction des transcrits analysés. De plus, nous avons observé des niveaux d'expression variables entre les deux lignées Hub1.5 et Hub14.11 pour certains gènes : *NtSUT1-1*, *NtSUT1-2*, *NtSUT4*, les 2 *NtSWEETs* et *NtMST1*. Ces différences d'expression entre les 2 lignées exprimant le domaine Hub pourraient provenir (i) d'une expression plus forte du transgène dans une des 2 lignées (la lignée Hub14.11), (ii) d'un effet du ou des site(s) d'insertion(s) du transgène et/ou (iii) comme mentionné dans la partie III.5.1 (« La lignée

Hub14.11 surexprime un grand nombre de gènes en réponse à la cryptogéine ») une modification du degré de ploïdie dans la/les lignées Hub. L'analyse de la troisième lignée Hub7.6 qui comme les autres lignées Hub présente une mort cellulaire moins forte après traitement par la cryptogéine pourrait être intéressante.

V. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons étudié si un élément de la dynamique membranaire liée à la clathrine (le domaine Hub de la CHC) pouvait influencer les réponses cellulaires déclenchées par la cryptogéine, et si cet élément pouvait également avoir un rôle régulateur dans le transport de sucres.

Dans un premier temps, la caractérisation des deux lignées cellulaires Hub1.5 et Hub14.11 exprimant uniquement la partie 3' du gène de la CHC (codant le domaine Hub) a montré qu'elles étaient bien perturbées dans la CME induite par la cryptogéine. Par la suite, nous avons étudié différents événements de signalisation cellulaire engendrés par la cryptogéine dans ces lignées. Ces résultats indiquent que la production d' H_2O_2 ainsi que l'alcalinisation du pH extracellulaire et l'augmentation de la conductivité en réponse à la cryptogéine ne sont pas modifiées dans ces lignées. Ces résultats indiquent que la perturbation de l'endocytose à clathrine ne modifie pas l'activité de la NADPH oxydase ni l'inhibition de la pompe à protons. Par contre, l'analyse de la mort cellulaire après 24 h de traitement à la cryptogéine montre que les lignées Hub sont moins affectées que les cellules Xanthi. Si nous considérons que la mort est un marqueur de défense, cela indique que les cellules Hub1.5 et Hub14.11 sont altérées dans la mise en place des défenses. Afin de trouver des pistes pouvant expliquer ce taux de mort cellulaire plus faible dans ces 2 lignées nous avons étudié d'autres événements cellulaires plus ou moins directement liés à la mort cellulaire et/ou à la défense. A ce stade, nous avons observé que l'étude de l'expression de gènes liés à la mort cellulaire et à la défense dans les trois lignées a montré des résultats intéressants pour un gène en particulier (*HD2a/b*), soulignant l'implication éventuelle de la CME dans la régulation de l'expression de ce gène. Par contre ces analyses d'expression étant préliminaires, des répétitions biologiques sont nécessaires avant de pouvoir expliquer l'altération de la mort/défense dans les lignées Hub.

Dans un deuxième temps, en considérant le rôle crucial des sucres dans le fonctionnement et le devenir des IPM, nous avons vérifié si l'expression du domaine Hub pouvait avoir un rôle régulateur des flux de sucres via la régulation de l'adressage et/ou du recyclage de transporteurs de sucres aux membranes. L'absorption de glucose, de saccharose et de fructose a été testée dans les 2 lignées Hub comparée aux cellules Xanthi. Dans les conditions non élicitées, la diminution de l'absorption de glucose et de saccharose chez les lignées Hub suggère que l'endocytose et/ou le recyclage est nécessaire à la fonction des transporteurs de glucose et de saccharose présents sur la membrane plasmique. L'application de la cryptogéine sur les cellules Xanthi ainsi que les lignées Hub diminue rapidement et abolit l'absorption de glucose et de saccharose. Un autre

scénario a été observé concernant l'absorption de fructose. En condition non élicitée, les courbes d'absorption de fructose sont similaires entre les cellules Xanthi et Hub indiquant que la perturbation d'absorption des autres sucres (glucose et fructose) n'est pas due à une simple perturbation globale de la composition des membranes chez ces cellules. On peut suggérer que les transporteurs permettant l'absorption de fructose soient moins soumis à une régulation par des processus liés à la clathrine. L'application de la cryptogéine empêche l'absorption du fructose uniquement dans les cellules Hub. Nous émettons l'hypothèse que cette régulation différentielle par rapport aux cellules Xanthi serait liée à perturbation du trafic membranaire lié à la clathrine dans les cellules Hub, impactant le recyclage et/ou l'adressage de transporteurs (qui sont présents dans les lignées Hub) afin de compenser le stress induit par la cryptogéine. En parallèle les analyses de l'expression des gènes codant les transporteurs de sucres dans les lignées Hub, ont montré pour la plupart des gènes des différences d'expression après traitement à la cryptogéine comparé à la lignée Xanthi, ainsi que des niveaux d'expression variables entre les deux lignées Hub1.5 et Hub14.11, soulignant une différence d'expression du transgène dans une des deux lignées, ou une modification du degré de ploïdie et/ou a un effet provenant du ou des site(s) d'insertion(s) du transgène dans la/les lignées Hub.

Même si des expériences plus approfondies doivent être réalisées afin de déchiffrer les mécanismes sous-jacents à une régulation différentielle de la mort cellulaire/défenses, ainsi que la modification des flux/transporteurs de sucres observées, les lignées Hub représentent donc un outil nous permettant d'étudier l'effet de la dynamique membranaire sur les réponses cellulaire et la régulation du transport engendrés par la cryptogéine.

CHAPITRE III

**Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres
chez *A. thaliana***

I. Avant-propos

Des années de recherches en biologie ont produit une grande quantité d'information sur la fonction et les propriétés des protéines, qui sont enregistrées dans des bases de données protéiques telles que UniProt (The UniProt Consortium, 2010). Cependant, les protéines agissent rarement seules. Souvent une protéine constitue un des éléments de systèmes plus complexes, composés d'autres protéines et/ou de biomolécules ; elles établissent des connexions dynamiques qui ont un effet sur leurs fonctions biologiques. Un outil qui a permis de montrer la complexité des relations moléculaires, se produisant au sein d'une cellule ou d'un organisme entier, est la cartographie des interactions physiques entre protéines. La carte de ces interactions protéiques est appelé « interactome » (Cusick *et al.*, 2005). Un interactome est souvent représenté par un réseau complexe, dans lequel les nœuds correspondent à des protéines, et où un arc entre deux nœuds/protéines indique l'existence d'une interaction entre les deux protéines correspondantes. Par contre, cette représentation ne tient pas compte de la localisation et de la dynamique des interactions protéine-protéine (IPP) dans la cellule. Les IPP correspondent à des contacts physiques entre les protéines qui ont lieu dans une cellule ou dans un organisme vivant à un moment donné et qui dépendent fortement du contexte biologique. Ainsi, les IPP dépendent du type cellulaire, du stade de développement, de la phase du cycle cellulaire, des modifications post-traductionnelles des protéines ou de la présence d'autres partenaires ainsi que des conditions environnementales (De Las Rivas and Fontanillo, 2010).

Les IPP sont fondamentales pour tous les processus cellulaires, allant de la formation de structures cellulaires, de complexes enzymatiques et de transports, à la régulation des voies de signalisation. Par conséquent, un objectif important de la recherche post-génomique est la compréhension de la fonction des protéines et celle des complexes macromoléculaires. L'apparition de différentes techniques pour mesurer les connexions physiques entre les protéines, aussi bien par des prédictions d'interactions par des méthodes *in silico* et/ou par des méthodes expérimentales, à petite ou grande échelle et à haut débit, a été essentielle pour développer, approfondir et augmenter les connaissances des IPP. De plus, ces techniques doivent permettre, l'analyse de milliers d'interactions possibles et, de confirmer celles qui sont réelles. Un large nombre de données générées à partir de ces essais expérimentaux à petite échelle a été publié et associé aux études à haut débit. L'importance de l'ensemble de ces études est illustré par la création d'un recueil des bases de données publiques des IPP (<http://www.pathguide.org/>; De Las Rivas and Fontanillo, 2010).

Bien que le développement de ces techniques, utilisant par exemple le système classique de double hybride chez les animaux et la levure, a permis de fournir une vue au moins partielle de l'interactome de ces organismes (Rual *et al.*, 2005; Geisler-Lee *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008; Simonis *et al.*, 2009), les connaissances sont plus limitées quand il s'agit de l'interactome des protéines membranaires, principalement à cause des défis techniques dus à l'hydrophobicité partielle de ces protéines. Les membranes cellulaires contiennent des milliers de protéines dont les fonctions n'ont pas été identifiées expérimentalement à ce jour et sont donc classées comme « inconnues ».

Les protéines membranaires jouent un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques. En effet, elles contrôlent la perméabilité cellulaire, interviennent dans l'absorption et la libération d'ions et des métabolites. De plus, certaines protéines à travers les membranes subcellulaires sont impliquées dans la fusion de vésicules ou sont responsables de la détection des stimuli de l'environnement. La régulation de l'activité de transport et la transduction des signaux de l'environnement impliquent donc des interactions de protéines membranaires entre elles et/ou avec des protéines solubles (Lalonde, 2010). Afin de mieux comprendre l'interactome membranaire, le système split-ubiquitine en levure nommée mbSUS (mating-based split ubiquitin system, Figure III.1) a été spécifiquement développé en s'adressant aux protéines transmembranaires, protéines membranaires périphériques ou encore protéines attachées à la membrane (Obrdlik *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005; Lalonde, 2010). Contrairement au système double hybride, le principal avantage du système mbSUS repose sur sa capacité à détecter les interactions protéiques qui se produisent en dehors du noyau, en particulier au niveau des membranes, entre protéines membranaires et/ou entre protéines membranaires et protéines de signalisation. Le système mbSUS a permis l'identification d'interactions entre protéines intégrées à la membrane et qui forment des complexes homo- et hétéro-oligomériques, tels que des transporteurs de saccharose et d'ammonium, des canaux potassiques et des aquaporines (Schulze *et al.*, 2003; Obrdlik *et al.*, 2004; Lalonde, 2010). Le mbSUS a également contribué à identifier chez la levure les régulateurs des transporteurs d'ammonium et d'acides aminés (Van Zeebroeck *et al.*, 2011) et des interactions entre protéines végétales et effecteurs protéiques de pathogènes (Lewis *et al.*, 2012).

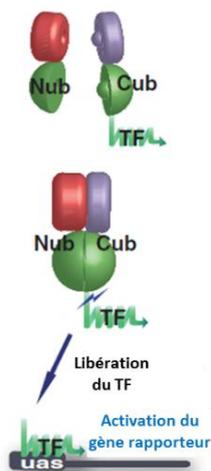


Figure III.1 : Le système mbSUS. Lorsque la protéine « X » (rouge) et la protéine « Y » (violette) interagissent, une protéine ubiquitine « fonctionnelle » est reconstituée à partir des deux domaines Nub et Cub (vert). Le domaine Cub est fusionné un à facteur de transcription (TF, zigzag vert). La protéine ubiquitine « fonctionnelle » est reconnue par des protéases spécifiques de l'ubiquitine endogène, conduisant à la libération du TF. Le TF contenant un signal de localisation nucléaire entre dans le noyau et se lie à l'opérateur (uas, Upstream Activating Sequence) permettant l'activation de la transcription de plusieurs gènes rapporteurs dont l'expression indique une interaction physique entre les protéines d'intérêts. Adapté de Jones *et al.*, 2014.

Ce système mbSUS a permis la production de la base de données « Membrane-based Interactions Network Database » (MIND, <http://biodb.lumc.edu/mind/search.php>) qui contient à ce jour 12102 interactions protéine-protéine de haute confiance entre protéines membranaires, et entre protéines membranaires et protéines solubles chez *A. thaliana* (Jones *et al.*, 2014). MIND est ainsi une ressource puissante pour étudier des IPP se produisant au niveau des membranes cellulaires.

Comme introduit précédemment dans l'état de l'art (partie « La dynamique membranaire pour réguler les flux de sucres à l'échelle de la cellule ») nous avons pu voir que les transporteurs de sucres sont susceptibles de former des homo-oligomères et/ou des hétéro-oligomères, et peuvent également interagir avec d'autres protéines (Krügel and Kühn, 2013; Xuan *et al.*, 2013; Kühn, 2016), indiquant que ces structures oligomériques peuvent avoir une signification fonctionnelle dans la régulation de l'activité des transporteurs de sucres.

Les échanges de sucres sont déterminants pour le type et le devenir de l'interaction entre la plante et les microorganismes du sol. Les transporteurs de sucres sont les acteurs essentiels de l'allocation des sucres *in planta* et/ou dans les échanges entre plantes et microorganismes. Il semble donc être fondamental de comprendre les régulations des transporteurs de sucres à l'échelle de la protéine *via* des IPP, dans le but d'apporter des connaissances dans les mécanismes impliqués dans ces échanges de nutriments qui gouvernent l'orientation au long du continuum mutualisme-pathogénèse. Pour aborder la régulation putative des transporteurs de sucres, nous avons effectué des recherches *in silico* dans la base MIND afin d'identifier des protéines régulatrices des transporteurs de sucres, chez la plante modèle *A. thaliana*.

Ces travaux seront prochainement formatés pour un article qui sera soumis dans un journal à comité de lecture.

I. Recherches *in silico* des protéines interagissant avec les transporteurs de sucres à l'aide de la base de données MIND

Nous avons soumis les séquences protéiques des différents transporteurs de sucres d'*A. thaliana* (9 *AtSUT*, 17 *AtSWEET* et 53 *AtMST*) à la base de données MIND et nous avons classé chaque transporteur en fonction du nombre d'interactants spécifiques potentiels (force d'interaction) qu'il possède en force 4+, 3+ et 2+. Les différentes forces d'interactions correspondent à l'interaction testée positivement pour les trois gènes rapporteurs (*HIS3*, *ADE2* et *LACZ*). A titre d'exemple, la force d'interaction 4+ correspond à une activation des trois gènes rapporteurs et ceci lors des deux répétitions biologiques indépendantes. La force 1+ également disponible sur la base de données, correspondant à l'activation d'un seul gène rapporteur sur les trois testés, n'a pas été intégrée dans nos analyses car elle peut engendrer de nombreux faux positifs.

Les transporteurs de sucres de chaque famille ayant ou non des interactants sur la base MIND ont été listés en Annexe 2 (Tableau A2.1). De plus, un histogramme représente, pour chaque famille, le pourcentage de transporteurs qui possèdent ou non des interactants (Figure III.2). Cette recherche *in silico* réalisée sur un total de 79 transporteurs de sucres, a montré que 34 d'entre eux présentaient au moins une interaction.

Concernant la famille SUT, appelée également SUC (sucrose carriers) chez *Arabidopsis*, 4 de ces membres (45 %) possède des interactants (avec les forces 4+, 3+ et 2+, Figure III.2). Ces 45 % correspondent aux transporteurs suivants : *AtSUC1*, *AtSUC2*, et *AtSUC9* (classe SUT1 ou type I selon Peng *et al.*, 2014) et le transporteur *AtSUC4* (classe SUT4 ou type III selon Peng *et al.*, 2014). Au vu de ces analyses, un peu moins de la moitié des SUT ont été détectés en tant que monomère, dans les conditions expérimentales de Jones et

collaborateurs (2014). Néanmoins ceci n'implique pas qu'ils fonctionnent en tant que monomère car ils peuvent être non fonctionnels dans ces conditions expérimentales. Différents auteurs ont d'ailleurs montré que SUT1 était fonctionnel à l'état de dimère (Reinders *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003; Krügel *et al.*, 2008; Liesche *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats *in silico* est à considérer avec précaution. En effet, au vu de la taille du crible (12 102 interactions), il est probable que certaines interactions n'ont pas été détectées. Nous n'avons par exemple pas retrouvé dans la base MIND les interactions sous forme d'homo- et d'hétérodimères entre SUT1 (SUC2), SUT2 (SUC3) et SUT4 (SUC4) précédemment démontrées dans des études ciblées utilisant le système split-ubiquitine (Reinders *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003).

Concernant la famille SWEET, nous avons observé que plus de la moitié des membres de cette famille (59 % ou 10 membres) possèdent des interactants (Figure III.2). De façon plus détaillée, les transporteurs AtSWEET1, 2, 3 (classe I) AtSWEET 5, 7 (classe II), AtSWEET9, 11, 12, 15 (classe III) et AtSWEET16 (classe IV) possèdent des interactants. Comme précédemment, ces résultats sont à considérer avec précautions, car l'oligomérisation de différents AtSWEET, décrites en split-ubiquitine en levure, ainsi qu'en split GFP *in planta*, par Xuan et collaborateurs (2013) n'a pas été retrouvée ici.

Enfin, la famille MST, qui est la plus grande famille de transporteurs de sucres composée de 53 membres, a montré que seuls 20 membres (ou 38 % des membres) de la famille semblent interagir avec d'autres protéines (Figure III.2). Les transporteurs qui possèdent des interactants sont au nombre de : 4 de la sous-famille STP (AtSTP1, 4, 6 et 11), un de la sous-famille VGT (AtVGT2), 2 de la sous-famille INT (AtINT1 et 4), un de la sous-famille TMT (AtTMT1), 9 de la sous-famille ERD6-like (AtESL1 et 3, AtSFP1, At1g54730, At1g75220, At3g05150, At3g05400, At4g04750, At3g05160) et 3 de la sous-famille pGlcT/SGB1 (AtGLT1, AtSGB1, et At1g67300). A notre connaissance, aucune étude sur l'oligomérisation des MST n'a été publiée à ce jour.

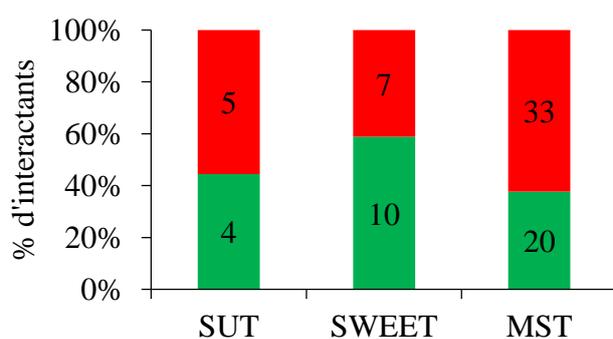


Figure III.2 : Histogramme du nombre de transporteurs de sucres de chaque famille ayant des interactants retrouvés sur la base de données MIND, représenté en pourcentage d'interactants (et en nombre). Le code couleur indique la présence (vert) ou l'absence (rouge) d'interactants.

Pour la suite de notre étude, nous avons décidé de nous focaliser sur les 34 transporteurs ayant montré au moins un interactant dans la base de données MIND.

II. Étude de la régulation de l'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres possédant un ou plusieurs interactants selon la base de données MIND

Le Tableau A2.2 en Annexe 2 présente le nombre d'interactants avec leurs forces d'interactions respectives (4+, 3+ et 2+) pour chacun des transporteurs de sucres retenus. Un total de 920 interactions a été retrouvé. Il est à noter qu'un grand nombre d'interactants peut être obtenu pour un seul et même transporteur de sucres. Ainsi, le transporteur AtSUC2 (/SUT1) possède le plus grand nombre d'interactants de la famille SUT avec un total de 31. Dans la famille SWEET, le transporteur AtSWEET5 possède 112 interactants, et pour la famille MST, 56 interactants ont été retrouvés pour le transporteur At1g54730 de la sous-famille ERD6-like. Nous pouvons ici émettre l'hypothèse qu'un transporteur de sucres possédant un nombre important d'interactants, joue un rôle central dans l'activité de ces interactants et/ou inversement, ce qui pourrait être lié ou non à une forte régulation de ces transporteurs ou de ces interactants d'un point de vue transcriptomique. Afin d'étudier une possible corrélation entre le nombre d'interactants, et le niveau de régulation pour un même transporteur de sucres, nous avons analysé les niveaux d'expression des 34 gènes de transporteurs dans différentes conditions : « organe » et « stade de développement de la plante » (Figure III.3), réponse à des stress abiotiques (Figure III.4) et biotiques (Figure III.5) à l'aide de la base de données AtGenExpress Visualization Tool (Schmid *et al.*, 2005, <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=development&normalization=absolute&action=Run&probesetcsv=At5g55720>).

Les Figures III.3 à III.5 représentent le nombre d'interactants de force 4+ des 34 transporteurs de sucres (histogramme de gauche) avec le profil d'expression de chaque gène selon les différentes conditions de traitements, et ceci pour les 3 cartes d'expression. Nous avons observé que les transporteurs qui présentent le plus grand nombre d'interactants de force 4+ sont : AtSFP1, un transporteur d'hexose avec 29 interactants ; AtSWEET5 avec 27 interactants ; At4g04750 un transporteur d'hexose de la sous famille ERD6-like avec 26 interactants ; AtSWEET7 avec 25 interactants (III.3 à III.5). Pour analyser/discuter de la pertinence des profils d'expression de chaque gène, nous nous sommes fixés un seuil limite d'une valeur d'expression modifiée d'un facteur supérieur ou égal (\geq) à 2. Le pourcentage de conditions dans lequel chaque gène est surexprimé avec une telle valeur d'expression, est indiqué au centre de la figure à gauche de chaque carte d'expression.

1. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de « l'organe » et « stade de développement » de la plante

A partir de la carte d'expression présentant les niveaux d'expression des 34 gènes codant les transporteurs de sucres en fonction des organes et du stade de développement de la plante (Figure III.3), nous avons noté que les différents gènes codants les transporteurs de sucres ne sont pas régulés de la même façon dans les différents organes et tissus de la plante, et ne sont pas présents dans les mêmes tissus de la plante. Nous avons

observé des expressions spécifiques de certains gènes en fonction des organes et du stade de développement de la plante.

Les membres de la famille SUT semblent être peu régulés puisqu'ils présentent des modifications de l'expression d'un facteur ≥ 2 pour seulement 1,27 et 10,13 % des conditions « organe » et « stade de développement » testées. Toutes les plantes possèdent une petite famille de transporteurs SUT impliqués dans plusieurs étapes cruciales pour le transport à longue distance du saccharose des organes sources vers les organes puits, où les sucres sont utilisés ou stockés. Ces transporteurs étant essentiels à la physiologie de la plante, il est logique qu'ils soient peu/finement régulés d'un point de vue transcriptomique (Doidy *et al.*, 2012b). Par exemple dans notre analyse, le gène *AtSUC2* est ainsi très faiblement exprimé de façon générale et est principalement présent dans les feuilles (Figure III3). Cette localisation est cohérente avec l'expression d'*AtSUC2* dans les cellules du complexe collecteur du phloème des feuilles matures, et son rôle essentiel dans les étapes de chargement du phloème (Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996).

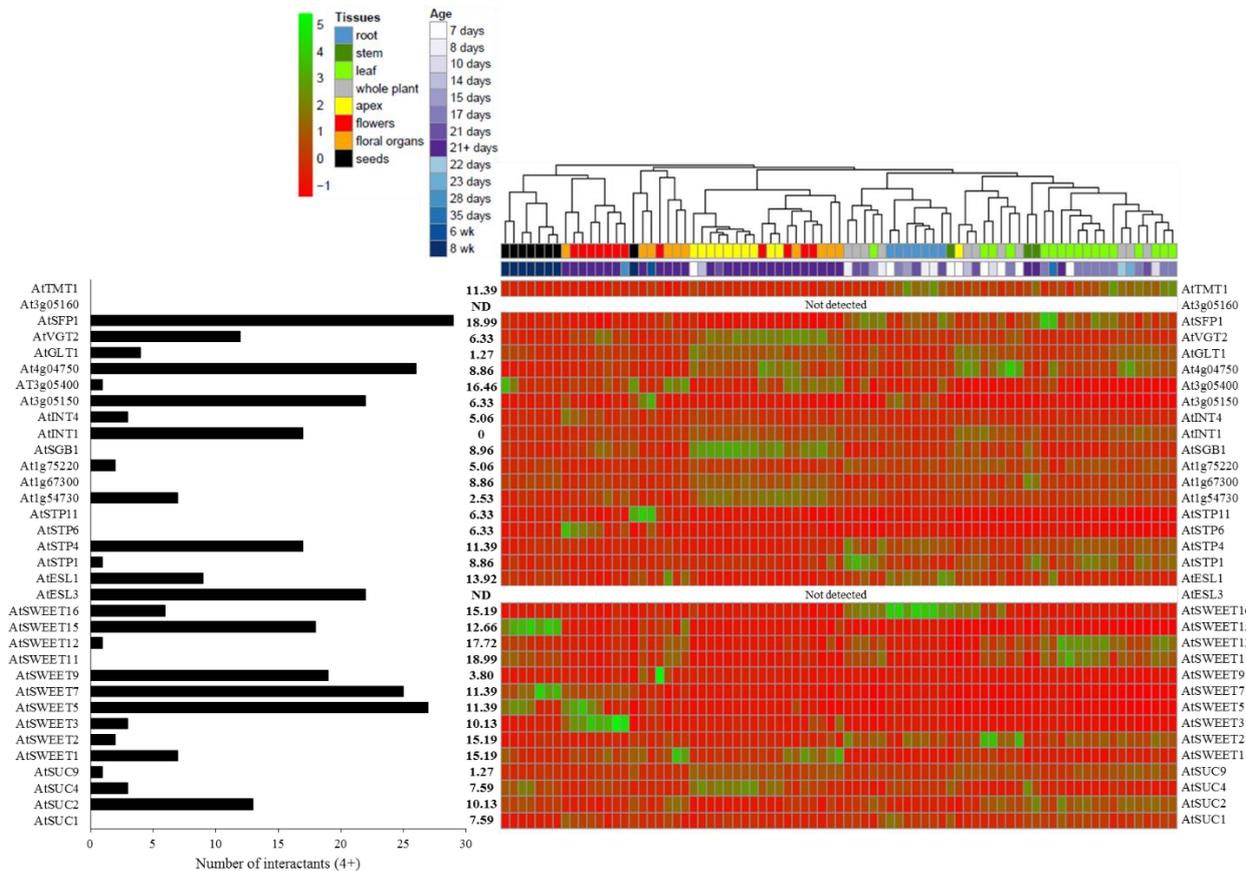


Figure III.3 : Carte d'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres avec le nombre d'interactants par transporteurs de sucres retrouvés avec la plus grande force d'interactions (force 4+), en fonction des « organes » et des « stades de développement » de la plante. Le nombre d'interactants avec la force 4+ pour chaque transporteur de sucres est représenté sur l'histogramme de gauche. Les profils d'expression des 34 gènes ont été importés à partir de la base de données AtGenExpress Visualization Tool, où nous avons analysé les niveaux d'expression dans : les racines (bleu), les tiges (vert foncé), les feuilles (vert clair), l'apex de la plante (jaune), les fleurs (rouge), les organes floraux (orange), les graines (noir) et dans la plante entière (gris) en fonction de différents jours/semaines de développement. Les pourcentages de conditions « organes » et « stades de développement » pour lesquels un gène donné voit son expression régulée d'un facteur 2 ont été calculées et ajoutés au centre de la figure à gauche de la carte d'expression. Une légende détaillée des différentes conditions de traitements est représentée dans le Tableau A2.3 en Annexe 2.

Les membres de la famille SWEET semblent être un peu plus régulés que les SUT, et possèdent des pourcentages de valeurs d'expression ≥ 2 , situés entre 3,8 et 18,99 %. Ces transporteurs présentent une famille plus conséquente par rapport à celle de la famille SUT. Les SWEET sont des transporteurs bidirectionnels de type uniport permettant l'efflux ou l'influx de sucres (saccharose, glucose et fructose). Ils sont impliqués dans différents processus physiologiques de la plante (Feng and Frommer, 2015) et ont un rôle dans les IPM, plus précisément dans la nutrition des microorganismes pathogènes et bénéfiques interagissant avec les plantes (Chen *et al.*, 2010). Ces transporteurs sont certainement soumis à une plus grande régulation transcriptomique.

Nous avons également observé des gènes *SWEET* exprimés de façon spécifique en fonction des organes et du stade de développement de la plante. Sur la carte d'expression sur la Figure III.3 nous avons ainsi vu que le gène *AtSWEET3* (transporteur biologiquement non caractérisé à ce jour) est exprimé uniquement dans les organes floraux. Les gènes *AtSWEET5*, dont la seule localisation publiée à ce jour est dans les grains de pollen (Engel, 2005), et *AtSWEET7* (transporteur biologiquement non caractérisé à ce jour) ne sont presque exclusivement exprimés que dans les graines et les organes floraux. Au niveau des feuilles, nous avons retrouvé principalement l'expression des gènes *AtSWEET11* et *AtSWEET12*. Ces derniers ont été montrés comme étant exprimés au niveau des tissus conducteurs des feuilles et ont été retrouvés co-exprimés avec des gènes de synthèse du saccharose et du chargement du phloème (exemple la SPS et SUC2, Chen *et al.*, 2012). De plus, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* participeraient au chargement du saccharose dans le phloème par voie apoplasmique, et plus précisément lors de l'étape permettant l'export du saccharose des cellules mésophylliennes vers l'apoplasme (Chen *et al.*, 2012). Le gène *AtSWEET15* semble être uniquement exprimé dans les graines, il a été montré comme essentiel au développement des tissus de la graine (avec *AtSWEET11* et 12, non détectés dans les graines dans notre étude, Chen *et al.*, 2015). Le gène *AtSWEET16* est principalement exprimé dans les graines et légèrement en plante entière. Dans la littérature, le gène *AtSWEET16* est exprimé à des niveaux assez faibles dans les cellules parenchymateuses des tissus vasculaires des feuilles et des tiges florales (Klemens *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à des conditions d'expression assez généralistes et peu pointues, en effet les cartes d'expressions n'ont pas été construites à partir de données de transcriptomique au niveau cellulaire et des régulations plus fines peuvent donc être masquées au niveau de l'organe car certains gènes ne sont exprimés que dans certaines cellules (Rogers *et al.*, 2012). L'information peut alors être diluée dans le grand nombre de cellules analysées en même temps à l'échelle de l'organe.

Enfin, les membres de la famille MST possèdent des pourcentages de valeurs d'expression ≥ 2 , situés entre 0 et 18,99 %. La famille MST représente la plus grande famille de transporteurs de sucres chez les plantes, et de façon similaire aux transporteurs SWEET, leurs localisations et fonctions cellulaires sont assez vastes. Un grand nombre des MST n'est pas encore caractérisé à ce jour. Tout comme la famille SWEET, il semble cohérent que les gènes codant les transporteurs MST soient confrontés à des niveaux de régulation plus variables et élevés que ceux de la famille SUT. Là encore, nous avons retrouvé des gènes dont l'expression

est spécifique d'un organe : le gène *At3g05400* (non caractérisée à ce jour) est majoritairement exprimé dans les graines et dans certains organes floraux (Figure III.3). Au niveau des organes floraux, outre *AtSWEET3* déjà cité, les gènes *AtSTP6* et *AtSTP11* semblent également être uniquement exprimés dans ces tissus. Ces deux derniers gènes ont été rapportés comme étant exprimé de façon très spécifique dans un organe donné de la plante, comme par exemple dans les grains de pollen et le tube pollinique (Scholz-Starke, 2003; Schneidereit *et al.*, 2005). Au niveau des apex, les gènes *At5g54730*, *AtVGT2* et *AtSGB1* possèdent des profils d'expression plus ou moins identiques, mais à ce jour ces gènes n'ont pas encore été caractérisés.

D'après l'analyse de la carte d'expression (Figure III.3), notre hypothèse que la régulation transcriptionnelle des gènes codant les transporteurs de sucres est corrélée au nombre d'interactants s'avère erronée, puisque des pourcentages de conditions de certains gènes (possédant une valeur d'expression ≥ 2) ayant peu ou pas d'interactants sont plus élevés que ceux des transporteurs ayant beaucoup d'interactants. Par exemple, *AtTMT1*, qui ne possède pas d'interactant selon la force 4+, est régulé avec une valeur de 11,39 % selon les conditions expérimentales testées sur la carte d'expression. Cette valeur est similaire à celle d'*AtSWEET5* qui possède 27 interactants selon la force 4+. Cela peut donc refléter des régulations différentes selon le(s) transporteur(s) de sucres en termes de stratégies de réponse utilisées par la plante : soit une réponse isolée et directe par régulation transcriptionnelle de(s) transporteur(s) de sucres *versus* une régulation métabolique plus complexe qui peut avoir lieu à l'échelle de la protéine, par la formation d'interactions protéiques. Il se peut que cela reflète une régulation transcriptomique de certains interactants qui viendraient alors réguler les transporteurs de sucres au travers d'IPP.

2. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de la condition « stress abiotiques »

A partir de la carte d'expression présentant les niveaux d'expression des 34 gènes retenus, en réponse à divers stress abiotiques (Figure III.4), nous avons observé les mêmes résultats que précédemment, c'est à dire une régulation différente des gènes (en fonction des conditions) codants les transporteurs SUT, SWEET et MST. Néanmoins, nous pouvons noter pour les SUT un plus grand nombre de conditions « stress abiotique » pour lesquelles ils sont régulés (Figure III.4) par rapport en réponse aux conditions organes et stades de développement de la plante (Figure III.3).

De plus, nous avons pu identifier des signatures particulières du profil d'expression de certains gènes en fonction des différents stress abiotiques testés (Figure III.4). Par exemple, le gène *AtESL1* est le plus activé en réponse à un stress salin et osmotique au niveau des racines. Dans la littérature, *AtESL1* a été montré comme étant induit en réponse à des stress abiotiques (salin et sécheresse) au niveau du péricycle racinaire (Yamada *et al.*, 2010). Le gène *AtINT1* semble être induit spécifiquement par la sécheresse et à des temps courts dans les parties aériennes. Le gène *AtSWEET15* présent initialement dans les graines (Figure III.3) est retrouvé induit par un stress salin ou osmotique dans les parties aériennes à des temps plutôt long. Dans la littérature, il a été décrit comme étant induit en réponse à différents stress abiotiques tels que stress salin,

sécheresse et froid (Seo *et al.*, 2011). Le gène *AtSWEET16*, montré précédemment comme exprimé dans les racines (Figure III.3), semble être régulé uniquement en réponse à des stress sécheresse au niveau des racines (Figure III.4). Dans la littérature, *AtSWEET16* a été montré comme étant impliqué dans la tolérance d'*Arabidopsis* à un stress froid (Klemens *et al.*, 2013). Lors de nos recherches *in silico* dans MIND, nous avons pu observer qu'*AtSWEET16* semble interagir avec la protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant), impliquée dans la protection des plantes à des stress de type sécheresse et/ou froid (Boucher *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données nous laisse supposer que certains candidats ont un rôle plus spécifique dans le transport de sucres avec des activités modifiées en réponse à des stress abiotiques spécifiques.

Via cette expression des gènes dans les différentes conditions de stress abiotiques, comme précédemment une absence de corrélation entre régulation transcriptionnelle d'un transporteur et son nombre d'interactants est observée reflétant des régulations distinctes des transporteurs de sucres utilisées par la plante en fonction des modifications environnementales.

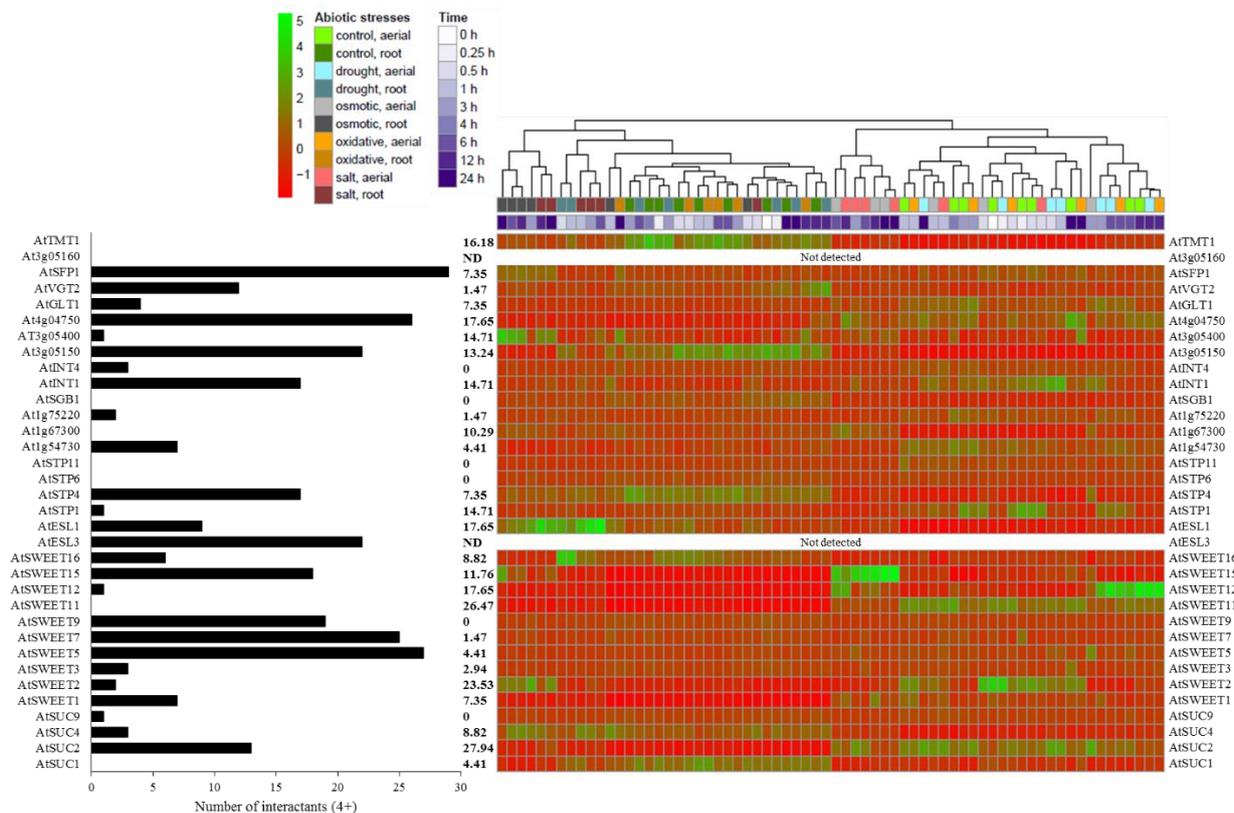


Figure III.4 : Carte d'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres avec le nombre d'interactants par transporteurs de sucres retrouvés avec la plus grande force d'interactions (force 4+), en réponses à des stress abiotiques. Les niveaux d'expression des 34 gènes codant les transporteurs de sucres ont été analysés dans les feuilles (aerial) et les racines (root) après différents temps et conditions de traitements : stress sécheresse (bleu clair et bleu foncé) qui correspond à un traitement de 15 min de courant d'air sec et stérile sous hôte à flux laminaire ; stress osmotique (gris clair et gris foncé) correspondant à un ajout de 300 mM de mannitol dans le milieu de culture ; stress oxydatif (orange clair et orange foncé) correspondant à un ajout de 10 μ M de dichlorure de paraquat (Methyl Viologen dichlorure hydrate) dans le milieu de culture puis un stress salin (rose clair et prune) correspondant à un ajout de 150 mM de NaCl dans le milieu de culture. Les pourcentages de conditions « stress abiotique » pour lesquelles un gène donné voit son expression régulée d'un facteur 2 ont été calculées et ajoutés au centre de la figure à gauche de la carte d'expression. Une légende détaillée des différentes conditions de traitements est représentée dans le Tableau A2.4 en Annexe 2.

3. Analyse de l'expression des gènes des 34 transporteurs de sucres en fonction de la condition « stress biotiques »

Concernant l'analyse de la carte d'expression présentant les niveaux d'expression des 34 gènes codant les transporteurs de sucres en réponse à différents stress biotiques, la plante *A. thaliana* ne formant pas de MA, nous n'avons pas pu étudier les profils d'expression des gènes codants les transporteurs de sucre dans cette condition de traitement. La MA ne sera donc pas discutée dans cette étude.

Après analyse, nous avons noté que les gènes de chaque famille semblent posséder plus ou moins le même profil d'expression en fonction des différentes conditions « biotiques ». En effet, les pourcentages de valeurs d'expression ≥ 2 varient entre 0 à 8,33 % pour les gènes de la famille SUT et entre 0 et 11,23 % pour les gènes de la famille SWEET et MST. Comme précédemment la régulation transcriptionnelle des 34 gènes ne semble pas être liée au nombre d'interactants. Par contre, les profils d'expression dans les conditions de stress biotiques sont fondamentalement différents de ceux observés dans les autres conditions (« organes »/stades de développement et stress abiotiques), ce qui confirme la bibliographie (citée dans l'état de l'art et le chapitre I) présentant les transporteurs de sucres comme des acteurs essentiels à la régulation des flux de sucres dans les relations biotiques à l'interface biotrophe.

En réponse au traitement « stress *Pseudomonas* » nous avons observé que les gènes suivants sont principalement exprimés après ce traitement : *At3g05400*, *AtSFP1*, *At1g75220*, *At1g54730*, *AtESL1*, *AtSWEET15*. A notre connaissance, le seul gène parmi ces 6 qui est induit en réponse à un agent pathogène est *AtSWEET15*. En effet, Chen et collaborateurs (2010) ont montré une surexpression foliaire d'*AtSWEET15* en réponse à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Les gènes *At4g04750*, *AtINT1* et *AtSWEET2* montrent des réponses transcriptionnelles plus spécifiques après un « stress *Phytophthora* ». Nous pouvons approcher ce résultat de la réponse observée par Chen et collaborateurs (2015) pour le gène *AtSWEET2* en réponse à la présence d'un autre oomycète *Pythium*. De plus, notre étude présentée dans l'article du chapitre I, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène *NtSWEET2* dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine, sécrétée par l'oomycète *P. cryptogea*. Ceci laisse supposer un rôle de ce transporteur dans la réponse aux attaques d'oomycètes.

Enfin, les gènes *At4g04750*, *AtSTP4*, *AtSTP11*, *AtSWEET1*, *AtSWEET2*, *AtSWEET16*, *AtSUC1* semblent répondre principalement aux éliciteurs. A ce jour, l'expression d'*AtSTP4* a été montrée comme étant rapidement induite en présence d'éliciteurs et/ou lors d'infection par des agents pathogènes (Truernit *et al.*, 1996).

Par contre, les gènes *AtSUC2*, *AtSCU9*, *AtSWEET3*, *AtSWEET5*, *AtSWEET7* et *AtSWEET9*, *AtSPT6* et *AtSTP11* et *At3g05150* sont globalement très faiblement exprimés et ne répondent pas à ces contraintes biotiques. Comme précédemment, ces résultats sont à garder dans le cadre de l'expérience MIND. En effet, Chen et collaborateurs (2010) ont montré une induction du gène *AtSWEET5* en réponse à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

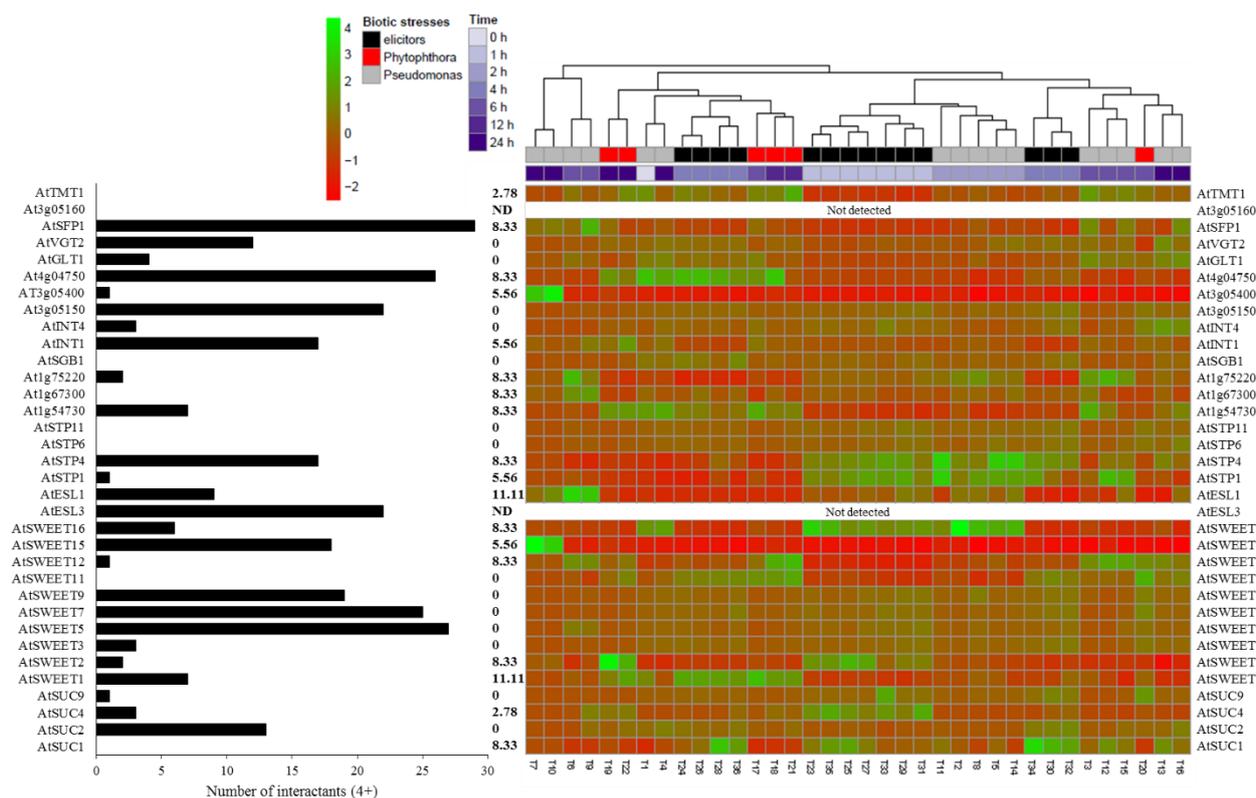


Figure III.5 : Carte d'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres avec le nombre d'interactants par transporteurs de sucres retrouvés avec la plus grande force d'interactions (force 4+), en réponses à des stress biotiques. Les niveaux d'expression des 34 gènes codants les transporteurs de sucres ont été analysés dans les feuilles après traitements par des différentes souches de pathogènes durant 2h, 6h ou 24h (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *avrRpm1*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrcC*-, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, des spores de *Phytophthora infestans*) et différents types d'éliciteurs durant 1h ou 4h (flg22, LPS, GST-NPP1, HrpZ). Les pourcentages de conditions « stress biotique » pour lesquelles un gène donné voit son expression régulée d'un facteur 2 ont été calculées et ajoutés au centre de la figure à gauche de la carte d'expression. Une légende détaillée des différentes conditions de traitements est représentée dans le Tableau A2.5 en Annexe 2.

4. Régulation globale de l'expression des transporteurs de sucres

Suite à ces trois analyses, nous avons décidé de représenter la somme des pourcentages des conditions dans lesquelles un gène donné est régulé à la hausse dans un facteur d'au moins 2, par rapport à l'ensemble des conditions, obtenus pour les 3 cartes d'expression (« organes » et « stade de développement » de la plante, stress abiotiques et stress biotiques). Dans un souci de discuter les gènes les plus régulés, nous nous sommes fixés pour la suite des analyses un seuil de 30 % des conditions régulées (en rouge, Figure III6).

Parmi la famille SUC (/SUT), le seul gène dont le pourcentage de valeur d'expression est \geq à 30 % des conditions est le gène codant AtSUC2 (/SUT1) avec un pourcentage de 38,07 % et 13 interactants. Concernant la famille SWEET on trouve : *SWEET1* avec une valeur d'expression de 33,65 % et 7 interactants, *SWEET2* avec une valeur d'expression de 47,05 % et 2 interactants, *SWEET11* avec une valeur d'expression de 45,56 % et aucun interactant, *SWEET12* avec une valeur d'expression de 43,7 % et 1 interactant et enfin *SWEET16* avec une valeur d'expression de 32,34 % et 6 interactants. Pour finir, parmi les membres de la famille MST, nous avons pu détecter 5 gènes dont la valeur d'expression est \geq 30 % : *ESL1* avec une valeur de 42,68 % et

22 interactants, *At3g05400* avec une valeur de 36,73 % et 1 seul interactant, *At4g04750* avec une valeur de 34,84 % et 26 interactants, *SFP1* avec une valeur de 34,67 % et 29 interactants et *TMT1* avec une valeur de 30,35 % et aucun interactants selon la force 4+.

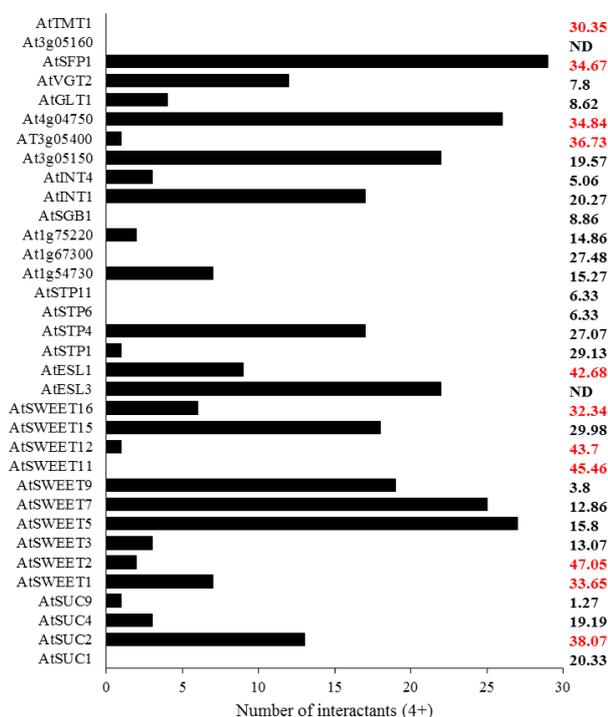


Figure III.6 : Régulation globale des transporteurs de sucres selon la somme des valeurs d'expression retrouvées dans les trois conditions. L'histogramme représente le nombre d'interactants pour chaque transporteur de sucres selon la force 4+ parmi les transporteurs de sucres qui ont au moins un interactant retrouvé sur le MIND (forces 4, 3 et 2+). Les chiffres à droite représentent la somme des pourcentages de conditions pour lesquelles un gène donné voit son expression régulée d'un facteur 2 obtenus sur les 3 cartes d'expression (« organes » et « stade de développement » de la plante Figure III.3, « stress abiotiques » Figure III.4 et « stress biotiques » Figure III.5).

Ces données nous permettent de proposer deux types possibles de régulations des transporteurs:

- les transporteurs *AtTMT1*, *At3g05400* de la sous-famille ERD6-like, *AtSWEET1*, *AtSWEET2*, *AtSWEET12* et *AtSWEET16* possèdent pas ou peu d'interactants de force 4+ et leurs gènes sont fortement régulés dans nos diverses conditions d'études (Figure III.6). Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces transporteurs sont sujets à des modifications transcriptionnelles importantes et ont un rôle direct via leur activité de transport dans les réponses aux modifications de l'environnement, mais ne semblent pas être fortement impliqués dans un réseau de régulation commun. Par contre, Xuan et collaborateurs (2013) ont montré par d'autres systèmes dans une étude plus ciblée par split ubiquitine en levure avec certaines interactions confirmées en split GFP dans des feuilles de *N. benthamiana*, que les 21 *AtSWEET* sont capables de former des homo- et des hétéro-dimères. Ceci, encore une fois, illustre la prudence avec laquelle il faut considérer les données de la base de données MIND, qui a été produite avec une seule condition expérimentale, même si elle reste un outil d'analyse puissant.

- *AtSUC2*, *AtESL1*, *At4g04750* de la sous-famille ERD6-like et *AtSFP1* ont un nombre important d'interactants selon la force 4+ (Figure III.6) et leurs gènes sont fortement exprimés en réponse aux différentes conditions testées. Ceci suggère une implication directe dans des réponses rapides aux modifications de l'environnement ainsi qu'une réponse plus complexe au travers d'un large réseau d'IPP. Ceci pourrait refléter deux niveaux de régulation de l'activité de ces transporteurs : transcriptionnel et post-traductionnel par des IPP. En effet, nous avons vu que le transporteur *AtSUC2/SUT1*, régulé à l'échelle

transcriptionnelle, présente également le plus grand nombre d'interactants de la famille SUT avec un total de 31 interactants de forces 4+, 3+, 2+ dont 13 de force 4+. Une régulation post-traductionnelle, par des interactions directes avec un même transporteur de sucres ou par d'autres protéines, a déjà été montrée pour des transporteurs de la famille SUT dont SUC2/SUT1 chez les Solanacées et chez *Arabidopsis* (Reinders *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003; Krügel *et al.*, 2008; Krügel *et al.*, 2012).

III. Visualisation de la topologie du réseau d'interactions transporteurs de sucres – protéines interactantes

La méthodologie permettant la construction du réseau est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes (voir partie « 4. Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez *A. thaliana* »). Ce réseau comprend les trois familles de transporteurs de sucres avec un code couleur associée à chaque famille, ainsi qu'un code couleur pour les interactants avec la force d'interaction 4+, 3+, 2+, selon le MIND (Figure III.7).

A première vue, nous observons que l'interactome des transporteurs de sucres est un réseau complexe, difficile à déchiffrer, avec un centre très dense où sont regroupés de très gros nœuds d'interactions (Figure III.7). Des nœuds avec moins d'interactants sont également visibles tout autour du centre dont certains très éloignés du centre (Figure III.7). Ce premier constat est en accord avec le rôle particulier et la localisation spécifique observée pour certains transporteurs de sucres, alors que d'autres jouent un rôle plus ubiquitaire dans la biologie de la plante (Julius *et al.*, 2017).

Parmi les plus gros nœuds d'interactions (cités ci-dessous sont représentés par le symbole  sur la figure III.7) détectés dans notre réseau, nous trouvons les transporteurs SWEET5 (112 interactants) et SWEET7 (57 interactants). Concernant la famille MST, le transporteur At1g54730 de la sous-famille ERD6-like représente le plus gros nœud d'interaction (situé au centre du réseau plus dense) composé de 56 interactants. Pour les SUT, le transporteur AtSUC2 (/SUT1) possède 31 interactants et le transporteur SUC4 en possède 30 interactants. Ces deux nœuds se retrouvent en dehors du centre du réseau plus dense et sont situés à l'opposé l'un de l'autre, de part et d'autre du réseau dense.

Nous avons également pu détecter deux interactions entre transporteurs de sucres, non identifiées à ce jour dans la littérature. La première interaction est celle entre At3g05160 de la sous-famille ERD6-like et une protéine de la famille des MST (AtSTP4). La deuxième interaction a été détectée entre un transporteur de la famille MST et un de la famille SUT, respectivement At3g05160 et AtSUC4.

Ceci illustre aussi les interactions entre transporteurs de sucres transportant différents types de sucres (saccharose, hexoses, ...) et l'existence de conditions où la plante peut réguler de façon simultanée le transport de différentes formes de sucres.

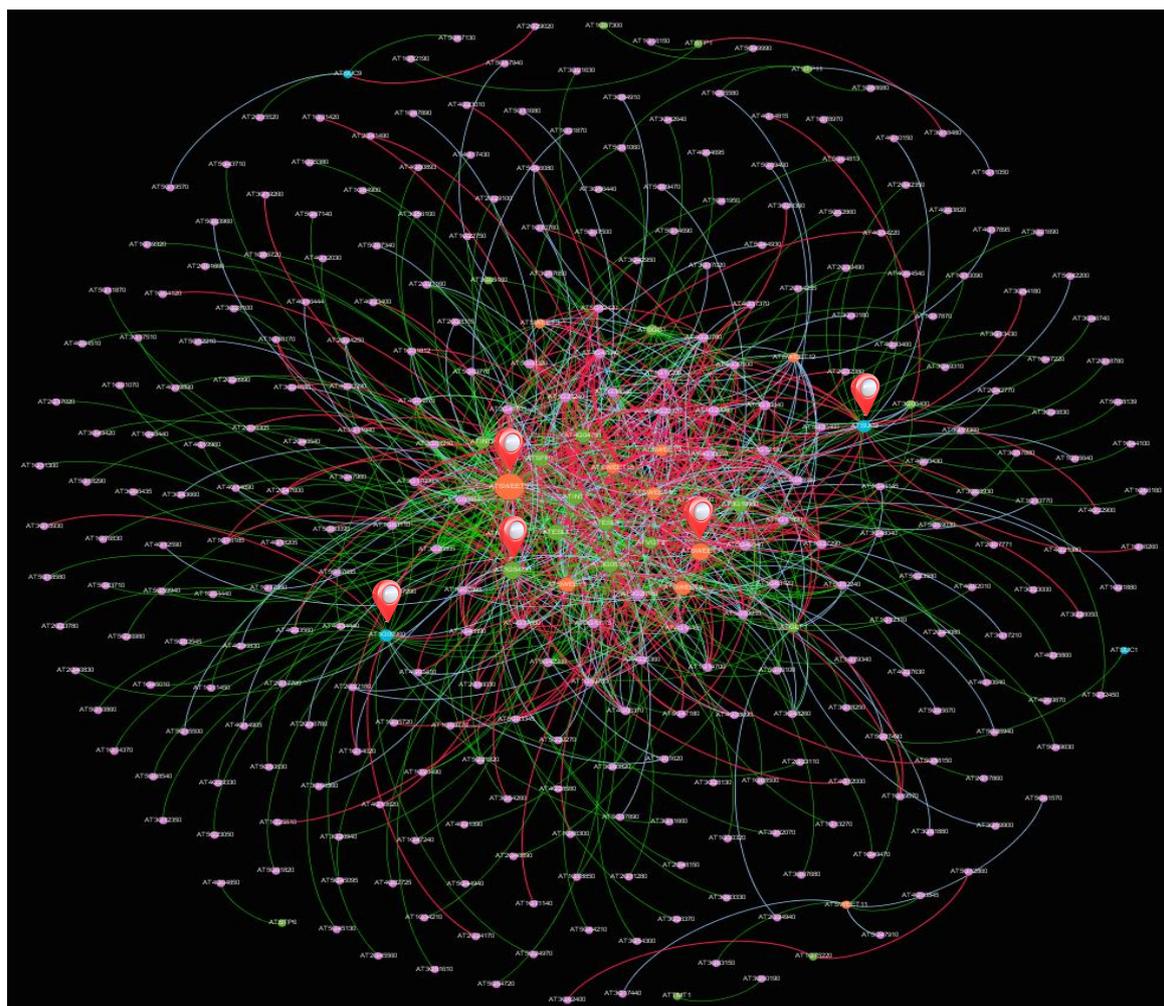


Figure III.7 : Réseau protéique global des 34 transporteurs de sucres et des 296 protéines interactantes. Les membres de la famille SUT/SUC sont représentés par des ronds bleus, ceux de la famille SWEET en orange et ceux de la famille MST en vert. Plus la taille du nœud est gros et plus le transporteur de sucres possède un nombre d'interactants élevé. La force d'interaction 4+ est représentée par des lignes rouges, la force d'interaction 3+ par des lignes bleues puis la force d'interaction 2+ par des lignes vertes. Le symbole 📍 représente les transporteurs cités dans le texte représentant les plus gros nœuds d'interaction.

IV. Les protéines interactantes des transporteurs de sucres : localisations et fonctions biologiques

A partir du réseau global nous avons pu établir une liste de 296 protéines membranaires, ou en périphérie de la membrane, qui interagissent avec les 34 transporteurs de sucres sélectionnés. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les fonctions biologiques potentielles de ces protéines. Cette recherche a été menée à l'aide d'un script développé en interne et du fichier d'annotation GOSlim de TAIR (https://www.arabidopsis.org/download_files/GO_and_PO_Annotations/Gene_Ontology_Annotations/ATH_GO_GOSLIM.txt_version_2017-02-13). La liste des 296 protéines interactantes avec leur localisation cellulaire prédite par MIND, ainsi que leur fonction biologique se trouve dans le Tableau A2.6 en Annexe 2. A partir de ces données, nous avons généré un diagramme circulaire reprenant les fonctions biologiques des 296 interactants (Figure III.8). Parmi les 296 protéines, 34,46% n'ont pas de fonction biologique connue,

17,57% interviennent dans le transport au sens large - aussi bien le transport d'ions et de métabolites que le trafic intracellulaire-, 10,47% correspondent à des protéines associées aux processus cellulaires, 10,14% ont des fonctions dans les processus liés aux stress biotiques et abiotiques et enfin 9,46% interviennent dans les processus métaboliques. Les protéines restantes sont regroupées dans les processus liées à l'organisation cellulaire, le développement, les processus biologiques, le métabolisme des protéines et la transduction du signal.

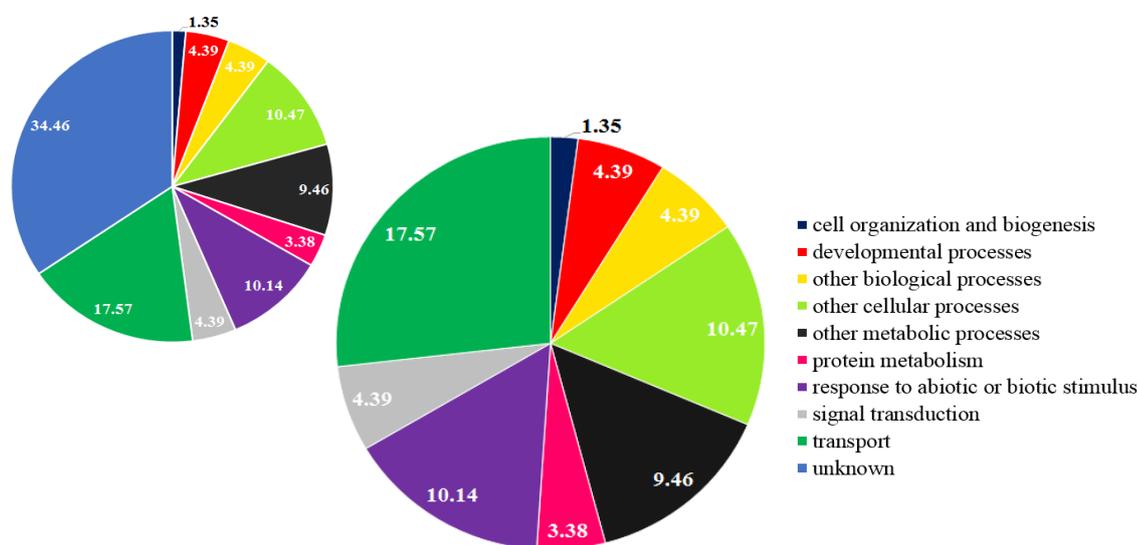


Figure III.8 : Diagramme circulaire représentant la fonction biologique des 296 protéines interagentes aux transporteurs de sucres retrouvées sur le réseau. Le diagramme de gauche représente toutes les fonctions biologiques des interactants comprenant les protéines n'ayant pas de fonction identifiée à ce jour ('unknown'). Le diagramme du centre a été établi sans la proportion des protéines 'unknown'.

Sans surprise, la plus grande proportion des interactants connus a une fonction liée au transport. Les deux autres grands groupes d'interactants ont des fonctions biologiques associées aux réponses aux stress abiotiques et biotiques ainsi qu'aux processus cellulaires. A ce jour, peu d'études ont été menées sur l'identification de protéines interagissant avec les transporteurs de sucres. Les rares données de la littérature indiquent que les transporteurs SUT semblent interagir avec différents types de protéines impliquées dans le métabolisme, la signalisation et le trafic cellulaire. En effet, il a été montré chez la pomme de terre que deux candidats semblent interagir avec SUT1 : une pompe H⁺-ATPase ainsi qu'une lipocaline (TIL, temperature induced lipocalin, Krügel *et al.*, 2012). Les TILs semblent être impliquées dans la tolérance au froid chez les plantes, dans la stabilité des membranes et dans les réponses aux stress abiotiques (Chi *et al.*, 2009). Dans la même étude, StSUT1 semblent également interagir avec des protéines impliquées dans l'adressage subcellulaire de la protéine. Liesche et collaborateurs (2010) avaient montré que StSUT1 est internalisé et présent dans des vésicules de recyclage à la membrane plasmique, suggérant un recyclage du transporteur. La mobilité des vésicules contenant SUT1 semble être dépendante de l'actine et indépendante de la tubuline car des protéines liées à l'actine (actine-related protein ARPC1/ARBC1A) appartenant au complexe Arp2/3 impliqué dans le contrôle de la polymérisation de l'actine, sont co-précipitées avec SUT1 chez la pomme de terre (Krügel *et al.*, 2012). StSUT1 interagit également avec une protéine des microdomaines membranaires, la protéine disulfure isomérase (PDI), qui elle-même interagit avec StSUT4 and SISUT2. La PDI aurait un

rôle dans le contrôle de l'oligomérisation de SUT1 et l'adressage des transporteurs SUT du RE vers les microdomaines de la membrane plasmique (Krügel *et al.*, 2012). De même, la protéine Sec61, acteur du système sécrétoire localisée au niveau du RE, a été identifiée en interaction avec SUT1 chez la pomme de terre et serait impliquée dans l'export de StSUT1 du RE vers la membrane plasmique (Liesche *et al.*, 2011; Krügel *et al.*, 2012).

D'autres protéines interagissant des SUT sont des protéines impliquées dans la signalisation et/ou des enzymes du métabolisme. Les travaux de Krügel et collaborateurs (2012) ont ainsi identifié une interaction entre StSUT1 et une glucose-1-phosphate adényltransférase, qui est une grande sous unité de la protéine ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase). L'AGPase est une enzyme clé dans la biosynthèse de l'amidon et forme un hétérotétramère allostérique. L'activité de l'enzyme est régulée par la disponibilité en sucres et la lumière *via* une modification de la conformation de l'enzyme (par une réduction des ponts disulfures probablement par l'intervention d'une thioredoxine) régulant ainsi son activité (Geigenberger *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que des plantes transgéniques ayant une expression réduite de SUT (NtSUT1, SISUT1 et SISUT2, StSUT4) possèdent un taux élevé d'amidon dans les feuilles sources (Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006; Chincinska *et al.*, 2008). L'identification de l'interaction entre StSUT1 et la glucose-1-phosphate adényltransférase pourrait suggérer un autre mode de régulation de l'activité de l'enzyme AGPase par son interaction directe avec StSUT1. On peut ainsi suggérer la création de « cargos protéiques » activés pour répondre aux modifications de l'environnement.

Différents auteurs ont également émis l'hypothèse d'une régulation de l'activité des transporteurs SUT par phosphorylation (Roblin *et al.*, 1998; Nühse *et al.*, 2004; Niittylä *et al.*, 2007). Les protéines 14-3-3 régulent de nombreux processus cellulaires en se liant à des protéines phosphorylées. Shin et collaborateurs (2011) ont montré que le transporteur AtSUC6 interagit directement avec une protéine 14-3-3, suggérant qu'AtSUC6 est également phosphorylée. Par contre, à ce jour, les sites de phosphorylations des SUT ainsi que l'effet de cette modification post-traductionnelle sur la localisation subcellulaire, l'oligomérisation ou l'activité des transporteurs SUT sont peu connus. Récemment, il a été montré que la phosphorylation du transporteur de monosaccharide STP13 semble être essentielle à son activité et est nécessaire pour la défense antibactérienne d'*A. thaliana*. En effet, la phosphorylation du résidu thréonine 485 de STP13 par le corécepteur BAK1 améliore l'activité d'absorption des hexoses de l'apoplaste dans le but de concurrencer les bactéries en sucres extracellulaires (Yamada *et al.*, 2016).

Il n'est pas à exclure, voire probable, que d'autres transporteurs de sucres puissent être régulés par phosphorylation.

V. Recherche de protéines régulatrices putatives des transporteurs de sucres

Au vu de l'importance des transports de sucres dans les IPMs *via* la régulation des flux de sucres à l'interface biotrophe et de l'annotation d'environ 10 % des protéines interagantes aux transporteurs de sucres ayant une fonction biologique liée à des stress abiotiques et biotiques (Figure III.8), nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'expression de l'ensemble de ces gènes dans la condition « stress biotiques ».

Afin d'identifier des candidats potentiels qui interviendraient dans la régulation des transporteurs de sucres en réponse à des molécules microbiennes, nous avons regroupé les niveaux d'expression des 34 gènes codants les transporteurs de sucres avec ceux des gènes des 296 protéines interagantes de notre interactome (Figure III.7) dans les conditions stress biotiques *via* la base de données AtGenExpress Visualization Tool (Schmid *et al.*, 2005). Pour organiser les données et proposer une visualisation plus simple des tendances sous-jacentes qui se dégagent dans les conditions testées (Figure III.9), un cladogramme a été généré par analyse hiérarchisée des niveaux d'expression pour chaque condition testée. Comme les profils d'expression s'insèrent dans 4 à 6 groupes majeurs en fonction des conditions, nous avons décidé de regrouper des profils d'expression en k-moyennes (ici k = 6).

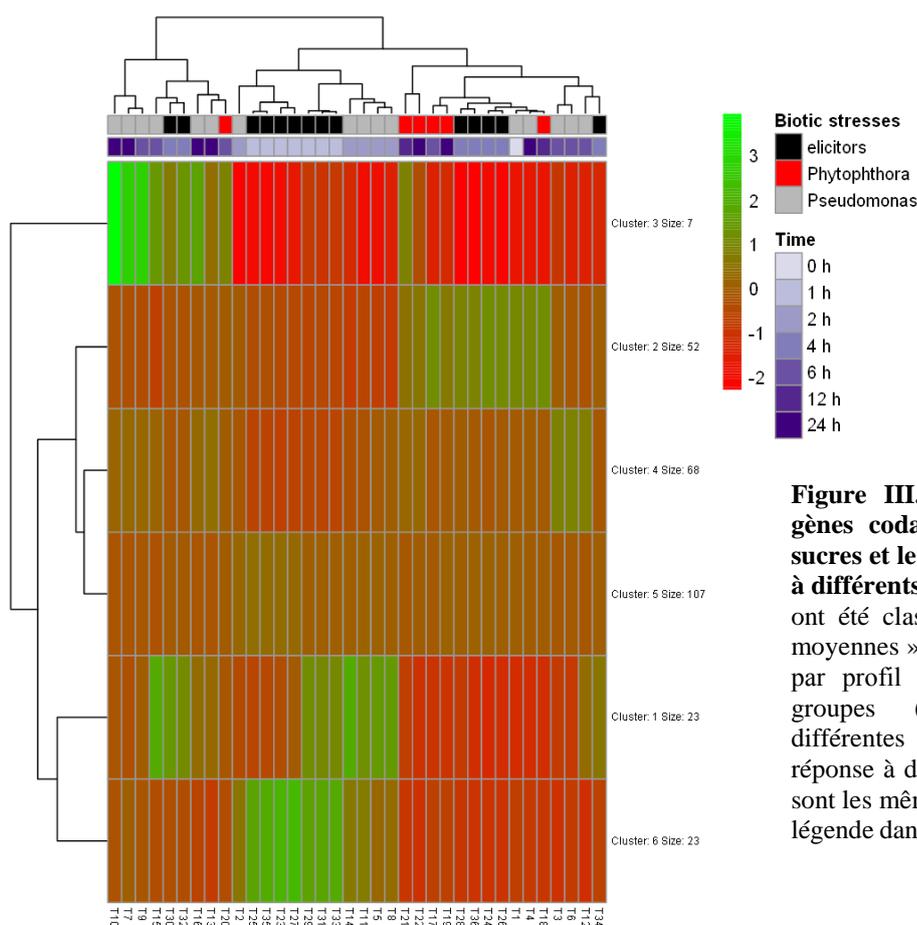


Figure III. 9: Carte d'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres et les 296 interagants en réponse à différents stress biotiques. Les données ont été classées et hiérarchisées en « k-moyennes », répartissant ainsi les gènes par profil d'expression similaire [ici 6 groupes (clusters) différents]. Les différentes conditions de traitements en réponse à des pathogènes et des éliciteurs sont les mêmes que sur la Figure III.5 et la légende dans le Tableau A2.5 en Annexe 2.

Les gènes regroupés dans le cluster 3 (Figure III.9) répondent principalement à un traitement de type *Pseudomonas* à des temps plutôt tardifs (entre 4 et 12h). Le cluster 1 (Figure III.9) répond aussi à un traitement de type *Pseudomonas* comme certains gènes regroupés dans le cluster 3, mais à des temps plus

précoces (1 à 4 h). Concernant les gènes appartenant au cluster 2 (Figure III.9) sont régulés plutôt faiblement par les différents types de stress à des temps plutôt tardifs. Les gènes regroupés dans les clusters 4 et 5 (Figure III.9) ne semblent pas être régulés. Enfin, les gènes du cluster 6 (Figure III.9) répondent principalement à un traitement « éliciteurs » à des temps précoces (jusqu'à 1-2 h) et ne répondent pas du tout à d'autres traitement « éliciteurs » à des temps plus tardifs. Cette dernière condition par exemple nous permet de voir des groupes de gènes qui répondent à des environnements spécifiques et à des temps de traitement court.

Afin d'identifier des candidats potentiels qui réguleraient l'activité des transporteurs de sucres par des IPP nous avons sélectionné une liste de gènes ayant des valeurs d'expression les plus élevées. La liste des gènes les plus surexprimés se trouve dans le Tableau A2.7 en Annexe 2. Le cluster 3 est celui qui comprend un ensemble de gènes les plus surexprimés (Tableau A2.7).

Dans cette liste, composée de 108 gènes, nous avons retrouvé 8 gènes codant différents transporteurs de sucres :

- *AtSUC1*, *AtTMT1* et *At1g75220* de la sous-famille ERD6-like. Ces 3 transporteurs ne possèdent pas ou très peu d'interactants selon la force d'interaction 4+ (Tableau A2.2 en Annexe 2, et/ou Figure III.6). Par contre ces gènes sont fortement régulés dans notre condition expérimentale. Comme introduit en début de chapitre nous pouvons émettre l'hypothèse que ces transporteurs ont un rôle direct dans les réponses aux modifications de l'environnement, mais ne semblent pas être impliqués dans un réseau de régulation commun par des interactions protéiques.

- *AtSUC9* et *AtSWEET2* possèdent un faible nombre d'interactants de force d'interaction 4+ (Tableau A2.2 en Annexe 2, et/ou Figure III.6) mais sont fortement exprimés dans notre étude. Ces transporteurs sont également impliqués dans des réponses directes aux modifications de l'environnement et certainement dans des réponses à plus faible niveau dans un réseau de régulation commun. Par exemple, l'unique protéine interagissant avec *AtSUC9*, d'après les données de la base de données MIND, est une protéine appartenant à la famille des petites GTPase (Rab5-interacting family protein, *At2g29020*) qui interviennent dans la régulation du trafic cellulaire. Il n'est pas à exclure que la protéine Rab5 possède une fonction régulatrice des transporteurs SUT intervenant dans le contrôle de l'adressage et/ou l'internalisation permettant le recyclage ou la dégradation dans la vacuole de ces derniers. Le transporteur *AtSWEET2* interagit avec deux protéines, dont une n'a pas de fonction associée pour le moment et la deuxième est une protéine LEA (LEA hydroxyproline rich glycoprotein, *At5g06320*). Les protéines LEA participent à la protection des plantes contre les phénomènes de dessiccation, de stress froid et/ou osmotiques (Goyal *et al.*, 2005; Boucher *et al.*, 2010). Elles ont la capacité d'interagir avec les membranes, par exemple elles protègent les membranes mitochondriales en s'y associant pour éviter la perte d'eau lors de ces stress (Tolleter *et al.*, 2010).

- *AtSUC2*, *AtINT1* et *AtSTP4* possèdent un nombre plus important d'interactants selon la force 4+ (Tableau A2.2 en Annexe 2, et/ou Figure III.6) et sont fortement exprimés dans notre condition d'étude. Ceci suggère

une implication directe de ces transporteurs dans les réponses rapides aux modifications de l'environnement et une réponse plus complexe au travers d'un large réseau d'interactants. En effet, nous avons déjà vu que le transporteur AtSUC2 possède le plus grand nombre d'interactants de la famille SUT avec un total de 31 interactants. Les transporteurs de la famille MST, AtINT1 et AtSTP4 possèdent 43 interactants chacun, cette valeur se rapprochant de celle du grand nombre d'interactants (56) retrouvée dans cette famille (Tableau A2.2 en Annexe 2). Ces résultats traduisent que ces transporteurs semblent être régulés à l'échelle de la protéine, dont des exemples d'une telle régulation ont déjà été montrés pour quelques transporteurs de la famille SUT (SUC1, SUC2 (/SUT1) et SUC4) et MST (STP13) par des interactions directes avec un même transporteur de sucres ou par d'autres protéines, dans un contexte d'IPM ou non (Reinders *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003; Krügel *et al.*, 2008; Krügel *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2016), en plus d'une régulation transcriptomique, dont la régulation de l'expression de certains transporteurs de sucres a déjà été observée en réponse à des pathogènes (Truernit *et al.*, 1996; Fotopoulos *et al.*, 2003).

Dans la liste de gènes surexprimés en réponse au stress biotique (Tableau A2.7 en Annexe 2), nous avons également trouvé des gènes codant des protéines de transport impliquées dans le transport d'autres éléments (acides aminés, azote, cuivre, nitrate, manganèse, molybdate), ainsi qu'un nombre important de différentes protéines impliquées dans la transduction du signal telles que des protéines kinases ou des récepteurs. Ceci illustre d'une part l'interdépendance des différentes voies nutritionnelles (comme suggéré par Bonneau et collaborateurs, 2013), et d'autre part l'importance des cascades de signalisation dans la régulation des flux de sucres en réponse aux modifications de l'environnement.

Au vu de la liste assez conséquente de gènes surexprimés dans la condition étudiée, nous avons choisi de nous focaliser sur deux protéines interactantes qui possèdent deux "types d'interactions" avec les transporteurs de sucres (Figure III.6). A savoir, une protéine qui est en interaction directe avec un nombre élevé de transporteurs de sucres des différentes familles (toutes forces d'interactions confondues), et à l'inverse une protéine qui est en interaction avec un très faible nombre de transporteurs de sucre mais qui partage des interactants avec des transporteurs de sucre. Ces deux protéines sélectionnées figurent en rouge dans le Tableau A2.6 en Annexe 2 et sont détaillées dans les deux parties suivantes.

1. Une t-SNARE, candidate impliquée dans la régulation de l'activité des transporteurs de sucres

La première protéine sélectionnée est une t-SNARE (At1g29060, t-Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor), localisée dans le cytosol et impliquée dans le trafic membranaire. Selon la base de données MIND, elle serait en interaction avec 2 AtSUT (SUC2 (/SUT1) et SUC4), 8 ASWEET (SWEET1, 2, 3, 5, 7, 9, 15 et 16) et 9 AtMST (At4g04750, INT1, VGT2, At3g05400, INT4, GLT1, SGB1, Figure III.10).

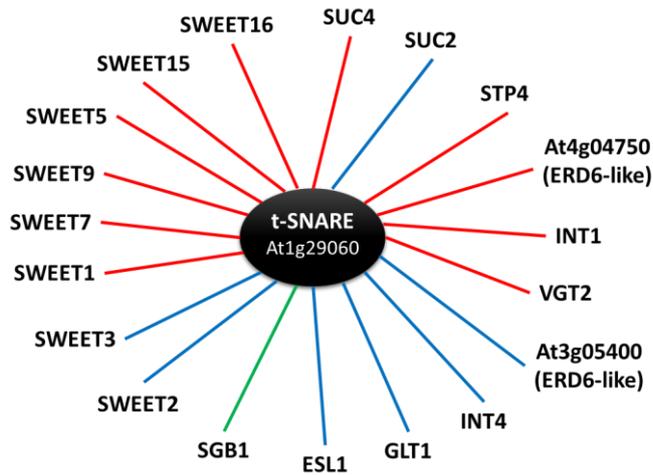


Figure III.10 : Réseau hypothétique de régulation des transporteurs de sucres par l'interaction directe d'une t-SNARE. La force d'interaction 4+ est représentée par des lignes rouges, la force d'interaction 3+ en bleue puis la force d'interaction 2+ en vert.

Les SNARE sont des protéines régulatrices clés dans le trafic cellulaire/membranaire chez les eucaryotes, permettant la fusion des membranes entre elles lors de divers événements de transport vésiculaire (Sutter *et al.*, 2006). Chez *A. thaliana*, une soixantaine de protéines SNARE ont été rapportées (Sanderfoot, 2007). Les SNARE sont classées en deux types en fonction de leur emplacement et de leurs fonctions : les SNARE résidant sur des vésicules sont appelées v-SNARE (vesicle-SNARE), alors que celle qui résident sur la membrane cible sont des t-SNARE (target-SNARE) (Hong, 2005). Chez les plantes, les protéines SNARE contribuent à différents processus biologiques tels que la croissance des plantes, l'homéostasie, les réponses hormonales, la signalisation en réponse à des stress abiotiques mais également dans la résistance contre les agents pathogènes (Lipka *et al.*, 2007; Bassham and Blatt, 2008; Tarte *et al.*, 2015).

Il a été montré que le transporteur StSUT1 pouvait être internalisé et retrouvé dans des vésicules intracellulaires suggérant un recyclage du transporteur (Liesche *et al.*, 2010). Nous pouvons alors supposer que la protéine t-SNARE intervient dans la régulation des transporteurs de sucres, en agissant sur le trafic cellulaire (endo/exocytose ou recyclage) de ces derniers.

2. Une rbohD, candidate impliquée dans la régulation de l'activité des transporteurs de sucres

La deuxième protéine sélectionnée est une NADPH oxydase plasmalemmique rbohD (At5g47910). C'est un des acteurs clés dans la production de FAO, molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance et le développement et également dans les réactions de défenses en réponse à divers stimuli de l'environnement (Suzuki *et al.*, 2011) notamment après perception de molécules microbiennes (voir chapitre D). Les protéines rboh sont au centre du réseau de production de FAO, en intégrant diverses voies de transduction du signal avec la signalisation FAO (Suzuki *et al.*, 2011). Chez *A. thaliana*, les isoformes rbohD et rbohF sont responsables de la production de FAO en réponses à des MAMP, des pathogènes microbiens et/ou des DAMP (Torres *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2008), avec un rôle prédominant pour rbohD.

A la membrane plasmique, AtrbohD a non seulement un rôle dans la signalisation lors de l'immunité, mais forme également un complexe avec des PRR tels que FLS2 et/ou EFR et la protéine kinase BIK1 (Botrytis

Induced Kinase 1), suite à la perception d'éliciteurs tels que la flagelline ou EF-Tu (Figure III.11, Li *et al.*, 2014; Kadota *et al.*, 2014). Dans un état inactif (sans présence d'éliciteurs), la protéine BIK1, une RLCK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase), est associée aux récepteurs RLK FLS2/EFR et BAK1 (BRI1-Associated receptor Kinase 1, Figure III.11). La reconnaissance de l'éliciteur à FLS2 (ou EFR) induit son association avec BAK1 ainsi que la transphosphorylation des domaines cytoplasmiques des récepteurs FLS2 (ou EFR) et BAK1. Le complexe FLS2 (ou EFR)-BAK1 activé, phosphoryle BIK1 qui est dans une forme activée (Lu *et al.*, 2010). Les travaux de Li et collaborateurs (2014) et Kadota et collaborateurs (2014), ont révélé que la protéine rbohD peut être directement et rapidement phosphorylée par la protéine BIK1, qui interagit directement avec elle suite à la perception de PAMP. Cette régulation semble être essentielle pour la fonction de l'enzyme *via* la production de FAO lors de la PTI.

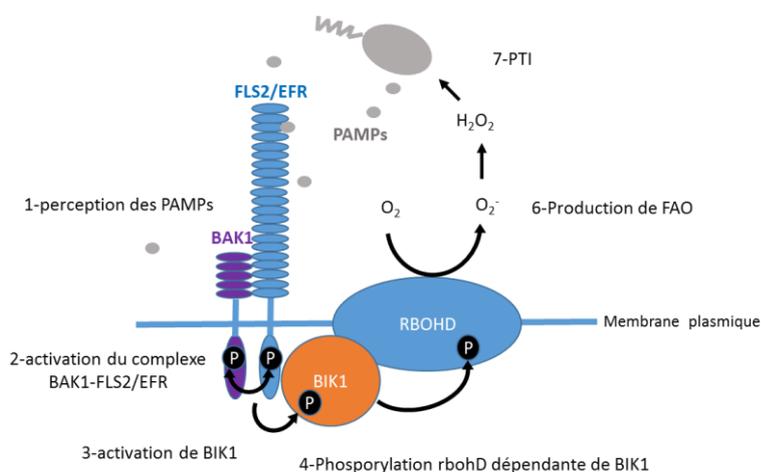


Figure III.11 : Schéma simplifié montrant la régulation directe de rboh par l'association avec des PRR et BIK1 durant l'immunité. Adapté de Kadota *et al.*, 2014.

De plus, chez le tabac, NtrbohD responsable de la production de FAO, a été localisée par des travaux antérieurs à l'équipe de manière biochimique dans des micro-domaines de la membrane plasmique (Morel *et al.*, 2006) et par microscopie dans des petits groupes (« clusters ») à la membrane plasmique et également dans l'appareil de Golgi (Noirot *et al.*, 2014). Cette dernière localisation est supposée servir de réserve pour resensibiliser la cellule suite à l'élicitation par la cryptogéine en fournissant NtrbohD à la membrane plasmique (Noirot *et al.*, 2014). Les auteurs ont également rapporté que la production de FAO observée au cours de l'élicitation proviendrait de l'activation d'un pool de NADPH présent à la membrane plasmique, indiquant ainsi que le contrôle de l'abondance de l'enzyme et sa localisation cellulaire joue un rôle dans les mécanismes de production de FAO (Noirot *et al.*, 2014).

Selon la base de données MIND, la protéine AtrbohD est seulement en interaction directe avec un unique transporteur de sucres, AtSWEET11, avec une force d'interaction 3+. Nous avons donc cherché des interactants communs entre AtrbohD et d'autres transporteurs de sucres. En raison du nombre élevé de protéines interagissant avec AtrbohD (159 protéines toutes forces confondues) et afin de consolider notre analyse nous avons analysé uniquement les interactions de force 4+. Cette recherche a montré que la protéine AtrbohD interagit avec 12 protéines membranaires et/ou solubles (Tableau A2.8 en Annexe 2) ayant des fonctions biologiques variées, qui sont elles-mêmes en interaction avec des transporteurs de sucres des

différentes familles (Figure III.12, la liste détaillée des transporteurs de sucres se trouve dans le Tableau A2.9 en Annexe 2). Parmi les 12 protéines en interaction avec *AtrbohD*, certaines ont été précédemment identifiées comme étant impliquée dans la régulation du trafic membranaire, d'autres représentent des enzymes, des protéines participant à la synthèse ou au transport de nutriments, à la résistance au froid et à la dessiccation et enfin des protéines impliquées dans la signalisation liée au calcium (Tableau A2.8 en Annexe 2).

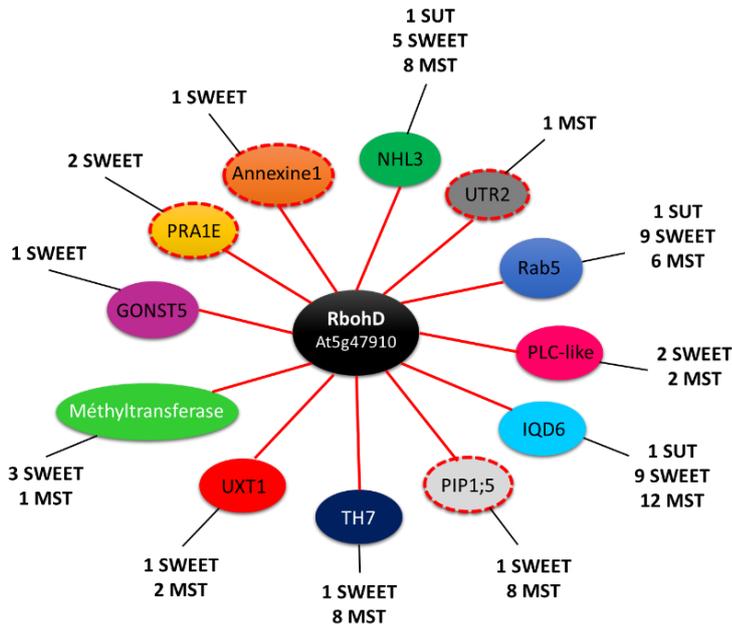


Figure III.12 : Réseau hypothétique de régulation des transporteurs de sucres par une interaction indirecte de la protéine *rbohD*. La protéine *rbohD* d'*Arabidopsis* est en interaction directe avec 12 protéines avec une force d'interaction 4+ (droites rouges), qui elles-mêmes sont en interactions avec différents transporteurs de sucres, selon différentes forces d'interactions (4+, 3+ et 2+). Les protéines entourées d'un trait discontinu rouge sont des protéines dont les gènes sont surexprimés dans la carte d'expression se trouvant sur la Figure III.9 et dans le Tableau A2.8 en Annexe2.

Les transporteurs de sucres étant des protéines membranaires, ils transitent par le système sécrétoire pour être adressés à leur lieu d'action et pour être recyclés et/ou dégradés. Nous nous sommes donc intéressés plus en détail aux protéines impliquées dans la régulation du trafic membranaire :

- La **protéine Rab5** pour Ras related-protein 5 (en bleu foncé sur la Figure III.12) est une petite protéine liée au trafic vésiculaire appartenant à la famille des petites GTPases, qui circulent entre un état actif lié au GTP associé à des membranes et un état inactif lié au GDP présent dans le cytosol (Rutherford and Moore, 2002). Les Rab fonctionnent avec des protéines SNARE solubles pour favoriser la fusion membranaire (Bassham and Blatt, 2008). Elles sont impliquées dans la fusion de vésicules entrantes vers les organites cibles ou dans la génération de vésicules spécifiques à partir de membranes d'organites, par des mécanismes qui doivent être encore élucidés. D'autres protéines de la famille Rab (RabE et Rab3b) semblent être impliquées dans le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique, et jouent un rôle dans la défense des plantes, en conférant une résistance à l'infection par *P. syringae* (Speth *et al.*, 2009) ainsi que dans la régulation de l'autophagie et la RH associées à l'immunité (Kwon *et al.*, 2013). Récemment, une activation de Rab5 par une protéine associée aux endosomes (VPS9a) a été démontrée lors des IPM. VPS9a intervient dans la régulation du trafic de vésicules membranaires requises dans l'immunité innée lors de la formation de structure défense comme un dépôt de callose autour de l'haustorium (Nielsen *et al.*, 2017), proposant un rôle de Rab5 dans la réponse aux pathogènes. Au-delà d'*AtRbohD*, 16 transporteurs de sucres sont en interaction directe avec Rab5 à savoir : 1 membre de la famille SUT (*AtSUC2*), 9 membres de la famille

SWEET (AtSWEET1, AtSWEET2, AtSWEET3, AtSWEET5, AtSWEET7, AtSWEET9, AtSWEET12, AtSWEET15, AtSWEET16) et 6 membres de la famille MST (AtSTP4, AtVGT2, AtINT1, AtINT4, AtSGB1, AtGLT1). Ceci confirme une probable régulation de l'adressage/recyclage des transporteurs de sucres concernés dans un contexte de défense/d'IPM que l'on peut proposer en lien avec AtrbohD.

- La **protéine PRA1.E** pour Prenylated Rab Acceptor 1.E, (en jaune sur la Figure III.12), est un membre de la famille PRA1 composée de petites protéines transmembranaires qui régulent le trafic des vésicules, en se liant aux protéines Rab prénylées, en tant que récepteurs à ces dernières (Alvim Kamei *et al.*, 2008). Les protéines Rab peuvent être modifiées au niveau post-traductionnel par ajout de groupements prényles à leur extrémité C-terminale. Cet ajout de groupements hydrophobes permet la fixation de ces protéines aux membranes cellulaires comme des ancrs membranaires lipidiques (Glomset and Farnsworth, 1994). Les protéines PRA1 participent donc dans le recrutement de protéines Rab prénylées à leur(s) organite(s) apparenté(s). Cependant leur rôle physiologique est encore inconnu. Récemment, un autre membre de la famille PRA1, une protéine AtPRA1.F4 a été suggérée comme contribuant à la sortie de protéines de l'appareil de Golgi vers les compartiments post-golgiens (Lee *et al.*, 2017). Dans notre analyse du transcriptome d'Arabidopsis, l'expression du gène codant PRA1.E est régulée positivement en réponse à traitement « *Pseudomonas* » (Figure III. 9 et Tableau A2.7 en Annexe 2). De même, dans la signalisation déclenchée par l'éliciteur fongique EIX, cette protéine interagit avec le récepteur LeEIX au niveau de l'appareil de Golgi et régule son trafic. PRA1 est proposée comme un acteur important du trafic pour la voie de signalisation de ce récepteur (Pizarro *et al.*, 2016). La régulation au niveau de l'appareil de Golgi de cette protéine qui interagit avec AtrbohD est également en accord avec une localisation golgienne de NtrbohD que l'équipe a démontrée chez le tabac (Noirot *et al.*, 2014). Dans notre réseau hypothétique (Figure III.12), deux transporteurs de sucres sont en interaction avec PRA1.E, AtSWEET7 et AtSWEET9. Encore une fois cela confirme bien une probable régulation de l'adressage/recyclage des transporteurs de sucres concernés dans un contexte de défense/d'IPM.

- L'**annexine 1** (ANN1, en orange sur la Figure III.12) fait partie d'une famille de protéines solubles impliquée dans des processus liés aux membranes cellulaires (trafic membranaire, endo- et exocytose, phagocytose et autophagie) grâce à leur capacité à lier les membranes entre elles, de façon Ca^{2+} -dépendante (Konopka-Postupolska and Clark, 2017). En effet, l'annexine 1 est un canal perméable au Ca^{2+} permettant son influx dans le cytosol (Richards *et al.*, 2014) qui a de plus été montrée comme étant capable de réguler les taux d' H_2O_2 dans les cellules d'Arabidopsis (Clark *et al.*, 2010). Le mutant *Atannexine 1* a montré des profils $[Ca^{2+}]_{cyt}$ aberrants dans les racines et dans des protoplastes de racines stimulées par de l' H_2O_2 exogène. Les auteurs ont proposé que l'annexine 1 est un composant du réseau de signalisation H_2O_2 chez les plantes (Richards *et al.*, 2014). De manière intéressante, H_2O_2 dans la signalisation déclenchée par l'éliciteur cryptogéine a été montré comme indispensable à la réorganisation de la membrane (Sandor *et al.*, 2016) et à l'endocytose à clathrine (Leborgne-Castel *et al.*, 2008) chez le tabac.

Récemment Espinoza et collaborateurs (2017) ont montré un lien unique entre la signalisation médiée par un stress salin et en réponse aux agents pathogènes, et plus particulièrement dans la signalisation déclenchée par la chitine suite à sa reconnaissance par le récepteur CERK1. Ces travaux ont montré, par des expériences de complémentation de fluorescence bi-moléculaire (BiFC, Bimolecular fluorescence complementation) et co-immuno précipitation, que l'annexine 1 et CERK1 interagissent physiquement. Un modèle d'interaction entre les deux protéines a été proposé par les auteurs illustrant un double rôle de l'annexine 1 dans le stress salin et dans l'immunité induite par la chitine induisant une reprogrammation transcriptomique induite par le stress salin et la perception de la chitine (Figure III.13, Espinoza *et al.*, 2017).

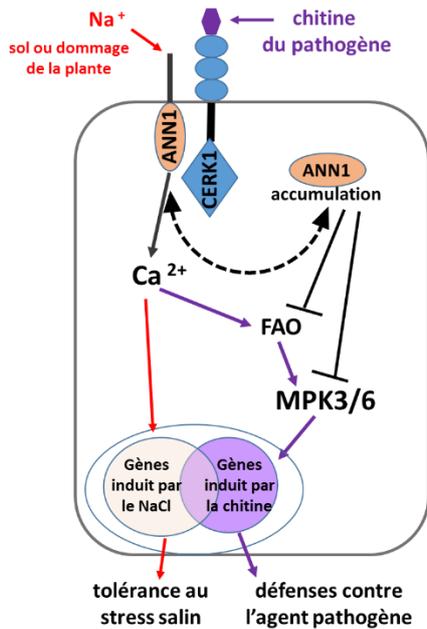


Figure III.13 : Modèle d'interaction et rôle biologique de l'Annexine 1 (ANN1) et du récepteur CERK1. Une augmentation de Na^+ extracellulaire, provenant de sols/des dommages cellulaires durant une attaque fongique, et la perception de la chitine sont détectées par les cellules au niveau de la membrane plasmique. A ce niveau, CERK1 interagit avec ANN1 en formant un complexe protéique ayant un rôle croisé dans la signalisation en réponse au Na^+ et à la chitine. ANN1 s'accumule en réponse à ces stimuli et peut être mobilisé à la membrane plasmique et contribuer à des élévations $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. ANN1 va réguler l'influx de Ca^{2+} et initier d'une part une réponse transcriptomique dépendante du stress salin et par le biais de la modulation des FAO influencer l'activité de MAPK intervenant dans la transduction du signal et de la réponse transcriptomique à la chitine. Adapté de Espinoza *et al.*, 2017.

L'expression du gène codant l'annexine 1 est surexprimée en réponse à un traitement de type « *Pseudomonas* » (Figure III. 9 et Tableau A2.7 en Annexe 2). D'après notre réseau hypothétique d'interactions indirectes des transporteurs de sucres à rbohD (Figure III.12), nous avons observé qu'un unique transporteur, AtSWEET7 est en interaction avec l'annexine 1. Ces résultats suggèrent un rôle probable dans la régulation de l'adressage/recyclage de ce transporteur de sucres dans un contexte de défense/d'IPM.

Ces différentes protéines interactantes liées au trafic membranaire sont en adéquation avec le fait que l'adressage ainsi que le recyclage à la membrane plasmique de AtrbohD et des transporteurs de sucres se font *via* le système sécrétoire, faisant certainement intervenir des protéines de type SNARE, Annexine, Rab-GTPase et PRA1, qui contrôlent et régulent le trafic intracellulaire des protéines membranaires.

Il est à noter que chacun des 12 interactants de rbohD, interagit lui-même avec entre 1 et 22 transporteurs de sucres des différentes familles (Tableau A2.9 en Annexe 2). Ceci illustre l'importance de protéines telles que rbohD dans les réponses aux modifications de l'environnement. Et notamment, dans le cas présent, l'impact de rbohD sur les flux de sucres de la plante en réponse à la perception de microorganismes. Ces protéines

peuvent être proposées comme des carrefours de réponses (signalisation et/ou métabolisme) de la plante à son environnement.

VI. Conclusions

MIND représente un outil puissant pour identifier des réseaux métaboliques et de signalisation au travers une approche *in silico*. Nous avons ainsi identifié des protéines régulatrices putatives des transporteurs de sucres dans la base MIND. Celle-ci, regroupe à ce jour 12102 interactions soit entre protéines membranaires uniquement, soit entre protéines membranaires et protéines solubles, chez *A. thaliana*. Nous avons observé que sur un total de 79 transporteurs de sucres identifiés chez *A. thaliana*, 34 transporteurs de sucres possèdent au moins un interactant dans MIND.

Suite à l'étude de l'expression des gènes codant les 34 transporteurs de sucres dans différentes conditions de traitements, nous avons démontré l'existence de deux types de régulations différentes pour le(s) transporteur(s) de sucres en terme de stratégies de réponse utilisées par la plante en réponse aux modifications de l'environnement : (i) soit une réponse directe de l'activité du transporteur par une régulation transcriptionnelle de(s) transporteur(s) de sucres, soit (ii) une régulation métabolique plus complexe qui peut avoir lieu à l'échelle de la protéine, par la formation d'interactions protéiques. De plus, nous avons pu montrer qu'il n'y avait pas de corrélation entre la régulation transcriptionnelle des gènes codants les 34 transporteurs de sucres et leur nombre d'interactants.

A l'aide de la construction d'un réseau protéique, nous avons pu montrer que certains transporteurs de sucres forment des gros nœuds d'interactions et d'autres sont en interaction avec peu de protéines membranaires et/ou en périphérie des membranes. Nous avons pu identifier 296 protéines interagentes aux 34 transporteurs de sucres ayant des fonctions biologiques variées. Bien que de nombreuses protéines ne possèdent pas à ce jour de fonction biologique connue, nous avons pu observer qu'une grande proportion intervient dans le transport au sens large, ou dans les événements associés aux processus cellulaires, ou encore dans les processus liés aux stress biotiques et abiotiques. Notre étude s'est focalisée sur deux protéines putatives qui interviendraient dans la régulation des transporteurs de sucres par des IPP.

La première protéine est une protéine t-SNARE intervenant dans la régulation du trafic membranaire *via* la fusion des membranes. Elle est en interaction directe avec un nombre élevé de transporteurs de sucres des différentes familles. A l'inverse, le deuxième candidat sélectionné AtrbohD est l'un des acteurs clés dans la production de FAO et intervient également dans la signalisation lors de l'immunité, est en interaction avec un transporteur de sucres. Cependant AtrbohD partage des interactants avec des transporteurs de sucre ayant des fonctions biologiques variées, dont certaines interviendraient dans la régulation du trafic cellulaire (Rab5, PRA1.E et annexine 1).

Nous pouvons donc supposer que ces deux protéines interactantes, qui sont liées au trafic membranaire et impliquées dans la signalisation lors des contraintes de l'environnement, sont en adéquation avec le fait que l'adressage ainsi que le recyclage à la membrane plasmique des transporteurs de sucres peut se faire *via* le système sécrétoire, faisant certainement intervenir des protéines de type SNARE, Rab et PRA1.

Ces résultats prometteurs apportent des indices supplémentaires sur la régulation des transporteurs de sucres par le biais d'IPP, même si l'ensemble de ces analyses *in silico* est à considérer avec précaution et que les résultats les plus importants seront à confirmer par des expériences biologiques ciblées. L'outil MIND permet en effet d'émettre des questions biologiques qui pourront faire l'objet de travaux de recherche.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES
GÉNÉRALES

Dans leur environnement, les cellules végétales sont sans cesse soumises à des contraintes biotiques, et mettent en place des mécanismes cellulaires et moléculaires pour y répondre. Elles sont capables de percevoir et reconnaître des molécules microbiennes et d'établir une diversité de réponses, notamment par des relations trophiques différentes en fonction de la stratégie trophique des microorganismes en interaction. Le transport de sucre est un processus clé dans le devenir de l'interaction. Ce transport est gouverné par la présence de transporteurs membranaires qui peuvent être régulés, à différents niveaux, en fonction des stimuli extérieurs : niveaux transcriptionnel, traductionnel et/ou post-traductionnel. Ces régulations influencent leur activité, leur localisation cellulaire, leur dynamique membranaire ou encore leur(s) interaction(s) avec d'autres protéines. Malgré l'identification de certaines protéines responsables du transport de sucres aux interfaces biotrophes, les mécanismes par lesquels les microorganismes mutualistes et pathogènes interagissent avec la plante pour l'accès et l'utilisation des photosynthétats sont encore très mal connus.

Mes travaux de thèse, contribuant au décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant influencer le devenir des IPM, ont été développés sur un système simplifié correspondant à des suspensions cellulaires de la plante modèle *N. tabacum* cv. Xanthi. Ce système permet l'étude des cascades de signalisation et des mécanismes de défense suite à la perception de molécules microbiennes isolées. Il est couramment utilisé au laboratoire pour étudier l'impact d'éliciteurs, dont la cryptogéine. Des plants de tabac, correspondant à un système intégré complexe, sont également utilisés au laboratoire pour l'étude des interactions avec des microorganismes virulents ou avirulents, ainsi qu'avec des CMA lors d'interactions symbiotiques mutualistes. Cependant, les événements de signalisation dans les stades pré-symbiotiques de l'interaction avec un CMA et les mécanismes permettant d'atténuer/supprimer les défenses aboutissant à l'établissement de la symbiose MA doivent encore être déchiffrés. Les suspensions cellulaires de tabac ont représenté un bon outil pour aborder l'étude des voies de signalisation précoces induites suite à la perception des facteurs mycorhiziens (CO4 et LCO) en les comparant avec des événements de signalisation connus déclenchés par la cryptogéine (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Ces voies peuvent *in fine* réguler différemment les échanges de sucres suivant la perception des partenaires de l'interaction, mimée par les molécules microbiennes.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons mis en évidence que le CO4 déclenche de manière très transitoire des événements de signalisation tels une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, la production de FAO dépendante de la NADPH oxydase NtrbohD et une activité très précoce de MAPK. Toutefois, le CO4 n'influence pas le transport de sucres, dans les temps de cinétique analysés contrairement à la cryptogéine.

De plus, des lignées cellulaires Xanthi perturbées dans le trafic membranaire lié à la clathrine, préalablement générées au laboratoire, nous ont permis d'aborder l'influence de la dynamique membranaire dans les réponses des cellules à la cryptogéine. Nous avons observé des réponses de défense amoindries mettant en avant l'influence de processus liés à la clathrine dans certaines de ces réponses tels que la mort cellulaire, les flux de sucres et l'expression de transporteurs de sucres.

Enfin, au-delà de l'étude sur ce système simplifié de tabac en présence de molécules microbiennes, l'étude de l'interactome des transporteurs de sucres a permis de créer la première carte d'interaction de l'ensemble de ces derniers dans la plante modèle *A. thaliana*. Cette première étude nous a permis d'initier une méthodologie qui peut servir à l'étude d'une multitude d'interactions entre les transporteurs de sucres et des protéines de fonctions variées. Bien évidemment au vu du nombre d'interactions et des possibilités à exploiter un réseau protéique, ces travaux constituent la première pierre d'un travail affiné et plus poussé pour pouvoir identifier et caractériser des protéines régulatrices des transporteurs de sucres. Ce travail avait pour but d'identifier des protéines putatives qui réguleraient le transport/transporteurs de sucres *in planta*, et/ou lors des IPM. La sélection de deux protéines régulatrices (t-SNARE et AtrbohD) s'est faite selon la combinaison de l'analyse des données de transcriptomique en réponse aux stress biotiques et des données de l'interactome. Certaines de ces protéines interagissant des transporteurs de sucres que nous avons ciblées, sont notamment des protéines ayant un rôle dans le trafic membranaire (Rab, SNARE, PRA1, Annexine) et avec la signalisation (rbohD et Annexine). Cependant avant de pouvoir discuter du rôle biologique et ou de la fonction de ces protéines interagissant dans la régulation des transporteurs de sucres il sera nécessaire de vérifier si ces interactions sont réelles à l'aide d'une étude biologique ciblée, par exemple en utilisant le système mbSUS en levure. Si ces interactions s'avèrent positives en expression hétérologue, il faudra les tester en plante de tabac *in situ* (split-GFP, BiFC, co-immunoprécipitation) en réponse à des éliciteurs/pathogènes, afin de discriminer celles qui sont réelles de celles qui ne le sont pas. De plus, au sein de notre équipe, des recherches sur les interactants de NtrbohD ont été débutées par des expériences d'immunoprécipitation, avant et après élicitation à la cryptogéine. Ces recherches nous permettront d'aller vers une caractérisation de l'interactome de la protéine rbohD à l'aide d'une analyse plus ciblée chez le tabac.

Les réponses cellulaires au-delà de la reconnaissance des molécules microbiennes et de la signalisation associée dans les cellules de tabac

- Réponses des cellules Xanthi aux CO₄/LCO

Dans un premier temps, la caractérisation d'événements de signalisation induits en réponse au CO₄ nous a permis de montrer que les suspensions cellulaires indifférenciées de tabac perçoivent cette molécule. Toutefois, à part l'augmentation faible de l'expression de *NtSWEET2B*, des réponses trophiques associées à cette signalisation n'ont pas été observées. Cette étude a été menée durant une cinétique courte en comparaison avec le traitement des cellules à la cryptogéine car cet éliciteur déclenche une mort cellulaire importante. Il serait intéressant pour le traitement au CO₄ d'étudier d'autres réponses transcriptomiques ou en incluant des temps de cinétique plus longs, dans le but d'évaluer la modulation de l'expression de gènes « marqueurs » de la phase pré-symbiotique et/ou de la défense. Par exemple, le gène de défense *PR10* est induit en réponse à des éliciteurs et également des molécules symbiotiques. Il a été montré comme induit en réponse à des GSE de *G. margarita* après 1 h de traitement sur des racines de lotier (Giovannetti *et al.*, 2015). Le gène *PR10* est également surexprimé entre 30 min et 4 h de traitement à la cryptogéine (Adam *et al.*, 2012). Dans la même étude, Giovannetti et collaborateurs (2015) ont montré que le gène codant ERF19

(ethylene-responsive factor 19), un facteur de transcription lié à la défense, est également rapidement surexprimé dans des racines de lotier après 1 h de traitement avec un autre CO court (CO5). ERF19 a été montré comme étant la cible de l'effecteur SP7 sécrété par *R. irregularis* permettant de bloquer ainsi les réponses de défense et permettre la colonisation du CMA (Kloppholz *et al.*, 2011). Concernant les gènes « marqueurs » essentiels à la symbiose MA nous pourrions étudier l'expression de gènes ciblant certains composants de la CSSP impliqués dans la transduction des signaux suite à la perception des facteurs mycorhiziens tels que les gènes *DMI* ainsi que des gènes qui sont impliqués dans la pénétration du CMA dans les racines et la formation d'arbuscules, comme la vapyrine (Pumplin *et al.*, 2010). Un gène codant la vapyrine chez le lotier (*LjVap-a*) est augmenté dans les racines après 1 h de traitement avec le CO5 et/ou des GSE (Giovannetti *et al.*, 2015). Ces résultats pourraient apporter des arguments supplémentaires aux réponses « spécifiques » du CO4, observées en suspension cellulaire ainsi que de la modulation du système de défense pour permettre la mise en place des étapes de colonisation.

En ce qui concerne la réponse des cellules de tabac au deuxième type de molécule sécrétée par les CMA, les LCO, connus pour stimuler la mycorhization ainsi que le développement de racines latérales de plantes légumineuses et non légumineuses (Maillet *et al.*, 2011), nous ne pouvons pas conclure quant à l'impact réel de ces molécules, car des traces de CO courts ont été trouvés dans certains lots. Afin de pouvoir nous avancer sur la perception ou non des cellules à ces molécules, des mesures de variations de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et/ou des mesures d' H_2O_2 avec des lots en LCO sans trace de CO courts pourraient être envisagées, en testant une gamme de concentration en LCO plus large.

- Mieux comprendre l'impact de la perturbation de l'endocytose dans les lignées Hub

Nous avons étudié l'implication du trafic membranaire lié à la clathrine sur les réponses cellulaires engendrées suite à la perception de la cryptogéine. La caractérisation des cellules Xanthi vis-à-vis de l'endocytose a montré pour la première fois que la cryptogéine induit une endocytose chez ces cellules, comme initialement montré chez les cellules de tabac cv. BY-2 (Leborgne-Castel *et al.*, 2008). Nous avons utilisé deux lignées cellulaires exprimant la partie C-terminale de la CHC (Hub) dont nous avons démontré une perturbation dans l'endocytose induite par la cryptogéine. Ce qui en fait un bon outil pour appréhender l'effet de la dynamique membranaire liée à la clathrine.

Alors que certains composants de la signalisation précoce déclenchée par la cryptogéine, ne sont pas impactés, les cellules Hub présentent un taux plus faible de mort cellulaire que les cellules sauvages. Cette diminution du taux de mort cellulaire semble suggérer des réponses de défense altérées, qui pourraient être engendrées à différents niveaux. Au niveau de la membrane plasmique, même si la perception de la cryptogéine semble efficace (*via* un déclenchement d'événements de signalisation précoces tels que la production d' H_2O_2 et l'alcalinisation du milieu extracellulaire), une endocytose du récepteur de la cryptogéine pourrait être nécessaire au déclenchement de réponses cellulaires en aval. Ce concept de signalisation endosomale a été suggéré pour le couple flg22-FLS2 chez *Arabidopsis* (Beck *et al.*, 2012) ou

pour le récepteur LeEIX chez la tomate, qui doit être internalisé après fixation à son ligand afin de déclencher la mise en place de la HR (Ron and Avni, 2004; Bar and Avni, 2009). Des expériences menées au laboratoire sur le devenir de la cryptogéine (pouvant refléter le récepteur) montrent qu'elle s'internalise dans les cellules de tabac BY-2, mais ces analyses n'ont pas permis de déterminer l'identité de la voie d'internalisation de l'éliciteur (Lherminier et collaborateurs, en préparation). L'identification du récepteur nous permettrait d'envisager d'étudier son comportement spatio-temporel en présence de cryptogéine et les réponses de la cellule. Un récepteur à la famille des élicitines dont la cryptogéine fait partie, a été récemment identifié chez la pomme de terre sauvage (Du *et al.*, 2015). Des travaux de clonage de l'orthologue chez le tabac de ce gène du récepteur de la cryptogéine sont actuellement en cours au sein de notre équipe.

D'autres pistes permettant d'expliquer la diminution de la mort cellulaire induite par la cryptogéine dans les lignées Hub ont été initiées par l'analyse d'évènements cellulaires en lien direct à la mort cellulaire et/ou la défense. Une activation de MAPK soutenue dans le temps a été proposée comme nécessaire à la mise en place de la mort cellulaire (Dahan *et al.*, 2009). Chez les deux lignées cellulaires Hub, l'activation de deux MAPK, NtSIPK et NtWIPK a également été mise en évidence. Par rapport aux cellules sauvages, nous avons observé une activation plus précoce de ces MAPK chez les cellules Hub. Contrairement aux cellules traitées avec le CO₄ où les 2 MAPK sont activées très rapidement et transitoirement, chez les cellules Hub traitées à la cryptogéine, cette activation rapide perdure dans le temps. Comme suggéré dans la discussion du chapitre 2, les travaux de Müller et collaborateurs (2009) montrent que la protéine kinase AtMPK6 (orthologue à NtSIPK) est à la fois localisée dans le cytosol, au TGN et à la membrane plasmique, et co-localise avec la CLC dans ces compartiments. Quant à savoir si un changement de localisation cytosolique *versus* membranaire des MAPK, dû à l'expression du domaine Hub, pourrait influencer leur activation et la mort cellulaire, la question reste posée. Afin de tester cette hypothèse, une analyse de l'abondance et de l'activation des MAPK, sur des fractions isolées cytosoliques et membranaires, pourrait être effectuée dans les lignées Hub en comparaison avec les cellules sauvages.

De même, des liens ont été suggérés entre une activité nucléaire de NtSIPK et l'établissement de la mort cellulaire chez le tabac élicité par la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009). En effet, l'activité de SIPK est également retrouvée dans le noyau en réponse à la cryptogéine, soit *via* une activation dans le noyau d'un « pool » de SIPK, ou soit par une translocation d'un pool de SIPK activé du cytoplasme vers le noyau. Cette activité est fortement corrélée à l'induction de la mort cellulaire par l'éliciteur (Dahan *et al.*, 2009). De plus, Bourque et collaborateurs en (2011) ont proposé un rôle de régulateur négatif des protéines HD2 de la mort cellulaire induite par la cryptogéine (Bourque *et al.*, 2011). Ces auteurs ont postulé que l'intensité de la mort cellulaire dépendrait de l'action d'un « interrupteur ON/OFF » (l'activité SIPK nucléaire) et d'un variateur (les HD2a/b). Donc dans le cas présent, nous avons observé de la mort cellulaire dans les lignées Hub, traduisant la présence d'une SIPK activée dans le noyau. Par contre comme la mort est moins intense que dans la lignée Xanthi, nous devrions avoir un module HD2 "moins activé". Par exemple dans les lignées Hub nous pourrions nous attendre à ce qu'il y ait soit une dégradation moins importante des HD2a/b en réponse à

la cryptogéine, soit une dégradation moins rapide. Il serait intéressant d'analyser par immuno-détection avec des anticorps disponibles au laboratoire (Bourque *et al.*, 2011) l'abondance nucléaire des protéines HD2a/b dans les lignées cellulaires Hub en réponse ou non à la cryptogéine.

Transfert des connaissances apportées lors des travaux de thèse vers la plante entière

A l'échelle cellulaire, nous avons observé que les défenses et les flux de sucres semblent être modifiés dans les cellules Hub en suspension liquide. Ces suspensions cellulaires proviennent de plantes exprimant le domaine Hub, disponibles au laboratoire. Ces plantes pourraient être utilisées pour analyser l'effet de cette perturbation du trafic membranaire sur la mise en place d'une interaction mutualiste avec un CMA (*R. irregularis*). Une expérience préliminaire menée lors du stage de Master 2 de M. Forges (2015), a montré que l'expression du domaine Hub impactait négativement l'établissement de la symbiose MA, et la mise en place des arbuscules. L'absence d'arbuscules dans les racines des lignées Hub permet d'émettre l'hypothèse d'une réduction forte, voir totale, des échanges de nutriments entre les deux partenaires, du moins dans les temps observés, et que le trafic membranaire lié à la clathrine serait crucial à la mise en place de la MA. Cette hypothèse est en accord avec des travaux montrant que la pré-pénétration des CMA, ainsi que la biogenèse de l'interface symbiotique sont associées à une intense extension par synthèse *de novo* de la membrane plasmique où des marqueurs tels que la clathrine sont accumulés (Genre and Bonfante, 1999; Genre *et al.*, 2012) ; soulignant ainsi l'implication de la clathrine dans la mise en place de la MA. De même, des lotiers, exprimant le domaine Hub, en interaction mutualiste avec des rhizobactéries ont montré une inhibition de l'expression de gènes précoces de la nodulation, impactant ainsi la nodulation racinaire et la symbiose mutualiste (Wang *et al.*, 2015). Ces résultats concordants avec nos résultats permettent d'envisager un effet global du trafic membranaire lié à la clathrine dans la mise en place de la MA, effet qui sera à confirmer par des répétitions biologiques futures. De plus, il serait intéressant de relier cette observation à nos résultats sur culture cellulaire où l'entrée de glucose et de saccharose est moins efficace dans les 2 lignées Hub. Ainsi, s'il s'avère que les flux de sucres sont perturbés dans les cellules racinaires de plantes Hub, cela pourrait refléter un dérèglement plus global des échanges de nutriments exemplifiés par l'export de sucres vers le CMA, qui compromettrait la mise en place de la symbiose.

Il serait intéressant d'analyser les flux de sucres à l'échelle de la plante entière. Cela a été initié lors de ma thèse par l'utilisation de senseurs de sucres fluorescents développés par l'équipe de W. Frommer (Université de Düsseldorf, Cologne). Différents senseurs de glucose et de saccharose, ayant des affinités variées pour ces sucres (<https://dpb.carnegiescience.edu/labs/frommer-lab/nanosensors>) sont disponibles au laboratoire. Les flux de sucres sont déterminés par mesures de FRET entre une CFP et une YFP fusionnées respectivement en N- et C-terminales du senseur (Deuschle *et al.*, 2005). Au cours de ma thèse nous avons généré des lignées Xanthi et Hub stables exprimant des senseurs de saccharose qui sont en cours d'analyse. Ces plants exprimant les senseurs nous permettraient d'analyser les flux de glucose et de saccharose dans des racines de tabac Xanthi soumises soit aux molécules microbiennes, testés en système simplifié au cours de ma thèse, soit en réponse à des CMA (par exemple *R. irregularis*), ou encore à des microorganismes pathogènes avirulents

(par exemple *P. cryptogea*) ou virulents (comme *P. parasitica*) afin d'avoir une vision globale des modifications de flux des deux sucres dans différents cas d'IPM. De plus, l'utilisation des senseurs de sucres dans les lignées Hub en comparaison avec la lignée Xanthi nous permettrait de déterminer si le trafic membranaire intervient dans la régulation des flux au niveau tissulaire et de la plante entière en présence ou non des divers microorganismes.

Sélection de transporteurs de sucres candidats pour l'étude de leurs régulations à l'échelle de la protéine

L'identification de partenaires protéiques d'interaction des transporteurs de sucres est fondamentale pour la compréhension des processus cellulaires et physiologiques dans lesquels ils sont impliqués, au sein d'une cellule ou de l'organisme entier. Les transporteurs de sucres sont des protéines membranaires essentielles de l'allocation des ressources carbonées *in planta* et également pour les échanges de nutriments au cours des IPM. Les interactions protéiques peuvent jouer un rôle majeur dans la régulation post-traductionnelle des transporteurs de sucres en affectant leur capacité de transport, leur oligomérisation, leur localisation cellulaire et également leur trafic cellulaire (adressage, recyclage et/ou dégradation).

La combinaison des informations apportées par les données transcriptomiques des gènes codant les transporteurs de sucres dans une contrainte biotique, couplées aux données apportées par le réseau d'interactions, nous a permis d'identifier une liste de 8 gènes codant les transporteurs de sucres les plus surexprimés en réponse aux stress biotiques chez *A. thaliana*.

Parmi ces 8 gènes, deux protéines candidates SUC2 (*SUT1*) et SWEET2, pourraient être sélectionnés afin d'étudier leur régulation spatiotemporelle et par IPP chez le tabac. En effet, le gène *AtSUC2* est surexprimé d'après les données de transcriptomique, et son orthologue chez le tabac *NtSUT1-2* est également induit en réponse à la cryptogéine. De plus, d'après notre interactome des transporteurs de sucres réalisé, *AtSUC2* interagit directement avec les protéines t-SNARE et Rab5 (qui interagit directement avec *AtrbohD*), qui sont deux protéines impliquées dans la fusion membranaire des vésicules du trafic. De plus, le transporteur *SUT1* de la pomme de terre a été montré comme étant régulé par dynamique membranaire, et forme également des IPP (Krügel *et al.*, 2008; Liesche *et al.*, 2010; Krügel *et al.*, 2012). Il serait intéressant de cloner *NtSUT1-2* et de le fusionner avec le gène codant la GFP (ou un variant) sous la dépendance de son promoteur natif. Exprimé chez le tabac, ce gène de fusion permettra d'analyser par microscopie la localisation et la dynamique membranaire de la protéine étiquetée *in vivo* en absence et en présence de molécules microbiennes. Son expression dans les cellules et/ou les plantes Hub pourra nous renseigner sur la dynamique membranaire spatiotemporelle des transporteurs dans la gouvernance d'une réponse de type défense/mutualiste. De plus, ces fusions permettent d'envisager grâce à l'étiquette GFP une co-immuno-précipitation de *NtSUT1-1* et de ses interactants suivie par de la spectrométrie de masse pour leur identification suite à l'application ou non d'un stress donné sur les cellules.

Le même travail pourrait être réalisé avec le candidat *SWEET2*, dont la localisation protéique chez *Arabidopsis* est tonoplastique. Outre son implication dans les interactions plante/agent pathogène et plante/CMA (Chen *et al.*, 2015; Manck-Götzenberger and Requena, 2016), il a été montré comme étant régulé

dans nos analyses transcriptomiques chez *Arabidopsis* mais également en réponse au CO₄ et à la cryptogéine chez le tabac. Ce transporteur serait également capable de former des IPP (Xuan *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2015) et dans notre réseau il a été retrouvé en interaction avec des protéines régulatrices du trafic membranaire.

En conclusion, l'ensemble des travaux, sur différents axes, menés lors de ma thèse ont permis de jalonner ces futures pistes à court, moyen et long terme pour envisager une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au fonctionnement des IPM, notamment les relations trophiques pouvant déterminer le devenir de l'interaction.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, T. (2012) Etude de l'implication de l'endocytose à clathrine dans les réactions de défense déclenchées par la cryptogéine chez le tabac. <http://prodinra.inra.fr/record/178012>.
- Adam, T., Bouhidel, K., Der, C., Robert, F., Najid, A., Simon-Plas, F., and Leborgne-Castel, N. (2012) Constitutive expression of clathrin hub hinders elicitor-induced clathrin-mediated endocytosis and defense gene expression in plant cells. *FEBS Lett* **586**: 3293–3298.
- Akashi, R., Kawano, T., Hashiguchi, M., Kutsuna, Y., Hoffmann-Tsay, S.-S., and Hoffmann, F. (2003) Super roots in *Lotus corniculatus*: A unique tissue culture and regeneration system in a legume species. *Plant Soil* **255**: 27–33.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–827.
- Al-Karaki, G.N. (2000) Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* **10**: 51–54.
- Allen, D., Blinks, and Prendergast, F. (1977) Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration—a calcium-independent component. *Science* **195**: 996–998.
- Alvim Kamei, C.L., Boruc, J., Vandepoele, K., Van den Daele, H., Maes, S., Russinova, E., *et al.* (2008) The PRA1 Gene Family in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **147**: 1735–1749.
- Amor, B.B., Shaw, S.L., Oldroyd, G.E.D., Maillet, F., Penmetsa, R.V., Cook, D., *et al.* (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J Cell Mol Biol* **34**: 495–506.
- Ané, J.-M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ayax, C., *et al.* (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**: 1364–1367.
- Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F., and Yang, B. (2010) Rice xa13 Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene *Os-11N3*. *PLANT CELL ONLINE* **22**: 3864–3876.
- Aoki, N., Hirose, T., and Furbank, R.T. (2012) Sucrose Transport in Higher Plants: From Source to Sink. In *Photosynthesis*. Eaton-Rye, J.J., Tripathy, B.C., and Sharkey, T.D. (eds). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 703–729 http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-1579-0_28. Accessed October 10, 2017.
- Aoki, N., Hirose, T., Scofield, G.N., Whitfield, P.R., and Furbank, R.T. (2003) The Sucrose Transporter Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol* **44**: 223–232.
- Aroca, R., Porcel, R., and Ruiz-Lozano, J.M. (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytol* **173**: 808–816.
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., and Quinto, C. (2013) PvRbohB negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol* **54**: 1391–1402.
- Azevedo, H. (2005) The Non-host Pathogen *Botrytis cinerea* Enhances Glucose Transport in *Pinus pinaster* Suspension-cultured Cells. *Plant Cell Physiol* **47**: 290–298.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., and Shachar-Hill, Y. (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* **124**: 949–958.

- Baier, M.C., Keck, M., Godde, V., Niehaus, K., Kuster, H., and Hohnjec, N. (2010) Knockdown of the Symbiotic Sucrose Synthase MtSUC1 Affects Arbuscule Maturation and Maintenance in Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *PLANT Physiol* **152**: 1000–1014.
- Bar, M., and Avni, A. (2009) EHD2 inhibits ligand-induced endocytosis and signaling of the leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2. *Plant J Cell Mol Biol* **59**: 600–611.
- Barker, L., Kühn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., *et al.* (2000) SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell* **12**: 1153–1164.
- Barth, I., Meyer, S., and Sauer, N. (2003) PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* **15**: 1375–1385.
- Bartsev, A.V., Deakin, W.J., Boukli, N.M., McAlvin, C.B., Stacey, G., Malnoë, P., *et al.* (2004) NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol* **134**: 871–879.
- Bassham, D.C., and Blatt, M.R. (2008) SNAREs: Cogs and Coordinators in Signaling and Development. *PLANT Physiol* **147**: 1504–1515.
- Bastian, M., Heymann, S., and Jacomy, M. (2009) Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. In *Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media*. <https://www.aaai.org/ocs/index.php/ICWSM/09/paper/view/154>. Accessed August 17, 2017.
- Baxter, A., Mittler, R., and Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–1240.
- Bécard, G., Kosuta, S., Tamasloukht, M., Séjalon-Delmas, N., and Roux, C. (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* **82**: 1186–1197.
- Bécard, G., and Piché, Y. (1989) Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2320–2325.
- Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D., and Robatzek, S. (2012) Spatio-Temporal Cellular Dynamics of the *Arabidopsis* Flagellin Receptor Reveal Activation Status-Dependent Endosomal Sorting. *Plant Cell* **24**: 4205–4219.
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., and Lanfranco, L. (2016) The *Medicago truncatula* MtRbohE gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta* **243**: 251–262.
- Besserer, A., Bécard, G., Roux, C., and Séjalon-Delmas, N. (2009) Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signal Behav* **4**: 75–77.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., *et al.* (2006) Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biol* **4**: e226.
- Biemelt, S., and Sonnewald, U. (2006) Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J Plant Physiol* **163**: 307–318.
- Binet, M.-N., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M., and Pugin, A. (2001) Disruption of Microtubular Cytoskeleton Induced by Cryptogein, an Elicitor of Hypersensitive Response in Tobacco Cells. *Plant Physiol* **125**: 564–572.
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., and Kühn, C. (2014) The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J* **78**: 877–889.

- Blein, J.-P., Milat, M.-L., and Ricci, P. (1991) Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *PLANT Physiol* **95**: 486–491.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001) Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **14**: 695–700.
- Boller, T., and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379–406.
- Bolouri Moghaddam, M.R., and Ende, W. Van den (2013) Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J Exp Bot* **64**: 1439–1449.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* **214**: 159–173.
- Bolton, M.D. (2009) Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 487–497.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* **1**: 1–11.
- Bonneau, L., Huguet, S., Wipf, D., Pauly, N., and Truong, H.-N. (2013) Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol* **199**: 188–202.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.-P., and Ricci, P. (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol* **102**: 181–192.
- Boucher, V., Buitink, J., Lin, X., Boudet, J., Hoekstra, F.A., Hundertmark, M., *et al.* (2010) MtPM25 is an atypical hydrophobic late embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant Cell Environ* **33**: 418–430.
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., *et al.* (2011) Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol* **192**: 127–139.
- Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S., and Pugin, A. (2002) The Elicitor Cryptogein Blocks Glucose Transport in Tobacco Cells. *Plant Physiol* **130**: 2177–2187.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21–30.
- Braun, D.M., and Slewinski, T.L. (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiol* **149**: 71–81.
- Brewer, P.B., Koltai, H., and Beveridge, C.A. (2013) Diverse roles of strigolactones in plant development. *Mol Plant* **6**: 18–28.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 9452–9457.

- Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Bécard, G. (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **13**: 693–698.
- Buendia, L., Wang, T., Girardin, A., and Lefebvre, B. (2016) The LysM receptor-like kinase SiLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytol* **210**: 184–195.
- Bürkle, L., Hibberd, J.M., Quick, W.P., Kühn, C., Hirner, B., and Frommer, W.B. (1998) The H⁺-Sucrose Cotransporter NtSUT1 Is Essential for Sugar Export from Tobacco Leaves. *Plant Physiol* **118**: 59–68.
- Büttner, M. (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett* **581**: 2318–2324.
- Campos-Soriano, L., García-Martínez, J., and San Segundo, B. (2012) The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol Plant Pathol* **13**: 579–592.
- Camps, C., Jardinaud, M.-F., Rengel, D., Carrère, S., Hervé, C., Debelle, F., *et al.* (2015) Combined genetic and transcriptomic analysis reveals three major signalling pathways activated by Myc-LCOs in *Medicago truncatula*. *New Phytol* **208**: 224–240.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., and Stacey, G. (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* **3** <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.03766>. Accessed July 13, 2016.
- Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., *et al.* (2011) Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14348–14353.
- Carotenuto, G., Chabaud, M., Miyata, K., Capozzi, M., Takeda, N., Kaku, H., *et al.* (2017) The rice LysM receptor-like kinase *Os CERK1* is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling. *New Phytol* **214**: 1440–1446.
- Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., and Hedrich, R. (2005) Phloem-localized, Proton-coupled Sucrose Carrier ZmSUT1 Mediates Sucrose Efflux under the Control of the Sucrose Gradient and the Proton Motive Force. *J Biol Chem* **280**: 21437–21443.
- Carpaneto, A., Koepsell, H., Bamberg, E., Hedrich, R., and Geiger, D. (2010) Sucrose- and H⁺-Dependent Charge Movements Associated with the Gating of Sucrose Transporter ZmSUT1. *PLoS ONE* **5**: e12605.
- Casieri, L., Ait Lahmidi, N., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., *et al.* (2013) Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza* **23**: 597–625.
- Catoira, R., Galera, C., Billy, F. de, Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., *et al.* (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647–1666.
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B.J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., *et al.* (2011) Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytol* **189**: 347–355.
- Chabaud, M., Venard, C., Defaux-Petras, A., Bécard, G., and Barker, D.G. (2002) Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **156**: 265–273.
- Chandler, M.T., Marsac, N.T. de, and Kouchkovsky, Y. de (1972) Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Can J Bot* **50**: 2265–2270.

- Chaparro-Garcia, A., Wilkinson, R.C., Gimenez-Ibanez, S., Findlay, K., Coffey, M.D., Zipfel, C., *et al.* (2011) The Receptor-Like Kinase SERK3/BAK1 Is Required for Basal Resistance against the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* **6**: e16608.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P.A.W., Spinner, L., Clement, G., *et al.* (2013) Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **23**: 697–702.
- Charpentier, M., Sun, J., Vaz Martins, T., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., *et al.* (2016) Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352**: 1102–1105.
- Chen, H.-Y., Huh, J.-H., Yu, Y.-C., Ho, L.-H., Chen, L.-Q., Tholl, D., *et al.* (2015) The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *Plant J* **83**: 1046–1058.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., *et al.* (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.
- Chen, L.-Q., Lin, I.W., Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, H.E., Londoño, A., *et al.* (2015) A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the *Arabidopsis* Embryo. *Plant Cell* **27**: 607–619.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., and Frommer, W.B. (2012) Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* **335**: 207–211.
- Chen, X., Irani, N.G., and Friml, J. (2011) Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 674–682.
- Chi, W.-T., Fung, R.W.M., Liu, H.-C., Hsu, C.-C., and Charng, Y.-Y. (2009) Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **32**: 917–927.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., *et al.* (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Chincinska, I., Gier, K., Krügel, U., Liesche, J., He, H., Grimm, B., *et al.* (2013) Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Front Plant Sci* **4** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00026/abstract>. Accessed May 29, 2017.
- Chincinska, I.A., Liesche, J., Krügel, U., Michalska, J., Geigenberger, P., Grimm, B., and Kühn, C. (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol* **146**: 515–528.
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., and Mestre, P. (2014) The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J Exp Bot* **65**: 6589–6601.
- Clark, G., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., and Roux, S. (2010) Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses? *Plant Signal Behav* **5**: 303–307.
- Cohn, M., Bart, R.S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., *et al.* (2014) *Xanthomonas axonopodis* Virulence Is Promoted by a Transcription Activator-Like Effector-Mediated Induction of a SWEET Sugar Transporter in Cassava. *Mol Plant Microbe Interact* **27**: 1186–1198.
- Colcombet, J., and Hirt, H. (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* **413**: 217–226.

- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., *et al.* (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1–22.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E., and Egley, G.H. (1966) Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**: 1189–1190.
- Cusick, M.E., Klitgord, N., Vidal, M., and Hill, D.E. (2005) Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet* **14**: R171–R181.
- Czaja, L.F., Hogekamp, C., Lamm, P., Maillet, F., Martinez, E.A., Samain, E., *et al.* (2012) Transcriptional Responses toward Diffusible Signals from Symbiotic Microbes Reveal MtNFP- and MtDMI3-Dependent Reprogramming of Host Gene Expression by Arbuscular Mycorrhizal Fungal Lipochitoooligosaccharides. *PLANT Physiol* **159**: 1671–1685.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., and Bourque, S. (2009) Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogin, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem J* **418**: 191–200.
- De Bary, A. (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. Verlag von Karl J. Trübner, Strassburg, Strassburg.
- De Las Rivas, J., and Fontanillo, C. (2010) Protein–Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLoS Comput Biol* **6**: e1000807.
- Delaux, P.-M., Bécard, G., and Combier, J.-P. (2013) NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytol* **199**: 59–65.
- Deuschle, K., Okumoto, S., Fehr, M., Looger, L.L., Kozhukh, L., and Frommer, W.B. (2005) Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Sci* **14**: 2304–2314.
- DeYoung, B.J., and Innes, R.W. (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* **7**: 1243–1249.
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., and Wipf, D. (2012a) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci* **17**: 413–422.
- Doidy, J., Tuinen, D. van, Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., and Wipf, D. (2012b) The *Medicago truncatula* Sucrose Transporter Family: Characterization and Implication of Key Members in Carbon Partitioning towards Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mol Plant* **5**: 1346–1358.
- Doorn, W.G. van, Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., *et al.* (2011) Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* **18**: 1241–1246.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L.C.P., Zhou, J., *et al.* (2015) Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat Plants* **1**: 15034.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004) SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185–209.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., and Roitsch, T. (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* **9**: 1825–1841.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., and Kiss, G.B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966.

- Engel, M.L. (2005) Green Sperm. Identification of Male Gamete Promoters in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **138**: 2124–2133.
- Eom, J.-S., Cho, J.-I., Reinders, A., Lee, S.-W., Yoo, Y., Tuan, P.Q., *et al.* (2011) Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiol* **157**: 109–119.
- Espinoza, C., Liang, Y., and Stacey, G. (2017) Chitin receptor CERK1 links salt stress and chitin-triggered innate immunity in Arabidopsis. *Plant J* **89**: 984–995.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J Cell Mol Biol* **18**: 265–276.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J* **4**: 307–316.
- Feng, L., and Frommer, W.B. (2015) Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends Biochem Sci* **40**: 480–486.
- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and Lorenzo, G.D. (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front Plant Sci* **4**: 49.
- Fester, T., and Hause, G. (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* **15**: 373–379.
- Fliegmann, J., Canova, S., Lachaud, C., Uhlenbroich, S., Gascioli, V., Pichereaux, C., *et al.* (2013) Lipochitooligosaccharidic symbiotic signals are recognized by LysM receptor-like kinase LYR3 in the legume *Medicago truncatula*. *ACS Chem Biol* **8**: 1900–1906.
- Fliegmann, J., Jauneau, A., Pichereaux, C., Rosenberg, C., Gascioli, V., Timmers, A.C.J., *et al.* (2016) LYR3, a high-affinity LCO-binding protein of *Medicago truncatula*, interacts with LYK3, a key symbiotic receptor. *FEBS Lett* **590**: 1477–1487.
- Flor, H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **653–669**.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M.J., Pittman, J.K., Marvier, A.C., Buchanan, A.J., Sauer, N., *et al.* (2003) The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* **132**: 821–829.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2008) The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea*. *PLANT Physiol* **148**: 1695–1706.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., *et al.* (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **19**: 711–724.
- García-Rodríguez, S., Azcón-Aguilar, C., and Ferrol, N. (2007) Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Physiol Plant* **129**: 737–746.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M.A., Dillewijn, P. van, Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., *et al.* (2013) Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil: Biodiversity in adjacent niches. *Microb Biotechnol* **6**: 36–44.
- Gauthier, A., Lamotte, O., Rebutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2007) Cryptogein-Induced Anion Effluxes. *Plant Signal Behav* **2**: 86–95.

- Geigenberger, P., Kolbe, A., and Tiessen, A. (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot* **56**: 1469–1479.
- Geiger, D. (2011) Plant Sucrose Transporters from a Biophysical Point of View. *Mol Plant* **4**: 395–406.
- Geisler-Lee, J., O’Toole, N., Ammar, R., Provart, N.J., Millar, A.H., and Geisler, M. (2007) A Predicted Interactome for Arabidopsis. *PLANT Physiol* **145**: 317–329.
- Genre, A., and Bonfante, P. (1999) Cytoskeleton-related proteins in tobacco mycorrhizal cells: gamma-tubulin and clathrin localisation. *Eur J Histochem* **43**: 105–111.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., *et al.* (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* **198**: 190–202.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G., and Bonfante, P. (2008) Prepenetration Apparatus Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 1407–1420.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., and Barker, D.G. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**: 3489–3499.
- Genre, A., Ivanov, S., Fendrych, M., Faccio, A., Zarsky, V., Bisseling, T., and Bonfante, P. (2012) Multiple Exocytotic Markers Accumulate at the Sites of Perifungal Membrane Biogenesis in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Cell Physiol* **53**: 244–255.
- Gianinazzi, S., Golotte, A., Binet, M.-N., Tuinen, D. van, Redecker, D., and Wipf, D. (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* **20**: 519–530.
- Giovannetti, M., Mari, A., Novero, M., and Bonfante, P. (2015) Early *Lotus japonicus* root transcriptomic responses to symbiotic and pathogenic fungal exudates. *Front Plant Sci* **6** <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00480/abstract>. Accessed June 14, 2017.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S., and Logi, C. (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol* **125**: 587–593.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A.S., and Avio, L. (1996) Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **133**: 65–71.
- Glomset, J.A., and Farnsworth, C.C. (1994) Role of Protein Modification Reactions in Programming Interactions Between Ras-Related GTPases and Cell Membranes. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 181–205.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernié, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., *et al.* (2012) A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol CB* **22**: 2236–2241.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251–256.
- Gomez-Roldan, V., Feras, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.-P., *et al.* (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., and Stacey, G. (2015) Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* **20**: 186–194.
- Goyal, K., Walton, L.J., and Tunnacliffe, A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* **388**: 151–157.

- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., *et al.* (2010) NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* **22**: 2509–2526.
- Guo, W.-J., Nagy, R., Chen, H.-Y., Pfrunder, S., Yu, Y.-C., Santelia, D., *et al.* (2014) SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast of Arabidopsis Roots and Leaves. *PLANT Physiol* **164**: 777–789.
- Gutjahr, C., and Parniske, M. (2013) Cell and Developmental Biology of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 593–617.
- Hackel, A., Schauer, N., Carrari, F., Fernie, A.R., Grimm, B., and Kühn, C. (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J Cell Mol Biol* **45**: 180–192.
- Hagberg, A.A., Schult, D.A., and Swart, P.J. (2008) Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. In *Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy2008)*. Gael Varoquaux, Travis Vaught, and Jarrod Millman, Pasadena, CA USA. pp. 11–15.
- Hall, J.L., and Williams, L.E. (2000) Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Funct Plant Biol* **27**: 549.
- Hammerschmidt, R. (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol* **37**: 285–306.
- Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., *et al.* (2014) Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1729–1745.
- Hao, Z., Fayolle, L., Tuinen, D. van, Chatagnier, O., Li, X., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2012) Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. *J Exp Bot* **63**: 3657–3672.
- Harrison, M.J. (1996) A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J Cell Mol Biol* **9**: 491–503.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., *et al.* (2014) Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc Natl Acad Sci* **111**: E404–E413.
- Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321–334.
- Heijden, M.G.A. van der, Bardgett, R.D., and Straalen, N.M. van (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* **11**: 296–310.
- Hendrix, J.W. (1970) Sterols in Growth and Reproduction of Fungi. *Annu Rev Phytopathol* **8**: 111–130.
- Hildebrandt, U., Janetta, K., and Bothe, H. (2002) Towards Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Independent of a Plant Host. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1919–1924.
- Ho, L.C. (1988) Metabolism and Compartmentation of Imported Sugars in Sink Organs in Relation to Sink Strength. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 355–378.
- Hohnjec, N., Perlick, A.M., Pühler, A., and Küster, H. (2003) The *Medicago truncatula* Sucrose Synthase Gene *MtSucS1* Is Activated Both in the Infected Region of Root Nodules and in the Cortex of Roots Colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 903–915.
- Hong, W. (2005) SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1744**: 120–144.

- Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W.B., *et al.* (2014) Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proc Natl Acad Sci* **111**: E521–E529.
- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 101–127.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., *et al.* (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**: 527–531.
- Jin, Y., Liu, H., Luo, D., Yu, N., Dong, W., Wang, C., *et al.* (2016) DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat Commun* **7**: ncomms12433.
- Jones, A.M., Xuan, Y., Xu, M., Wang, R.-S., Ho, C.-H., Lalonde, S., *et al.* (2014) Border Control-A Membrane-Linked Interactome of Arabidopsis. *Science* **344**: 711–716.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jones, K.H., and Senft, J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* **33**: 77–79.
- Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., Billy, F. de, Pichon, M., Dedieu, A., *et al.* (2001) *Medicago truncatula* *ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **14**: 737–748.
- Julius, B.T., Leach, K.A., Tran, T.M., Mertz, R.A., and Braun, D.M. (2017) Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant Cell Physiol* **58**: 1442–1460.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., *et al.* (2014) Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Mol Cell* **54**: 43–55.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, Y., Ohno, R., Higashi, K., *et al.* (2005) Cell Cycle Dependence of Elicitor-induced Signal Transduction in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol* **46**: 156–165.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., *et al.* (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**: 1786–1789.
- Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem* **183**: 139–143.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., *et al.* (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 359–364.
- Kevei, Z., Lougnon, G., Mergaert, P., Horváth, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., *et al.* (2007) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **19**: 3974–3989.
- Kiirika, L.M., Schmitz, U., and Colditz, F. (2014) The alternative *Medicago truncatula* defense proteome of ROS-defective transgenic roots during early microbial infection. *Front Plant Sci* **5** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00341/abstract>. Accessed June 14, 2017.
- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., *et al.* (2005) Seven *Lotus japonicus* Genes Required for Transcriptional Reprogramming of the Root during Fungal and Bacterial Symbiosis. *Plant Cell* **17**: 2217–2229.

- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., and Friml, J. (2011) Clathrin Mediates Endocytosis and Polar Distribution of PIN Auxin Transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1920–1931.
- Klemens, P.A.W., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R., Bellini, C., *et al.* (2013) Overexpression of the Vacuolar Sugar Carrier AtSWEET16 Modifies Germination, Growth, and Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol* **163**: 1338–1352.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr Biol CB* **21**: 1204–1209.
- Knoblauch, M., and Peters, W.S. (2010) Münch, morphology, microfluidics - our structural problem with the phloem: Münch, morphology, microfluidics. *Plant Cell Environ* no-no.
- Knop, C. (2004) AmSUT1, a Sucrose Transporter in Collection and Transport Phloem of the Putative Symplastic Phloem Loader *Alonsoa meridionalis*. *PLANT Physiol* **134**: 204–214.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., *et al.* (2007) Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *PLANT CELL ONLINE* **19**: 1065–1080.
- Konopka-Postupolska, D., and Clark, G. (2017) Annexins as Overlooked Regulators of Membrane Trafficking in Plant Cells. *Int J Mol Sci* **18**: 863.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., and Bécard, G. (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **131**: 952–962.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 9823–9828.
- Krügel, U., He, H.-X., Gier, K., Reins, J., Chincinska, I., Grimm, B., *et al.* (2012) The Potato Sucrose Transporter StSUT1 Interacts with a DRM-Associated Protein Disulfide Isomerase. *Mol Plant* **5**: 43–62.
- Krügel, U., and Kühn, C. (2013) Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein–protein interactions. *Front Plant Sci* **4** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00237/abstract>. Accessed October 26, 2017.
- Krugel, U., Veenhoff, L.M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., *et al.* (2008) Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 Is Affected by Posttranslational Modification. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 2497–2513.
- Krügel, U., Veenhoff, L.M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., *et al.* (2008) Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 Is Affected by Posttranslational Modification. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 2497–2513.
- Kühn, C. (2003) A Comparison of the Sucrose Transporter Systems of Different Plant Species. *Plant Biol* **5**: 215–232.
- Kühn, C. (2016) Review: Post-translational cross-talk between brassinosteroid and sucrose signaling. *Plant Sci* **248**: 75–81.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W.B. (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**: 1298–1300.

- Kühn, C., and Grof, C.P. (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 287–297.
- Kühn, C., Hajirezaei, M.-R., Fernie, A.R., Roessner-Tunali, U., Czechowski, T., Hirner, B., and Frommer, W.B. (2003) The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* **131**: 102–113.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870–1874.
- Kunze, G. (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *PLANT CELL ONLINE* **16**: 3496–3507.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Kim, S.R., and Park, O.K. (2013) The Rab GTPase RabG3b Positively Regulates Autophagy and Immunity-Associated Hypersensitive Cell Death in Arabidopsis. *PLANT Physiol* **161**: 1722–1736.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lalonde, S. (2010) A membrane protein / signaling protein interaction network for Arabidopsis version AMPv2. *Front Physiol* **1** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2010.00024/abstract>. Accessed October 24, 2017.
- Lalonde, S., and Frommer, W.B. (2012) SUT Sucrose and MST Monosaccharide Transporter Inventory of the Selaginella Genome. *Front Plant Sci* **3** <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2012.00024/full>. Accessed November 18, 2014.
- Laluk, K., and Mengiste, T. (2010) Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arab Book* **8**: e0136.
- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Biol* **48**: 251–275.
- Lareen, A., Burton, F., and Schäfer, P. (2016) Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* **90**: 575–587.
- Leborgne-Castel, N., Adam, T., and Bouhidel, K. (2010) Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma* **247**: 177–193.
- Leborgne-Castel, N., and Bouhidel, K. (2014) Plasma membrane protein trafficking in plant-microbe interactions: a plant cell point of view. *Front Plant Sci* **5** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00735/abstract>. Accessed October 18, 2017.
- Leborgne-Castel, N., Lherminier, J., Der, C., Fromentin, J., Houot, V., and Simon-Plas, F. (2008) The Plant Defense Elicitor Cryptogein Stimulates Clathrin-Mediated Endocytosis Correlated with Reactive Oxygen Species Production in Bright Yellow-2 Tobacco Cells. *PLANT Physiol* **146**: 1255–1266.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J Cell Mol Biol* **15**: 773–781.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**: 527–538.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* **171**: 249–269.

- Lee, M.H., Yoo, Y.-J., Kim, D.H., Hanh, N.H., Kwon, Y., and Hwang, I. (2017) The Prenylated Rab GTPase Receptor PRA1.F4 Contributes to Protein Exit from the Golgi Apparatus. *Plant Physiol* **174**: 1576–1594.
- Lemmon, S.K., Freund, C., Conley, K., and Jones, E.W. (1990) Genetic instability of clathrin-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 27–38.
- Lemoine, R. (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1465**: 246–262.
- Lemoine, R., Bürkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kühn, C., Regnacq, M., *et al.* (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett* **454**: 325–330.
- Lemoine, R., Camera, S.L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., *et al.* (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* **4** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00272/abstract>. Accessed May 14, 2017.
- Lemonnier, P., Gaillard, C., Veillet, F., Verbeke, J., Lemoine, R., Coutos-Thévenot, P., and La Camera, S. (2014) Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Mol Biol* **85**: 473–484.
- Leto, D., and Saltiel, A.R. (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 383–396.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., *et al.* (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**: 1361–1364.
- Lewis, J.D., Wan, J., Ford, R., Gong, Y., Fung, P., Nahal, H., *et al.* (2012) Quantitative Interactor Screening with next-generation Sequencing (QIS-Seq) identifies *Arabidopsis thaliana* MLO2 as a target of the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ2. *BMC Genomics* **13**: 8.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., *et al.* (2014) The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host Microbe* **15**: 329–338.
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., *et al.* (2013) Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* **341**: 1384–1387.
- Liesche, J., He, H.-X., Grimm, B., Schulz, A., and Kühn, C. (2010) Recycling of Solanum Sucrose Transporters Expressed in Yeast, Tobacco, and in Mature Phloem Sieve Elements. *Mol Plant* **3**: 1064–1074.
- Liesche, J., Krügel, U., He, H., Chincinska, I., Hackel, A., and Kühn, C. (2011) Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *J Plant Physiol* **168**: 1426–1433.
- Liesche, J., Schulz, A., Krügel, U., Grimm, B., and Kühn, C. (2008) Dimerization and endocytosis of the sucrose transporter StSUT1 in mature sieve elements. *Plant Signal Behav* **3**: 1136–1137.
- Lin, I.W., Sosso, D., Chen, L.-Q., Gase, K., Kim, S.-G., Kessler, D., *et al.* (2014) Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**: 546–549.
- Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R. (2007) SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 147–174.
- Liu, S., Wang, J., Han, Z., Gong, X., Zhang, H., and Chai, J. (2016) Molecular Mechanism for Fungal Cell Wall Recognition by Rice Chitin Receptor OsCEBiP. *Struct Lond Engl* **24**: 1192–1200.
- Liu, S.-H., Wong, M.L., Craik, C.S., and Brodsky, F.M. (1995) Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* **83**: 257–267.

- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., *et al.* (2012) Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* **336**: 1160–1164.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lohar, D.P., Haridas, S., Gantt, J.S., and VandenBosch, K.A. (2007) A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol* **173**: 39–49.
- Loon, L.C. van, Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135–162.
- Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J., and Boller, T. (2012) Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* **63**: 393–401.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 496–501.
- Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol Cell* **54**: 263–272.
- Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., *et al.* (2011) Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J* **65**: 404–417.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczygłowski, K., *et al.* (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640.
- Maillet, F., Poinso, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., *et al.* (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**: 58–63.
- Manck-Götzenberger, J., and Requena, N. (2016) Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. *Front Plant Sci* **7** <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00487/abstract>. Accessed May 15, 2017.
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., and 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.
- Marulanda, A., Barea, J.M., and Azcón, R. (2006) An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microb Ecol* **52**: 670–678.
- Mehdy, M.C. (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* **105**: 467–472.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., *et al.* (2007) A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **20**: 912–921.
- Miller, J.P., Lo, R.S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W.S., and Fields, S. (2005) Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 12123–12128.

- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., and Long, S.R. (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4701–4705.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A. (2006) Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 914–923.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., *et al.* (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19613–19618.
- Miyata, K., Hayafune, M., Kobae, Y., Kaku, H., Nishizawa, Y., Masuda, Y., *et al.* (2016) Evaluation of the Role of the LysM Receptor-Like Kinase, OsNFR5/OsRLK2 for AM Symbiosis in Rice. *Plant Cell Physiol* **57**: 2283–2290.
- Miyata, K., Kozaki, T., Kouzai, Y., Ozawa, K., Ishii, K., Asamizu, E., *et al.* (2014) The Bifunctional Plant Receptor, OsCERK1, Regulates Both Chitin-Triggered Immunity and Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Rice. *Plant Cell Physiol* **55**: 1864–1872.
- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E.M.F., Lherminier, J., and Simon-Plas, F. (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci* **15**: 656–663.
- Montiel, J., Arthikala, M.-K., and Quinto, C. (2013) Phaseolus vulgaris RbohB functions in lateral root development. *Plant Signal Behav* **8**: e22694.
- Moore, J.W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., Schnippenkoetter, W., Ayliffe, M., Huerta-Espino, J., *et al.* (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nat Genet* **47**: 1494–1498.
- Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J.-J., *et al.* (2006) Proteomics of Plant Detergent-resistant Membranes. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1396–1411.
- Morgan, J. a. W., Bending, G.D., and White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot* **56**: 1729–1739.
- Müller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., and Šamaj, J. (2009) Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the preprophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane: Localization and function of MPK6 in Arabidopsis root. *Plant J* **61**: 234–248.
- Murphy, A.S., Bandyopadhyay, A., Holstein, S.E., and Peer, W.A. (2005) ENDOCYTOTIC CYCLING OF PM PROTEINS. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 221–251.
- Nagahashi, G., and Douds, D.D. (2000) Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol Res* **104**: 1453–1464.
- Nagahashi, G., and Douds, D.D. (2004) Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora gigantea*. *Mycol Res* **108**: 1079–1088.
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., *et al.* (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J Cell Mol Biol* **65**: 169–180.
- Naseem, M., Kunz, M., and Dandekar, T. (2017) Plant-Pathogen Maneuvering over Apoplastic Sugars. *Trends Plant Sci* **22**: 740–743.

- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., and Mariani, P. (2007) A Diffusible Signal from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicits a Transient Cytosolic Calcium Elevation in Host Plant Cells. *PLANT Physiol* **144**: 673–681.
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., and Dietz, S. (2010) Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review: Fungal carbohydrates in the ectomycorrhizal symbiosis. *Plant Biol* **12**: 292–301.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G. (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci* **4**: 139.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**: 375–396.
- Nielsen, M.E., Jürgens, G., and Thordal-Christensen, H. (2017) VPS9a Activates the Rab5 GTPase ARA7 to Confer Distinct Pre- and Postinvasive Plant Innate Immunity. *Plant Cell* **29**: 1927–1937.
- Niittylä, T., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Frommer, W.B., and Schulze, W.X. (2007) Temporal Analysis of Sucrose-induced Phosphorylation Changes in Plasma Membrane Proteins of *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1711–1726.
- Noirot, E., Der, C., Lherminier, J., Robert, F., Moricova, P., Kiêu, K., *et al.* (2014) Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *J Exp Bot* **65**: 5011–5022.
- Nühse, T.S., Stensballe, A., Jensen, O.N., and Peck, S.C. (2004) Phosphoproteomics of the Arabidopsis Plasma Membrane and a New Phosphorylation Site Database. *PLANT CELL ONLINE* **16**: 2394–2405.
- Nürnberg, T., and Brunner, F. (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 318–324.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., *et al.* (2004) K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 12242–12247.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., and Saeki, K. (2013) Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 17131–17136.
- Okubo-Kurihara, E., Higaki, T., Kurihara, Y., Kutsuna, N., Yamaguchi, J., and Hasezawa, S. (2011) Sucrose transporter NtSUT4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture. *J Plant Res* **124**: 395–403.
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., and Gough, C. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J Cell Mol Biol* **44**: 195–207.
- Oldroyd, G.E.D. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–263.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119–144.
- Ooijen, G. van, Burg, H.A. van den, Cornelissen, B.J.C., and Takken, F.L.W. (2007) Structure and Function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 43–72.

- Op den Camp, R., Streng, A., De Mita, S., Cao, Q., Polone, E., Liu, W., *et al.* (2011) LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* **331**: 909–912.
- Panabières, F., Ponchet, M., Allasia, V., Cardin, L., and Ricci, P. (1997) Characterization of border species among Pythiaceae: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical proteins from *Phytophthora spp.* *Mycol Res* **101**: 1459–1468.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1–34.
- Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**: 763–775.
- Patrick, J.W. (1997) PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 191–222.
- Pedrazzini, E., Komarova, N.Y., Rentsch, D., and Vitale, A. (2013) Traffic Routes and Signals for the Tonoplast: Protein Sorting to the Tonoplast. *Traffic* **14**: 622–628.
- Peer, W.A. (2011) Plasma Membrane Protein Trafficking. In *The Plant Plasma Membrane*. Murphy, A.S., Schulz, B., and Peer, W. (eds). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 31–56 http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13431-9_2. Accessed October 19, 2017.
- Peleg-Grossman, S., Melamed-Book, N., and Levine, A. (2012) ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signal Behav* **7**: 409–415.
- Peng, D., Gu, X., Xue, L.-J., Leebens-Mack, J.H., and Tsai, C.-J. (2014) Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Front Plant Sci* **5** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00615/abstract>. Accessed July 10, 2017.
- Peng, K.-C., Wang, C.-W., Wu, C.-H., Huang, C.-T., and Liou, R.-F. (2015) Tomato *SOBIR1/EVR* Homologs Are Involved in Elicitor Perception and Plant Defense Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 913–926.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., and Bakker, P.A.H.M. (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 347–375.
- Pietraszewska-Bogiel, A., Lefebvre, B., Koini, M.A., Klaus-Heisen, D., Takken, F.L.W., Geurts, R., *et al.* (2013) Interaction of *Medicago truncatula* Lysin Motif Receptor-Like Kinases, NFP and LYK3, Produced in *Nicotiana benthamiana* Induces Defence-Like Responses. *PLoS ONE* **8**: e65055.
- Pimprikar, P., Carbonnel, S., Paries, M., Katzer, K., Klingl, V., Bohmer, M.J., *et al.* (2016) A CCaMK-CYCLOPS-DELLA Complex Activates Transcription of RAM1 to Regulate Arbuscule Branching. *Curr Biol* **26**: 987–998.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 421–426.
- Pizarro, L., Margalit, T., MeiravLeibman, M., Schuster, S. and Avni, A. (2016, 30 août au 2 septembre). SIPRA1, a PrenylatedRab acceptor protein from *S. lycopersicum*, participates in LeEIX2-receptro endocytosis and defense responses triggered by EIX. Communication présentée au 19^e congrès European Network for Plant Endomembrane Research (ENPER), Bordeaux, France.
- Plett, J.M., Yin, H., Mewalal, R., Hu, R., Li, T., Ranjan, P., *et al.* (2017) *Populus trichocarpa* encodes small, effector-like secreted proteins that are highly induced during mutualistic symbiosis. *Sci Rep* **7** <http://www.nature.com/articles/s41598-017-00400-8>. Accessed October 7, 2017.

- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* **9**: 2077–2091.
- Pumplin, N., Mondo, S.J., Topp, S., Starker, C.G., Gantt, J.S., and Harrison, M.J. (2010) *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J* **61**: 482–494.
- Puppo, A., Pauly, N., Bosdari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013) Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide: Key Regulators of the Legume—*Rhizobium* and Mycorrhizal Symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202–2219.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M.H., *et al.* (2007) LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* **26**: 3923–3935.
- Ransom-Hodgkins, W.D., Vaughn, M.W., and Bush, D.R. (2003) Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton/sucrose symporter. *Planta* **217**: 483–489.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., and Saier, M.H. (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited: The major facilitator family revisited. *FEBS J* **279**: 2022–2035.
- Redecker, D., Kodner, R., and Graham, L.E. (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920–1921.
- Reinders, A., Schulze, W., Kühn, C., Barker, L., Schulz, A., Ward, J.M., and Frommer, W.B. (2002) Protein–Protein Interactions between Sucrose Transporters of Different Affinities Colocalized in the Same Eucleate Sieve Element. *Plant Cell* **14**: 1567–1577.
- Reinders, A., Sivitz, A.B., and Ward, J.M. (2012) Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front Plant Sci* **3**: 22.
- Rennie, E.A., and Turgeon, R. (2009) A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 14162–14167.
- Reuscher, S., Akiyama, M., Yasuda, T., Makino, H., Aoki, K., Shibata, D., and Shiratake, K. (2014) The Sugar Transporter Inventory of Tomato: Genome-Wide Identification and Expression Analysis. *Plant Cell Physiol* **55**: 1123–1141.
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., Bottin, A., Huguet, S., Balzergue, S., *et al.* (2013) NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytol* **198**: 875–886.
- Richards, S.L., Laohavisit, A., Mortimer, J.C., Shabala, L., Swarbreck, S.M., Shabala, S., and Davies, J.M. (2014) Annexin 1 regulates the H₂O₂-induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* **77**: 136–145.
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., and Frommer, W.B. (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J* **13**: 1–7.
- Rivière, M.-P., Marais, A., Ponchet, M., Willats, W., and Galiana, E. (2008) Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular α -(1 \rightarrow 3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *J Exp Bot* **59**: 1225–1239.
- Robinson, D.G., and Pimpl, P. (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci* **19**: 134–139.

- Roblin, G., Sakr, S., Bonmort, J., and Delrot, S. (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Lett* **424**: 165–168.
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C., and Promé, J.C. (1991) Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J Biol Chem* **266**: 10933–10940.
- Rogers, E.D., Jackson, T., Moussaieff, A., Aharoni, A., and Benfey, P.N. (2012) Cell type-specific transcriptional profiling: implications for metabolite profiling: Cellular transcript and metabolite profiles. *Plant J* **70**: 5–17.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A.K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J Exp Bot* **54**: 513–524.
- Roitsch, T., and González, M.-C. (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* **9**: 606–613.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006) SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675–709.
- Ron, M., and Avni, A. (2004) The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* **16**: 1604–1615.
- Rual, J.-F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., *et al.* (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein–protein interaction network. *Nature* **437**: 1173–1178.
- Ruan, Y.-L. (2014) Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 33–67.
- Rubio, M.C., James, E.K., Clemente, M.R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C.P., and Becana, M. (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **17**: 1294–1305.
- Ruiz, E., and Ruffner, H.P. (2002) Immunodetection of Botrytis-specific Invertase in Infected Grapes. *J Phytopathol* **150**: 76–85.
- Rustérucchi, C., Montillet, J.-L., Agnel, J.-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., *et al.* (1999) Involvement of Lipxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the Hypersensitive Cell Death induced by Cryptogein on Tobacco Leaves. *J Biol Chem* **274**: 36446–36455.
- Rutherford, S., and Moore, I. (2002) The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 518–528.
- Salzer, P., Corbière, H., and Boller, T. (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**: 319–325.
- Sanderfoot, A. (2007) Increases in the Number of SNARE Genes Parallels the Rise of Multicellularity among the Green Plants. *PLANT Physiol* **144**: 6–17.
- Sandor, R., Der, C., Grosjean, K., Anca, I., Noiro, E., Leborgne-Castel, N., *et al.* (2016) Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *J Exp Bot* **67**: 5173–5185.
- Santi, C., Bogusz, D., and Franche, C. (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot* **111**: 743–767.
- Sauer, N. (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **581**: 2309–2317.

- Sauer, N., and Stadler, R. (1993) A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J Cell Mol Biol* **4**: 601–610.
- Schaarschmidt, S., Kopka, J., Ludwig-Müller, J., and Hause, B. (2007) Regulation of arbuscular mycorrhization by apoplastic invertases: enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects the symbiotic interaction: Enhanced invertase activity in the leaf apoplast affects AM. *Plant J* **51**: 390–405.
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., and Hause, B. (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J Exp Bot* **57**: 4015–4023.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., *et al.* (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501–506.
- Schmidt, G.W., and Delaney, S.K. (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics* **283**: 233–241.
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., *et al.* (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters: SUC4-type sucrose transporters in the tonoplast. *Plant Biol* **14**: 325–336.
- Schneidereit, A., Scholz-Starke, J., Sauer, N., and Buttner, M. (2005) AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* **221**: 48–55.
- Scholz-Starke, J. (2003) AtSTP6, a New Pollen-Specific H⁺-Monosaccharide Symporter from *Arabidopsis*. *PLANT Physiol* **131**: 70–77.
- Schubert, A., Allara, P., and Morte, A. (2004) Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* **161**: 495–501.
- Schulze, W.X., Reinders, A., Ward, J., Lalonde, S., and Frommer, W.B. (2003) Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochem* **4**: 3.
- Schüßler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., and Wipf, D. (2006) Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* **444**: 933–936.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. *Mycol Res* **105**: 1413–1421.
- Seo, P.J., Park, J.-M., Kang, S.K., Kim, S.-G., and Park, C.-M. (2011) An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* **233**: 189–200.
- Sharfman, M., Bar, M., Ehrlich, M., Schuster, S., Melech-Bonfil, S., Ezer, R., *et al.* (2011) Endosomal signaling of the tomato leucine-rich repeat receptor-like protein LeEix2: Endosomal signaling of LeEix2 receptor. *Plant J* **68**: 413–423.
- Shaw, S.L., and Long, S.R. (2003) Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* **132**: 2196–2204.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., *et al.* (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J* **64**: 204–214.
- Shimoda, Y., Han, L., Yamazaki, T., Suzuki, R., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2012) Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin-dependent protein kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**: 304–321.

- Shin, R., Jez, J.M., Basra, A., Zhang, B., and Schachtman, D.P. (2011) 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Lett* **585**: 143–147.
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., *et al.* (2012) Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant Cell Physiol* **53**: 1696–1706.
- Shinya, T., Nakagawa, T., Kaku, H., and Shibuya, N. (2015) Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr Opin Plant Biol* **26**: 64–71.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J., and Barker, D.G. (2009) A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol* **151**: 1197–1206.
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., *et al.* (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun* **5** <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms4833>. Accessed October 4, 2017.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., and Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol Rev* **26**: 39–60.
- Simonis, N., Rual, J.-F., Carvunis, A.-R., Tasan, M., Lemmens, I., Hirozane-Kishikawa, T., *et al.* (2009) Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein-protein interactome network. *Nat Methods* **6**: 47–54.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.-P. (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137–147.
- Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M.-L., Humbert, C., Montillet, J.-L., and Blein, J.-P. (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ* **20**: 1573–1579.
- Slewisinski, T.L., Meeley, R., and Braun, D.M. (2009) Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *J Exp Bot* **60**: 881–892.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., and Bisseling, T. (2007) *Medicago* LYK3, an Entry Receptor in Rhizobial Nodulation Factor Signaling. *PLANT Physiol* **145**: 183–191.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**: 1789–1791.
- Smith, S., and Read, D. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edition | Sally Smith, David Read | ISBN 9780123705266. <http://store.elsevier.com/Mycorrhizal-Symbiosis/Sally-Smith/isbn-9780123705266/>. Accessed June 30, 2016.
- Speth, E.B., Imboden, L., Hauck, P., and He, S.Y. (2009) Subcellular Localization and Functional Analysis of the Arabidopsis GTPase RabE. *PLANT Physiol* **149**: 1824–1837.
- Srivastava, A.C., Ganesan, S., Ismail, I.O., and Ayre, B.G. (2008) Functional Characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H⁺ Symporter by Tissue-Specific Complementation Reveals an Essential Role in Phloem Loading But Not in Long-Distance Transport. *PLANT Physiol* **148**: 200–211.
- Stadler, R., and Sauer, N. (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Bot Acta* **109**: 299–306.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., *et al.* (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962.

- Sun, J., Miller, J.B., Granqvist, E., Wiley-Kalil, A., Gobbato, E., Maillet, F., *et al.* (2015) Activation of Symbiosis Signaling by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Legumes and Rice. *Plant Cell* **27**: 823–838.
- Sun, M.-X., Huang, X.-Y., Yang, J., Guan, Y.-F., and Yang, Z.-N. (2013) Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. *Plant Reprod* **26**: 83–91.
- Sun, Y., Reinders, A., LaFleur, K.R., Mori, T., and Ward, J.M. (2010) Transport Activity of Rice Sucrose Transporters OsSUT1 and OsSUT5. *Plant Cell Physiol* **51**: 114–122.
- Sutter, J.-U., Campanoni, P., Blatt, M.R., and Paneque, M. (2006) Setting SNAREs in a Different Wood: Setting SNAREs in a Different Wood. *Traffic* **7**: 627–638.
- Sutton, P.N., Henry, M.J., and Hall, J.L. (1999) Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* **208**: 426–430.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R. (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 691–699.
- Tahara, H., Yokota, E., Igarashi, H., Orii, H., Yao, M., Sonobe, S., *et al.* (2007) Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures. *Protoplasma* **230**: 1–11.
- Takahashi, Y., Nasir, K.H.B., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., *et al.* (2007) A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*: NbMCK1 transduces non-host resistance signaling. *Plant J* **49**: 1030–1040.
- Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B. (2007) NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet Biol FG B* **44**: 1065–1076.
- Tanaka, K., Cho, S.-H., Lee, H., Pham, A.Q., Batek, J.M., Cui, S., *et al.* (2015) Effect of lipochitoooligosaccharide on early growth of C4 grass seedlings. *J Exp Bot* **66**: 5727–5738.
- Tao, Y., Cheung, L.S., Li, S., Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Xu, Y., *et al.* (2015) Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. *Nature* **527**: 259–263.
- Tarte, V.N., Seok, H.-Y., Woo, D.-H., Le, D.H., Tran, H.T., Baik, J.-W., *et al.* (2015) Arabidopsis Qc-SNARE gene *AtSFT12* is involved in salt and osmotic stress responses and Na⁺ accumulation in vacuoles. *Plant Cell Rep* **34**: 1127–1138.
- Tauzin, A.S., and Giardina, T. (2014) Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Front Plant Sci* **5** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00293/abstract>. Accessed October 12, 2017.
- Tejeda-Sartorius, M., Martínez de la Vega, O., and Délano-Frier, J.P. (2008) Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved in carbohydrate partitioning. *Physiol Plant* **133**: 339–353.
- The UniProt Consortium (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res* **38**: D142–D148.
- Tian, C., Kasiborski, B., Koul, R., Lammers, P.J., Bucking, H., and Shachar-Hill, Y. (2010) Regulation of the Nitrogen Transfer Pathway in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Gene Characterization and the Coordination of Expression with Nitrogen Flux. *Plant Physiol* **153**: 1175–1187.

- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., *et al.* (2006) Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**: 1153–1156.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., *et al.* (2012) The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytol* **193**: 755–769.
- Tolteer, D., Hinch, D.K., and Macherel, D. (2010) A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1798**: 1926–1933.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 517–522.
- Truernit, E., and Sauer, N. (1995) The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**: 564–570.
- Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J., and Sauer, N. (1996) The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* **8**: 2169–2182.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 459–465.
- Turgeon, R. (2010) The Role of Phloem Loading Reconsidered. *Plant Physiol* **152**: 1817–1823.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., *et al.* (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200.
- Vadassery, J., and Oelmüller, R. (2009) Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions. *Plant Signal Behav* **4**: 1024–1027.
- Van Breusegem, F. (2006) Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *PLANT Physiol* **141**: 384–390.
- Van Zeebroeck, G., Kimpe, M., Vandormael, P., and Thevelein, J.M. (2011) A Split-Ubiquitin Two-Hybrid Screen for Proteins Physically Interacting with the Yeast Amino Acid Transceptor Gap1 and Ammonium Transceptor Mep2. *PLoS ONE* **6**: e24275.
- Vasse, J., Billy, F., and Truchet, G. (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti-alfalfa* symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J* **4**: 555–566.
- Veillet, F., Gaillard, C., Coutos-Thévenot, P., and La Camera, S. (2016) Targeting the *AtCWIN1* Gene to Explore the Role of Invertases in Sucrose Transport in Roots and during *Botrytis cinerea* Infection. *Front Plant Sci* **7** <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01899/full>. Accessed October 11, 2017.
- Venkateshwaran, M., Jayaraman, D., Chabaud, M., Genre, A., Balloon, A.J., Maeda, J., *et al.* (2015) A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 9781–9786.
- Viola, R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R.D., Marmiroli, N., *et al.* (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* **13**: 385–398.
- Voegele, R.T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8133–8138.

- Voegele, R.T., Wirsal, S., Möll, U., Lechner, M., and Mendgen, K. (2006) Cloning and Characterization of a Novel Invertase from the Obligate Biotroph *Uromyces fabae* and Analysis of Expression Patterns of Host and Pathogen Invertases in the Course of Infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 625–634.
- Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J., and Sauer, N. (2010) A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* **8**: e1000303.
- Waldie, T., McCulloch, H., and Leyser, O. (2014) Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J* **79**: 607–622.
- Wang, C., Zhu, M., Duan, L., Yu, H., Chang, X., Li, L., *et al.* (2015) *Lotus japonicus* Clathrin Heavy Chain1 Is Associated with Rho-Like GTPase ROP6 and Involved in Nodule Formation. *Plant Physiol* **167**: 1497–1510.
- Waring, P., and Patrick J. (1975) Photosynthesis and Productivity in Different Environments. J.P Cooper, Cambridge University Press.
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2004) Fungal Elicitation of Signal Transduction-Related Plant Genes Precedes Mycorrhiza Establishment and Requires the *dmi3* Gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1385–1393.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002) Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cryptogein Signaling Pathway Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco. *Plant Cell Online* **14**: 1937–1951.
- Whipps, J.M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot* **82**: 1198–1227.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., Tsuda, K., *et al.* (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 19824–19829.
- Wippel, K., Wittek, A., Hedrich, R., and Sauer, N. (2010) Inverse pH Regulation of Plant and Fungal Sucrose Transporters: A Mechanism to Regulate Competition for Sucrose at the Host/Pathogen Interface? *PLoS ONE* **5**: e12429.
- Wittek, A., Dreyer, I., Al-Rasheid, K.A.S., Sauer, N., Hedrich, R., and Geiger, D. (2017) The fungal UmSrt1 and maize ZmSUT1 sucrose transporters battle for plant sugar resources: Competition of fungal and plant sugar transporters. *J Integr Plant Biol* <http://doi.wiley.com/10.1111/jipb.12535>. Accessed May 24, 2017.
- Wright, D.P., Read, D.J., and Scholes, J.D. (1998) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ* **21**: 881–891.
- Xuan, Y.H., Hu, Y.B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D.C., Hou, B.-H., and Frommer, W.B. (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc Natl Acad Sci* **110**: E3685–E3694.
- Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J Biol Chem* **285**: 1138–1146.
- Yamada, K., Osakabe, Y., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017) A C-terminal motif contributes to the plasma membrane localization of Arabidopsis STP transporters. *PLOS ONE* **12**: e0186326.
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H., and Takano, Y. (2016) Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science* **354**: 1427–1430.

- Yang, B., Sugio, A., and White, F.F. (2006) Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 10503–10508.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., *et al.* (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 20540–20545.
- Yu, H., Braun, P., Yildirim, M.A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., *et al.* (2008) High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**: 104–110.
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., *et al.* (2011) Colonization of Rice Leaf Blades by an African Strain of *Xanthomonas oryzae* *pv.* *oryzae* Depends on a New TAL Effector That Induces the Rice Nodulin-3 Os11N3 Gene. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1102–1113.
- Zamioudis, C., and Pieterse, C.M.J. (2012) Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 139–150.
- Zhang, C., and Turgeon, R. (2009) Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 18849–18854.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., *et al.* (2007) A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **1**: 175–185.
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D.F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* **10**: 435–449.
- Zhang, S., Liu, Y., and Klessig, D.F. (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**: 339–347.
- Zhang, X., Dong, W., Sun, J., Feng, F., Deng, Y., He, Z., *et al.* (2015) The receptor kinase *CERK1* has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *Plant J* **81**: 258–267.
- Zhang, X.-Y. (2006) A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry. *PLANT Physiol* **142**: 220–232.
- Zhang, X.-Y., Wang, X.-L., Wang, X.-F., Xia, G.-H., Pan, Q.-H., Fan, R.-C., *et al.* (2006) A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry. *Plant Physiol* **142**: 220–232.
- Zipfel, C., and Oldroyd, G.E.D. (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328–336.
- Zogli, P., and Libault, M. (2017) Plant response to biotic stress: Is there a common epigenetic response during plant-pathogenic and symbiotic interactions? *Plant Sci* **263**: 89–93.
- Zuckerkindl, E., and Pauling, L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *Evolving Genes and Proteins*. V. Bryson and H.J. Vogel, New York. pp. 97–166.

ANNEXES

Annexe 1 : chapitre de livre en français intitulé

Mécanismes cellulaires et moléculaires et ingénierie écologique des mycorhizes à arbuscules

Drain A.¹, Pfister C.¹, Zerbib J.^{1,2}, Leborgne-Castel N.¹, Roy S.³, Courty P.E.⁴ & D. Wipf¹

¹ Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté - F-21000 Dijon, France

² Oriskany - 22, rue GM Lunsford Oliver - L-2225 Luxembourg

³ Agronutrition, Laboratoire de biotechnologies - 436, rue Pierre et Marie Curie - F-31670 Labège, France

⁴ University of Fribourg, Department of Biology - 3, rue Albert Gockel - 1700 Fribourg, Suisse

* Auteur pour la correspondance - Daniel Wipf (daniel.wipf@inra.fr)

1. Introduction : mycorhizes à arbuscules et services écosystémiques

La mycorhize à arbuscules (MA) est une symbiose mutualiste qui concerne 80 % des plantes terrestres, dont la majorité des plantes de culture. Il s'agit d'une symbiose ancestrale apparue il y a environ 475 millions d'années avec l'émergence des premières plantes terrestres (Redecker *et al.*, 2000). Elle est caractérisée par une interaction entre les racines de plantes hôtes et des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) appartenant au phylum des Gloméromycètes (Smith & Read, 2008). Cette interaction permet aux plantes d'améliorer l'utilisation des ressources naturelles du sol et de mieux répondre aux contraintes abiotiques et biotiques qu'elles rencontrent dans leur environnement. Dans le futur, la gestion et la valorisation des services écosystémiques rendus par les MA représenteront un des enjeux majeurs pour l'optimisation de la production végétale, autant qualitative que quantitative, par une agriculture limitant les intrants chimiques de synthèse. Une maîtrise optimale des MA dans l'ingénierie écologique des systèmes de production végétale, ainsi que dans la sélection des plantes exploitant au maximum leurs bénéfices, nécessite la compréhension des mécanismes complexes qui sous-tendent l'établissement et le fonctionnement des MA.

Les MA sont caractérisées par la formation, dans les cellules du cortex racinaire, de structures fongiques ramifiées, appelées arbuscules (Figure 1). C'est au niveau de ces structures qu'ont lieu les échanges nutritionnels, et plus précisément dans l'espace péri-arbusculaire (apoplasme) qui sépare les cellules végétale et fongiques. Les plantes mycorhizées peuvent absorber les nutriments du sol par deux voies : (i) la « voie directe » qui implique l'absorption directe des nutriments du sol par les racines et les poils absorbants, et (ii) la « voie mycorhizienne » qui implique l'absorption des nutriments *via* le réseau d'hyphes externes, leur transport vers les hyphes internes et les arbuscules, puis leur absorption par la plante à partir de l'espace péri-arbusculaire *via* la membrane péri-arbusculaire (MPA) (Figure 1).

Lors de l'interaction, le CMA fournit la plante hôte en nutriments et en eau ; en retour la plante apporte des éléments carbonés (*i.e.*, sucres) issus des photosynthétats au champignon. Ces échanges, à la base de la MA, sont régulés par des systèmes de transport (voir ci-dessous) présents chez les deux partenaires et impliqués d'une part dans le transport longue distance de produits de la photosynthèse des feuilles vers les racines puis vers le partenaire fongique ; et d'autre part dans l'absorption des nutriments du sol par le champignon et leur transport vers la plante. Dans ce contexte, les flux entrants et sortants de nutriments, permettant les échanges à travers les interfaces sol-CMA, CMA-apoplasme et apoplasme-plante, sont contrôlés par des protéines de la membrane appelées transporteurs et canaux. Ce chapitre synthétise les connaissances actuelles sur les systèmes de transport impliqués dans les échanges trophiques, ainsi que leur régulation. L'accent est mis sur les échanges de carbone (C), d'azote (N), de phosphate (P) et de soufre (S) entre les deux partenaires, ainsi

que le prélèvement de ces nutriments depuis le sol par le CMA [pour des informations plus détaillées concernant la biochimie et les caractéristiques physiologiques de ces transporteurs, voir Casieri *et al.*, (2013) et Garcia *et al.*, (2016)]. Le chapitre adresse également le potentiel en ingénierie écologique de la MA dans le cadre d'une agriculture agroécologique.

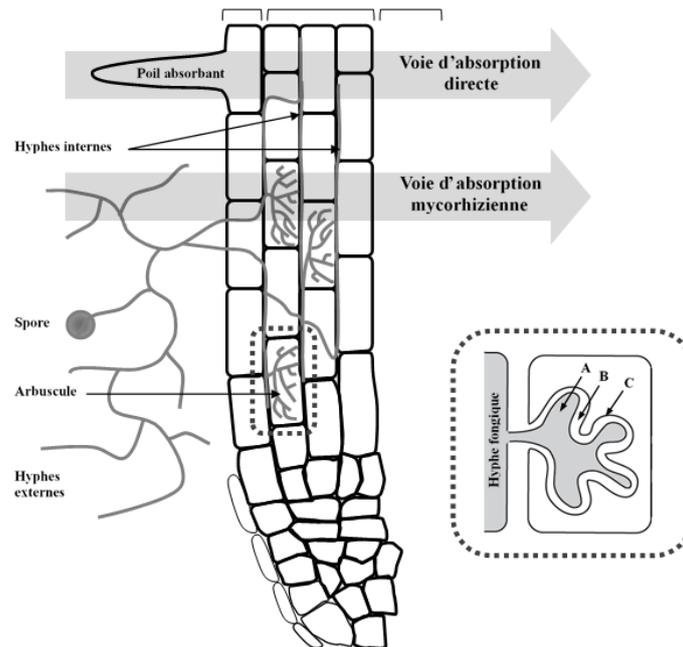


Figure 1 : Schéma d'une racine mycorhizée et des voies d'absorption des nutriments. Dans le sol, une spore de champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) germe, et développe des hyphes externes qui entrent en contact avec les cellules du rhizoderme, et les pénètrent en traversant leurs parois et leurs membranes plasmiques. Après avoir atteint le cortex racinaire, les hyphes internes forment des arbuscules au sein des cellules végétales. C'est au niveau de ces structures qu'ont lieu les échanges de nutriments entre la plante et le CMA. Les flèches grises épaisses représentent les deux voies d'absorption des nutriments : la voie directe *via* les poils absorbants et la voie symbiotique *via* les hyphes externes jusqu'aux cellules arbusculaires. L'encart, en ligne discontinue, schématise une cellule arbusculaire, dans laquelle on retrouve l'arbuscule (A), l'espace péri-arbusculaire (apoplasme) (B) et la membrane péri-arbusculaire ou MPA (C) de la cellule végétale.

2. Mécanismes sous-jacents aux échanges de nutriments dans la mycorhize à arbuscules

Les cellules sont séparées du milieu extérieur et entre elles par des membranes plasmiques semi-perméables (Figure 2). Le transport d'eau et de nutriments depuis l'environnement et entre cellules voisines peut se faire par (i) la « voie symplastique » qui forme un continuum des cytoplasmes *via* les plasmodesmes (pores traversant la paroi des cellules végétales) et/ou (ii) la « voie apoplastique » qui forme un continuum des parois et apoplastes, et nécessite le franchissement des membranes plasmiques. Dans le cas de petits composés non chargés, le passage peut se faire par diffusion simple à travers la bicouche lipidique. Cependant, pour la majorité des composés, le transport se fait *via* des protéines spécialisées, les transporteurs, insérées au sein de la membrane et permettant ainsi la régulation des échanges et la transmission de signaux entre deux compartiments. Grâce à ces protéines le transport des composés peut s'établir dans le sens contraire de leur gradient de concentration (*i.e.*, transport actif) ou dans le sens de celui-ci (*i.e.*, transport passif, *via* les uniports) (Figure 2). Concernant le transport actif, on distingue (i) les pompes H^+ -ATPases, qui excrètent des protons H^+ contre leur gradient de concentration par hydrolyse directe de l'ATP (Adénosine TriPhosphate), et (ii) les antiports et symports qui utilisent ce gradient de protons pour transporter un soluté contre son gradient de concentration (Briskin, 1994).

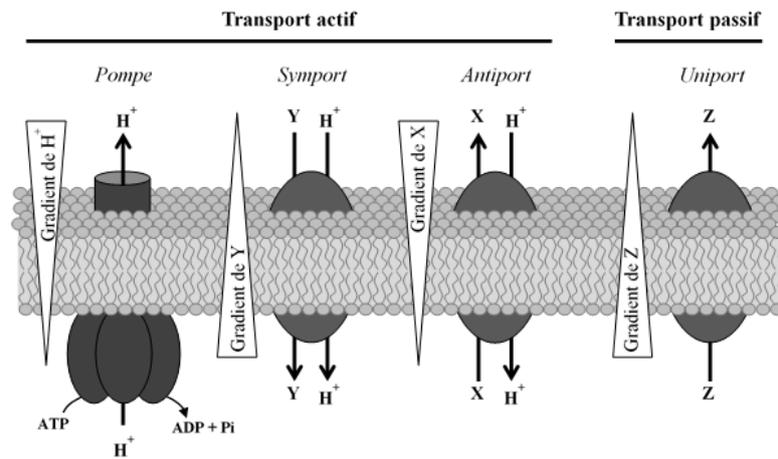


Figure 2 : Les différents types de transporteurs membranaires. Le passage d'un soluté à travers la bicouche de phospholipides peut se faire contre son gradient de concentration (transport actif) ou dans le sens de son gradient de concentration (transport passif). Les pompes hydrolysent l'ATP pour générer un gradient de protons (H^+) qui se concentrent à l'extérieur de la cellule. Les antiports et symports utilisent ce gradient de H^+ pour transporter un composé (X ou Y) contre son gradient de concentration. On parlera de symport si le transport du composé Y est dans le même sens que les H^+ et d'antiport dans le cas contraire pour le composé X. Le transport d'un composé Z dans le sens de son gradient de concentration ne nécessitant pas l'utilisation du gradient de H^+ se fait au travers d'un uniport.

2.1 Transport des éléments carbonés des feuilles au partenaire fongique

La plante synthétise du saccharose grâce à son activité de photosynthèse. L'acheminement des photoassimilats des organes « producteurs » vers les organes « destinataires » passe par des transporteurs spécialisés (Figure 3). Trois familles majeures de transporteurs de sucres ont été caractérisées à ce jour (i) des symports saccharose/ H^+ appelés SUTs (*SUCrose Transporters*), (ii) des symports et antiports monosaccharide/ H^+ ou MSTs (*Monosaccharide Sugar Transporters*) transportant principalement du glucose, du fructose ou du xylose, et (iii) des uniports de monosaccharides ou de saccharose appelés SWEETs (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*).

La famille des SUTs comporte cinq groupes. Les membres du groupe SUT1 sont spécifiques des dicotylédones et présentent une haute efficacité pour le transport de saccharose par rapport aux SUTs des autres groupes. Les transporteurs du groupe SUT1 sont impliqués dans le chargement du phloème (contenant la sève élaborée) depuis les organes producteurs, puis le déchargement du phloème vers les organes destinataires. Les SUT3, retrouvés uniquement chez les monocotylédones (*i.e.*, riz, maïs, blé ou orge), et les SUT1 semblent partager les mêmes fonctions. Les SUT2 et SUT4 sont présents à la fois chez les mono- et dicotylédones. Les SUT4 ont été localisés majoritairement dans la membrane de la vacuole (organite cellulaire ayant notamment un rôle dans le stockage et/ou la dégradation de composés). Dans la grande famille des MSTs sept groupes peuvent être distingués selon (i) la spécificité de substrat avec les STPs (*Sugar Transport Proteins*), les PMTs (*Polyol/Monosaccharide Transporters*) et les INTs (*Inositol Transporters*) ; et (ii) la localisation intracellulaire avec les VGTs (*Vacuolar Glucose Transporters*), les TMT (*Tonoplast Membrane Transporters*) et les pGlcTs (*plastidic Glucose Transporters*) ; ou (iii) l'induction de l'expression d'un gène de défense de la plante en réponse à un stress : *ESL* pour *Early-response to dehydration Six-Like*. Enfin, les SWEETs sont classés dans quatre groupes, où les membres des groupes 1 et 2 assurent le passage d'hexoses et ceux du groupe 3 permettent le transport du saccharose ; les protéines du groupe 4 seraient localisées au niveau de la membrane de la vacuole et transporteraient du fructose (Manck-Götzenberger & Requena, 2016).

La colonisation des racines par les CMA induit l'apparition d'un nouvel organe destinataire fongique, l'arbuscule, ayant pour effet une augmentation de la demande en sucres. Cela engendre chez la plante une régulation transcriptionnelle des gènes de transporteurs de sucres, pour le chargement et le déchargement du phloème, afin de rediriger les sucres vers les cellules arbusculaires. Par exemple, chez la tomate mycorhizée,

on observe l'augmentation des transcrits codant des SUTs impliqués à la fois dans le chargement et déchargement du phloème (Figure 3). Ce phénomène semble donc bien indiquer une réallocation des sucres nouvellement synthétisés par les organes producteurs vers les racines mycorhizées qui deviennent des organes destinataires.

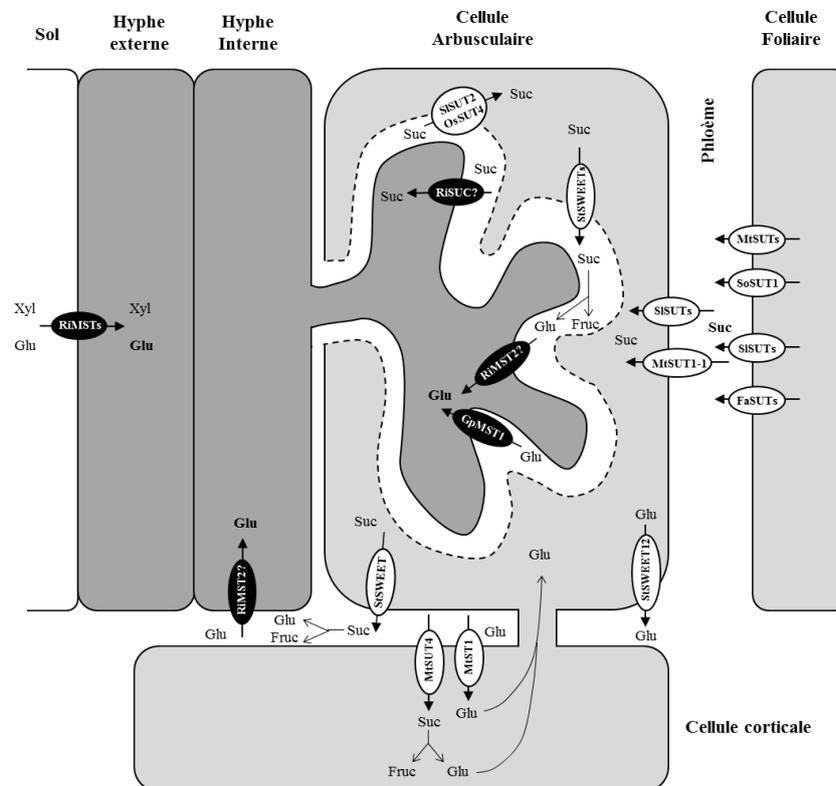


Figure 3 : Schéma des voies de transport des éléments carbonés : Sucrose (Suc), Glucose (Glu), Xylose (Xyl) et Fructose (Fru), entre la plante et le CMA, et transporteurs impliqués. Les compartiments cellule végétale, CMA et sol sont représentés respectivement en gris clair, gris foncé et blanc. La MPA est indiquée par une ligne discontinue. Les transporteurs fongiques sont représentés en noir et les transporteurs végétaux en blanc. Les nutriments indiqués en gras représentent les formes majoritaires dans les différents compartiments. Les lettres devant les transporteurs indiquent l'espèce à la quelle ils appartiennent. (*Gp* : *Glomus perpusillum* ; *Ri* : *Rhizophagus irregularis* ; *Fa* : *Fragaria ananassa*, *Mt* : *Medicago truncatula*, *Os* : *Oriza sativa*, *Se* : *Solanum lycopersicum*, *St* : *Solanum teberosum*, *So* : *Spinacia oleracea*).

Une fois les sucres déchargés du phloème, des gènes codant des transporteurs de saccharose et de monosaccharides sont surexprimés dans les cellules arbusculaires pour fournir celles-ci en ressources carbonées. Le sucre présent dans le cytoplasme des cellules végétales est ensuite exporté vers l'arbuscule, au travers de la MPA (Figure 3). Manck-Götzenberger & Requena (2016) se sont intéressées récemment à la régulation transcriptionnelle des gènes *SWEETs* durant la symbiose mycorhizienne chez la pomme de terre. Cette symbiose entraîne notamment une surexpression de gènes *SWEETs* appartenant au groupe 3 (impliqués majoritairement dans le transport de saccharose), et codant des protéines situées sur la MPA et sur la membrane plasmique des cellules végétales. Les *SWEETs* assureraient le passage du saccharose dans les espaces péri-arbusculaires. Le saccharose serait ensuite clivé par une invertase en fructose et glucose, formes privilégiées pour l'utilisation par le CMA (Doidy *et al.*, 2012). Cette hypothèse serait cohérente avec le constat que l'accumulation d'invertases dans les racines est un facteur limitant de la symbiose mycorhizienne. Cependant les transporteurs de glucose codés par des gènes *SWEETs* des groupes 1 et 2 également surexprimés lors de la symbiose mycorhizienne pourraient participer au transport du glucose préalablement clivé dans le cytoplasme de la cellule corticale colonisée (Manck-Götzenberger & Requena, 2016). Ensuite, le fructose et le glucose sont prélevés par le CMA à l'aide de transporteurs de monosaccharides (Doidy *et al.*, 2012) (Figure 3).

L'ensemble de ces résultats est à nuancer car il a été montré que les gènes du CMA *Rhizophagus irregularis* codant des transporteurs MSTs n'ont pas les mêmes niveaux d'expression selon la plante hôte, indiquant que la régulation du transport carboné de la plante pour le symbionte fongique est dépendante de l'espèce (Ait Lahmidi *et al.*, 2016).

2.2 Transport des composés azotés du sol à la plante hôte

L'azote (N) est présent dans les sols sous forme d'un mélange de composés organiques (peptides et acides aminés) et inorganiques, et les végétaux l'absorbent principalement sous forme d'ammonium (NH_4^+) et de nitrate (NO_3^-). Dans le sol, leurs concentrations sont généralement assez faibles, faisant de l'azote un élément limitant pour le développement des plantes (Smith & Read, 2008). La MA participe largement à l'amélioration de la nutrition azotée des plantes. En effet, selon les associations plante/CMA, l'absorption de N par la voie mycorhizienne peut représenter entre 20 à 50 % du contenu azoté total des racines hôtes (Jin *et al.*, 2005).

Le champignon, grâce à ses hyphes externes, est capable d'absorber l' NH_4^+ et le NO_3^- . Cependant l' NH_4^+ est généralement préféré car énergiquement plus favorable par rapport au NO_3^- . Comme les plantes, les CMA possèdent différents systèmes de transport d' NH_4^+ . De récentes études ont permis de montrer qu'en condition de faible concentration externe en NH_4^+ l'acquisition de celui-ci par *R. irregularis* est plus efficace que celle des plantes, prouvant ainsi que les plantes mycorhizées sont plus adaptées à des sols pauvres en ressources azotées (Pérez-Tienda *et al.*, 2012). Chez *R. irregularis*, au moins trois transporteurs de la famille des AMT/MEPs (*AMmonium Transporter/MEthylammonium Permeases*) sont impliqués dans le transport d' NH_4^+ (Casierie *et al.*, 2013). Cependant la localisation de leurs transcrits ainsi que leur régulation par la présence de NH_4^+ est différente, suggérant des rôles physiologiques distincts des protéines codées. En effet, *AMT1* est exprimé dans les hyphes externes et participerait à l'absorption d' NH_4^+ à partir de la solution du sol, tandis que *AMT2* et *AMT3*, exprimés préférentiellement dans les hyphes internes, participeraient aux échanges avec la plante hôte au niveau de l'interface symbiotique (Pérez-Tienda *et al.*, 2011 ; Calabrese *et al.*, 2016) (Figure 4). Du fait de sa toxicité, une fois dans les cellules fongiques, l' NH_4^+ est rapidement métabolisé en acides aminés, notamment en glutamine et en arginine. Concernant le NO_3^- , à ce jour deux transporteurs putatifs ont été identifiés chez *R. irregularis* (Tisserant *et al.*, 2012). Enfin, deux transporteurs d'azote organique ont été caractérisés chez les CMA *Funneliformis mosseae* et *R. irregularis* : (i) un transporteur d'acides aminés, AAP1 (*Amino Acid Permease*), qui joue un rôle dans l'absorption d'acides aminés à partir du sol, et (ii) un transporteur de dipeptides, PTR2 (*Peptide Transporter 2*), dont les transcrits sont accumulés dans les hyphes externes et intra-racinaires, ainsi que dans les cellules arbusculaires (Figure 4). Ceci suggère un rôle de PTR2 dans l'absorption de petits peptides à partir de la solution du sol, ainsi que dans leur échange au niveau de l'espace péri-arbusculaire (Belmondo *et al.*, 2014).

Chez les plantes, les systèmes de transport de NO_3^- sont répartis en trois familles : les familles NRT2 et NRT3, qui regroupent des transporteurs spécifiques de NO_3^- et les transporteurs de la famille des NPF qui transportent une grande variété de substrats tels le NO_3^- , des peptides, des acides aminés ou des phytohormones (Léran *et al.*, 2014). L'interaction avec les CMA peut entraîner une modification de l'expression de ces différents transporteurs dans les racines des plantes mycorhizées. Par exemple, chez la tomate, *LeNRT2.3* est exprimé uniquement dans le rhizoderme des racines non mycorhizées, mais se retrouve fortement induit dans le cortex des racines mycorrhizées par *R. irregularis* (Casieri *et al.*, 2013) (Figure 4). Chez *M. truncatula*, des analyses transcriptomiques couplées à la technique de microdissection laser (permettant d'individualiser des cellules au sein d'un tissu) ont mis en évidence la régulation de plusieurs transporteurs NPF. On peut citer notamment l'induction de *MtNPF4.12*, et *MtNPF5.3* dans les racines mycorrhizées par *F. mosseae* et *R. intraradices*, ou *MtNPF4.13* et *MtNPF4.14* exprimés spécifiquement dans les cellules arbusculaires (Casieri *et al.*, 2013).

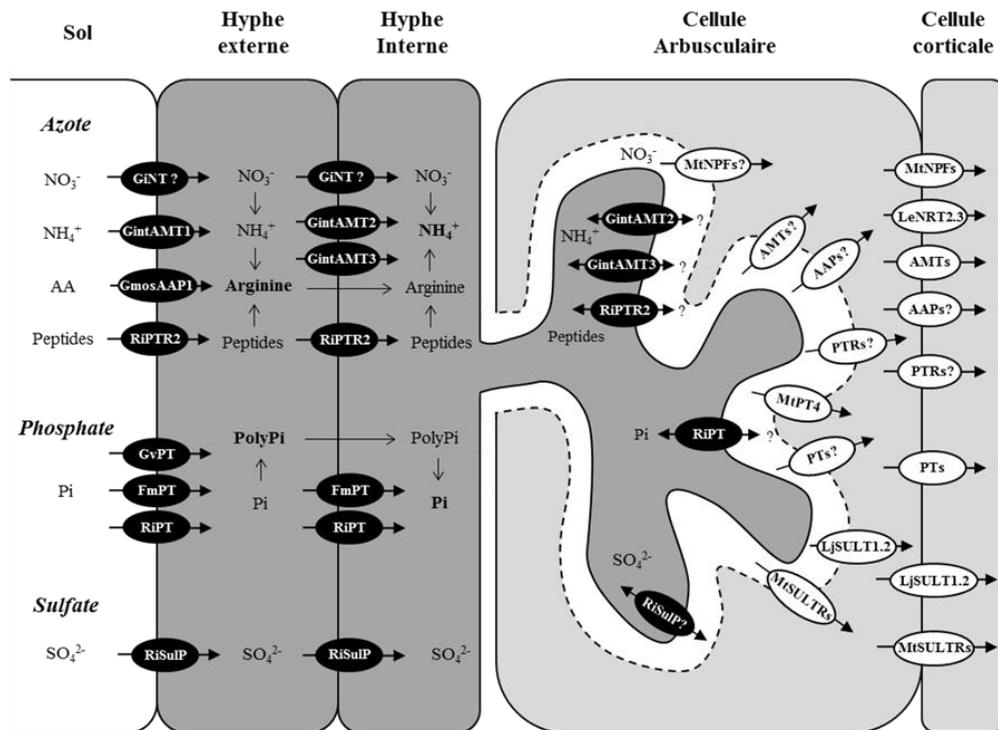


Figure 4 : Schéma des voies de transport des éléments azotés (N), phosphatés (P) et soufrés (S) entre la plante et le CMA, et transporteurs impliqués. Les compartiments « sol », CMA et cellule végétale sont représentés respectivement en blanc, gris foncé et gris clair. La MPA est indiquée par une ligne discontinue. Les transporteurs fongiques sont représentés en noir et les transporteurs végétaux en blanc. Les nutriments indiqués en gras représentent les formes majoritaires dans les différents compartiments. Les lettres devant les transporteurs indiquent l'espèce à laquelle ils appartiennent. (*Gi*, *Gint* : *Glomus intraradices*, *Gmos* : *Glomus mosseae*, *Ri* : *Rhizophagus irregularis*, *Gv* : *Glomus versiforme*, *Fm* : *Funnelformis mosseae*, *Mt* : *Medicago truncatula*, *Le* : *Lycopersicon esculentum*, *Lj* : *Lotus japonicus*).

Les analyses phylogénétiques des transporteurs d' NH_4^+ de plantes mettent en évidence une répartition en deux sous-familles : (i) les *AMT1*, proches des transporteurs d'ammonium des procaryotes, fonctionnellement bien caractérisés, et qui regroupent majoritairement des systèmes de transport d' NH_4^+ ; (ii) les *AMT2*, plus proches des *AMT/MEP* fongiques, et dont les propriétés fonctionnelles sont indéterminées à ce jour, bien que certaines expériences aient démontré leur capacité à transporter du NH_3 à la place du NH_4^+ (Guether *et al.*, 2009a). De nombreuses études réalisées chez différentes espèces de plantes ont mis en évidence l'existence d'*AMT* racinaires exprimés uniquement en condition de mycorhization (Guether *et al.*, 2009a ; Koegel *et al.*, 2013). Parmi eux on peut par exemple citer *LjAMT2.2*, exprimé dans les cellules arbusculaires et qui transporterait du NH_3 au lieu de l' NH_4^+ (Guether *et al.*, 2009a). Récemment une étude a proposé deux rôles fonctionnels distincts pour deux *AMT*s chez *M. truncatula* : *AMT2;3* serait plutôt impliqué dans la détection et/ou la signalisation des conditions favorables au maintien des arbuscules, alors que *AMT2;4* serait dédié à l'absorption d' NH_4^+ depuis l'espace apoplastique (Breuillin-Sessoms *et al.*, 2015). Enfin, concernant l'azote organique, de nombreux gènes codant des transporteurs putatifs appartenant aux familles *AAP* et *PTR*, mentionnées précédemment, sont régulés par la MA chez les espèces modèles *M. truncatula* et *Lotus japonicus* (Guether *et al.*, 2009b ; Gaude *et al.*, 2011).

Bien que le transport d'azote, depuis son prélèvement dans le sol par les CMA jusqu'à son acquisition par la plante, soit bien documenté, la nature des composés échangés entre les deux partenaires au niveau de l'interface péri-arbusculaire est encore imprécise.

2.3 Transport des composés phosphatés du sol à la plante hôte

Quelle que soit la teneur totale en phosphate (P) dans le sol, seule une très faible proportion est directement assimilable par les racines. En effet, les plantes absorbent le P sous sa forme inorganique (Pi), représentée par les ions orthophosphates $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ libres en solution dans le sol. Or, ces ions Pi libres ont tendance à précipiter avec des éléments tels que le fer, l'aluminium et le calcium, et à s'associer avec des composés organiques pour former des complexes immobiles dans le sol, diminuant leur biodisponibilité. Ces phénomènes, couplés à une absorption rapide du Pi libre par les racines, créent une zone de déplétion au niveau de la rhizosphère. Les plantes ont ainsi dû développer diverses stratégies pour augmenter leur accès au Pi, et l'une d'entre elles, comme pour l'azote, est l'association symbiotique avec les CMA (voir chapitre 7 de cet ouvrage). En effet, lors de l'interaction avec les CMA, l'absorption du Pi *via* la voie mycorhizienne devient dominante sur la voie directe et peut représenter de 20 à 100 % de l'absorption totale de P par la plante (Smith & Read, 2008). Que ce soit chez les plantes ou les CMA, les systèmes de transport actifs impliqués sont majoritairement de type symport Pi/H^+ .

Chez les CMA le premier transporteur de Pi, GvPT (*Pi Transporter*), a été identifié chez *Glomus versiforme* (Harrison & van Buuren, 1995). De par sa localisation dans les hyphes externes et sa capacité à transporter du Pi, GvPT participerait à l'absorption du Pi depuis le sol (Figure 4). L'étude de la régulation d'un transporteur PT chez *R. irregularis* démontre que le champignon est capable d'optimiser l'absorption de Pi en fonction de sa disponibilité dans l'environnement et également en fonction de son statut symbiotique (Casieri *et al.*, 2013). Une fois absorbé, le Pi est rapidement stocké dans les vacuoles fongiques sous forme de polyphosphates (polymères de Pi), ou incorporé aux phospholipides et aux acides nucléiques (Smith & Read, 2008). Les dosages réalisés dans les différents compartiments fongiques, suggèrent que le transport à longue distance de Pi se fait préférentiellement sous forme de polyphosphates, qui une fois acheminés dans les hyphes internes, sont hydrolysés en Pi avant d'être libérés dans l'espace péri-arbusculaire *via* un mécanisme encore inconnu (Garcia *et al.*, 2016).

Chez les plantes, les systèmes de transport de Pi sont répartis en trois familles : la famille Pht1, qui regroupe des transporteurs présents dans la membrane plasmique, et les familles Pht2 et Pht3 qui comprennent des transporteurs localisés majoritairement dans les plastes et mitochondries. A ce jour, seuls les transporteurs Pht1 semblent être impliqués dans la MA. Au sein de cette famille les transporteurs sont divisés en quatre groupes phylogénétiques et fonctionnels différents. Seuls les transporteurs des groupes 1 et 3 participent au transport de Pi *via* la voie mycorhizienne (Casieri *et al.*, 2013). Le premier transporteur spécifique de la mycorhization à avoir été identifié chez les plantes est MtPT4, localisé sur la MPA (Harrison, 2002) (Figure 4). Il est utilisé depuis comme marqueur moléculaire de la symbiose MA chez l'espèce modèle *M. truncatula*. D'autres transporteurs de Pi spécifiquement accumulés en condition mycorhizée ont par la suite été identifiés chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique (Tian *et al.*, 2013 ; Walder *et al.*, 2015). En général, l'induction de ces transporteurs spécifiques de la mycorhization est accompagnée d'une répression d'autres transporteurs Pht1, la plupart impliqués dans la voie directe d'absorption du Pi et sensibles aux concentrations de Pi externe. Ces régulations opposées entre les différents groupes fonctionnels de Pht1 traduisent le passage de la voie directe d'absorption du Pi à la voie mycorhizienne qui devient alors favorisée.

En plus de son implication dans la nutrition de la plante, le Pi est un signal majeur nécessaire au maintien de la MA (Garcia *et al.*, 2016). En effet, il est admis que les apports importants en Pi inhibent le développement de la MA, en favorisant la voie d'absorption directe, certainement moins coûteuse pour la plante. De récentes études ont permis d'établir que cette régulation passe par un signal systémique, impliquant probablement les strigolactones (voir chapitre 16 de cet ouvrage).

2.4 Transport des éléments soufrés du sol à la plante

Le soufre (S) est assimilé par les plantes sous sa forme soluble, le sulfate (SO_4^{2-}). Il peut être stocké transitoirement dans les vacuoles ou pénétrer dans les chloroplastes/plastes pour être réduit puis utilisé pour

la synthèse d'acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) ou autres métabolites (Casieri *et al.*, 2013). Dans la symbiose MA, le transport de SO_4^{2-} est réalisé *via* un transport actif, faisant intervenir des transporteurs de type symport $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$ appelés SulPs (*Sulfate Permeases*) chez les CMA et SulTRs (*Sulfate TRansporters*) chez les plantes (Casieri *et al.*, 2013). La symbiose mycorhizienne améliore la nutrition sulfatée de la plante (Casieri *et al.*, 2013). A ce jour, chez *R. irregularis*, cinq SulP putatifs existeraient et seraient exprimés à des niveaux similaires dans les hyphes internes et externes (Figure 4) ; aucun rôle précis des protéines codées n'ayant pu être démontré.

Casieri *et al.* (2012) ont montré, chez *M. truncatula* mycorhizé avec *R. irregularis* et fertilisé avec différentes concentrations de SO_4^{2-} , que la régulation des *MtSULTRs* est complexe. Chez le lotier (*L. japonicus*), des expériences de localisation *LjSULTR1.2* révèlent un changement de profil d'expression en fonction du statut symbiotique : une expression dans toute la racine en condition non mycorhizée et dans les racines mycorhizées une localisation restreinte aux cellules arbusculaires (Garcia *et al.*, 2016) (Figure 4). D'après ces doubles localisations et régulations, les auteurs proposent qu'à l'inverse de ce qui a été décrit pour les transporteurs de Pi (partie 2.3), un transporteur unique, *SULTR1.2*, serait impliqué dans les deux voies d'absorption, directe et mycorhizienne, chez le lotier.

Si comme, nous venons de le voir, les transportomes des partenaires végétaux et fongiques de la MA sont maintenant bien identifiés, un élément essentiel à la bonne connaissance et gestion de la MA est la compréhension de la régulation de ces protéines membranaires.

3. Régulation des protéines de transport impliquées dans les échanges trophiques de la mycorhize à arbuscules

Les membranes cellulaires sont des structures dynamiques. Cette dynamique, indispensable à la survie des cellules eucaryotes, assure l'homéostasie des compartiments intracellulaires ainsi que la communication entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Afin d'augmenter ou limiter les échanges de nutriments entre le milieu intra- et extracellulaire, les transporteurs membranaires peuvent être régulés, à l'échelle de la protéine, par (i) des mécanismes de modification protéique (*e.g.*, modifications post-traductionnelles), (ii) un trafic vésiculaire d'arrivée à la membrane (exocytose ou recyclage) ou de départ de la membrane (endocytose pouvant amener à leur dégradation) (Krügel & Kuhn, 2013).

Peu ou pas de données existent à ce jour quant à d'éventuelles modifications protéiques jouant un rôle dans l'activité des transporteurs au cours de la MA. La membrane plasmique contient des régions qui présentent une composition lipidique et protéique spécifique, appelées microdomaines membranaires. Ces régions agissent comme des plateformes de signalisation où certains composés peuvent s'associer et se réorganiser à la suite des *stimuli* perçus. Elles sont également impliquées dans le trafic vésiculaire, l'adressage de protéines et la transduction de signaux. Chez les cellules animales, ces mécanismes de régulation de transporteurs *via* des dynamiques membranaires ont été bien décrits. L'exemple le plus connu est celui du transporteur de glucose GLUT4, qui circule entre la membrane plasmique et des compartiments intracellulaires de stockage. En réponse à l'insuline, le transport de glucose est activé par un recrutement réversible de GLUT4 à la membrane plasmique par l'arrivée de vésicules d'exocytose (Antonescu *et al.*, 2014). En absence d'insuline, GLUT4 est séquestré dans des compartiments intracellulaires de stockage, bloquant ainsi le transport de glucose. Chez les végétaux, malgré l'identification de nombreux transporteurs impliqués dans les échanges de nutriments aux interfaces biotrophes (voir partie 2), rares sont les études de leurs régulations spatio-temporelles. Différentes analyses de protéomique ont montré la présence de transporteurs de phosphate et de sucres dans les microdomaines membranaires de plantes. Cette localisation des transporteurs pourrait indiquer qu'ils sont soumis à des mécanismes de trafic cellulaire. La première étude qui illustre la régulation de transporteurs de sucres, en réponse à la MA, par de tels mécanismes, est celle de Bitterliche *et al.* (2014). En effet, le transporteur de saccharose de tomate SISUT2, dont le gène est exprimé dans les cellules colonisées, contrôle négativement la disponibilité en saccharose pour le CMA. La recherche de protéines interagissant avec SUT2 a révélé la présence de protéines ayant un rôle dans la fusion de vésicules, ou

associées aux microdomaines ou encore localisées dans des vésicules intracellulaires (Bitterlich *et al.*, 2014). Ces travaux ont montré que l'interaction de SUT2 avec ces protéines a pour fonction d'inhiber l'activité du transporteur. De manière intéressante, il a été montré que l'adressage et le recyclage de SUT1 de la pomme de terre sont contrôlés par l'endocytose, qui entraîne soit la dégradation du transporteur dans la vacuole, soit son recyclage à la membrane plasmique (Figure 5). Enfin, il a été récemment supposé que les transporteurs de phosphate de *Medicago* MtPT4 et du riz OsPT11 sont adressés spécifiquement et de manière polarisée à la MPA, *via* des compartiments intracellulaires non déterminés (Kobae & Hata, 2010, Figure 5). Ceci est un indice supplémentaire en faveur d'une régulation des transporteurs par des mécanismes de dynamique membranaire.

Les autres familles de transporteurs de nutriments impliqués dans les échanges trophiques entre la plante et le CMA pourraient également être contrôlées par des mécanismes membranaires, mais à notre connaissance aucune donnée n'est disponible. De même, chez les CMA aucune régulation spatio-temporelle de transporteurs par des mécanismes similaires à ceux décrits chez les animaux et les végétaux n'a pu être démontrée à ce jour.

Bien que nous soyons encore à l'orée de la compréhension de tels mécanismes de régulation des protéines membranaires, la partie 3 fait état des premiers indices de l'importance d'une dynamique membranaire des transporteurs, nécessaire à la régulation des échanges trophiques entre les partenaires lors de la MA. Au-delà de la complexité de ces échanges nutritionnels, illustrée par les multiples transporteurs et voies de régulation mis en jeu, un élément important de la biologie des CMA et de leurs hôtes tient à l'existence de « réseaux mycorhiziens communs » (RMC).

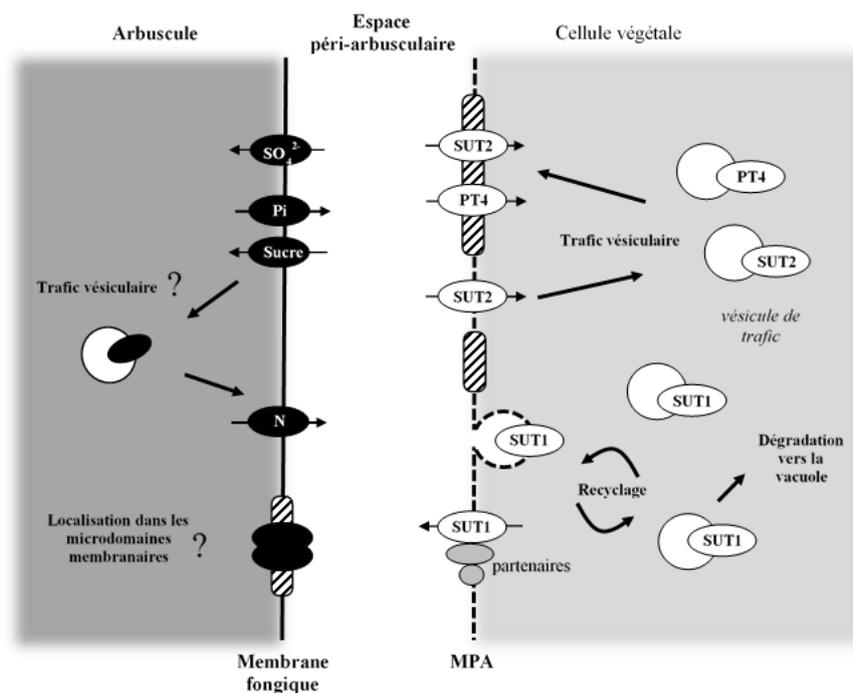


Figure 5 : Schéma simplifié des possibles régulations des transporteurs membranaires à l'interface biotrophe entre la plante et le champignon. Les microdomaines membranaires sont indiqués par des hachures. Chez la plante, les régulations connues pour les protéines dont le nom est indiqué ont été démontrées. Chez le champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) peu d'informations sont disponibles et les mécanismes indiqués sont hypothétiques. *N.B.*: SUT= Sucrose Transporter (transporteur de saccharose), PT=Phosphate Transporter (Transporteur de Phosphate) et MPA=Membrane Péri-Arbusculaire.

5. Réseaux mycéliens communs

A l'échelle d'un couvert végétal, des plantes de tailles et d'espèces différentes sont reliées entre elles au niveau de leurs racines par l'intermédiaire de RMC. Comme les CMA s'associent avec la plupart des espèces végétales, les RMC peuvent avoir un impact sur le fonctionnement et la régulation des écosystèmes en séquestrant du C, en modifiant les mouvements des éléments minéraux, en affectant la structure du sol et en influençant la composition des communautés végétales. Les RMC amplifient les compétitions plantes-plantes en favorisant le transfert des nutriments au voisinage des petites plantes vers les grandes plantes, en affectant la croissance des plantes compagnes et en influençant la composition des communautés végétales. Le rôle des RMC sur les interactions plantes-plantes dépend des espèces de plantes et de champignons impliqués (Walder *et al.*, 2012). Les capacités d'échange de nutriments sont variables d'une espèce de CMA à l'autre. On peut observer un déséquilibre quantitatif entre le C investi par chacune des plantes dans la construction du RMC et les éléments minéraux (notamment N et P) fournis par ces mêmes champignons. Par exemple, lorsque la photosynthèse est réduite, les plantes colonisées par plusieurs espèces de CMA semblent distribuer préférentiellement leur C aux champignons qui leur transfèrent le plus d'éléments minéraux (Zheng *et al.*, 2015). Par conséquent, la formation et le maintien d'un RMC formé par un ou une suite de CMA colonisant les racines de plantes annuelles et pérennes d'un écosystème ou d'un agroécosystème mettent en lumière la nécessité d'analyser les échanges de nutriments à différentes échelles, de l'individu à la population.

A ce qui précède, il faut ajouter le fait que les CMA et leurs végétaux-hôtes sont aussi en interaction étroite avec les populations microbiennes du sol (bactéries et champignons non MA), au niveau de la rhizosphère ou de la mycorrhizosphère. De plus, les végétaux comme les CMA ont un effet structurant sur les populations microbiennes du sol, conduisant souvent à la sélection d'espèces spécifiques dans ces compartiments particuliers du sol. On connaît ainsi un certain nombre de bactéries interagissant favorablement avec les plantes (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), qui exercent sur ces dernières des effets nutritionnels (*e.g.*, fixation d'azote atmosphérique ou solubilisation du phosphore rétrogradé dans le sol) ou hormonaux (synthèse d'analogues d'auxines ou d'autres phytohormones végétales) (pour revue voir ben Lugtenberg & Kamilova, 2009). Par ailleurs, certaines espèces ou populations

bactériennes ont la capacité d'interagir de manière positive avec les CMA en améliorant leur capacité de colonisation racinaire, de développement dans le sol, ou encore de prélèvement des éléments minéraux (Frey-Klett *et al.*, 2007). Le concept de « bactérie favorisant la mycorhize » (MHB, *Mycorrhiza Helper Bacteria*) a ainsi été introduit il y a quelques années (Frey-Klett *et al.*, 2007), mais les études sur ce sujet restent aujourd'hui trop rares, notamment en ce qui concerne les mycorhizes à arbuscules. On comprend ainsi que notre connaissance des mécanismes mis en jeu au cours de cette symbiose reste extrêmement parcellaire, malgré le nombre croissant de recherches qui leur sont consacrées. Il est maintenant difficilement contestable que cette symbiose est un élément primordial de la vie des plantes et du sol, mais nous manquons toujours d'informations claires sur le fonctionnement global de cette symbiose en situation « naturelle », hors des systèmes simplifiés du laboratoire. A l'avenir, les nouveaux outils de la biologie moléculaire (*e.g.*, NGS, *Next Generation Sequencing*...) permettront d'approfondir nos connaissances sur les populations mycorrhiziennes, et plus largement microbiennes, et leur fonctionnement dans leur environnement intégré, afin d'envisager de plus en plus d'applications pratiques de ces connaissances à travers le développement d'une « ingénierie écologique » de la symbiose mycorrhizienne.

6. Ingénierie écologique des mycorhizes à arbuscules

Depuis quelques années, on assiste au développement rapide de la production et de la vente d'inoculants mycorrhiziens par des sociétés privées dans le monde entier. Si ces produits sont avant tout destinés à un usage agricole (comme biofertilisants ou biostimulants), d'autres domaines d'application commencent à voir le jour. Ainsi, un certain nombre d'études (pour revue voir Gianinazzi *et al.*, 2010) ont montré que les CMA

peuvent être utilisés pour faciliter l'implantation et la croissance de végétaux dans des environnements difficiles comme des sols perturbés ou pollués, à des fins de :

- revégétalisation de talus miniers ou d'anciennes carrières, visant à recréer un couvert végétal limitant l'érosion. Dans le cas de sites pollués par des métaux lourds ou des polluants organiques, ces couverts peuvent en plus jouer un rôle de phytostabilisation, en fixant les polluants dans les racines et le réseau mycélien des CMA, limitant ainsi leur transfert dans l'environnement (Egamberdieva *et al.*, 2016) ;

- phytoextraction correspondant à une accumulation plus importante de métaux dans les parties aériennes de végétaux dits « hyperaccumulateurs », dont la récolte permet au fil des années d'extraire une partie importante des métaux initialement présents dans le sol (Egamberdieva *et al.*, 2016).

Dans le cas de sols contaminés par des molécules organiques (*e.g.*, hydrocarbures dans les sites pétroliers), la flore microbienne (bactéries et champignons) associée aux racines de plantes sélectionnées peut contribuer à la dégradation des polluants en molécules plus simples sans danger pour l'homme ou l'environnement. On parle dans ce cas de phytodégradation (Volante *et al.*, 2005). Dans tous ces cas de figure, l'utilisation d'inoculants mycorhiziens permet souvent d'améliorer l'efficacité du système, et on parle alors de phytoextraction, phytodégradation... assistée par des champignons mycorhiziens, voire de mycorhizoremédiation. De manière analogue, quelques équipes de recherche s'attachent depuis peu à évaluer le rôle que pourraient jouer les CMA dans le fonctionnement des « bandes enherbées », utilisées pour limiter le transfert des engrais et/ou pesticides utilisés en agriculture vers les cours d'eau bordant les parcelles cultivées (communication personnelle Sejalon-Delmas). Dans les années à venir, le développement d'une agriculture urbaine, ainsi que des murs et toitures végétalisés, va probablement conduire à l'augmentation notable des surfaces « hors-sol » sur lesquelles on cherchera à planter des végétaux, dans un but de production alimentaire ou d'amélioration de l'environnement. Dans toutes ces situations très « artificielles », dans lesquelles les populations de CMA sont inexistantes, l'inoculation exogène sera certainement une des clefs, encore pratiquement inexplorée, du succès de ces cultures.

Les champignons MA jouent aussi un rôle potentiellement important dans la séquestration du carbone dans les sols. En effet, ils constituent une partie importante de la biomasse présente dans les sols et produisent cette biomasse à partir des sucres que leur transfère leur plante hôte. On considère généralement que 4 à 20 % du carbone fixé par voie photosynthétique pourrait être « détourné » par la symbiose MA et ainsi transféré puis stocké dans le sol (Smith & Read, 2008). Parmi les différentes molécules organiques synthétisées par les CMA, la glomaline, sécrétée par les hyphes et directement déposée dans les sols, peut représenter une part importante (jusqu'à 5%) du carbone présent. Cette protéine, très stable et pouvant perdurer très longtemps dans les sols, joue un rôle majeur dans la stabilisation des agrégats du sol, protégeant ainsi la matière organique d'une dégradation trop rapide (Rilling *et al.*, 2002). Toutefois, la contribution nette des CMA au stockage du carbone dans les sols reste spéculative, les différents mécanismes mis en jeu étant encore mal connus.

Au niveau agricole, les bénéfices potentiels de la symbiose MA commencent à être bien connus. Outre une meilleure assimilation des éléments minéraux (P, N, Fe, Zn...) permettant une réduction des apports de fertilisants, la symbiose améliore l'utilisation de l'eau par les plantes, accroît leur résistance à de nombreux stress abiotiques (stress hydrique, thermique, salin, ...), et dans certains cas accroît leur résistance à des stress biotiques, en particulier certaines pathologies racinaires. En stimulant la production de métabolites secondaires, la symbiose contribue à l'amélioration des qualités nutritives des plantes cultivées (Gianinazzi *et al.*, 2010). Elle contribue aussi à améliorer la stabilité des sols ainsi qu'à limiter l'érosion. La symbiose MA sera donc un élément important du développement de « l'agroécologie », basée sur une utilisation raisonnée et systématique de mécanismes naturels favorisant la vie des plantes plutôt que sur l'usage massif de solutions chimiques dont les inconvénients sont de plus en plus décriés.

7. Conclusion

La symbiose MA, fruit d'une longue coévolution des CMA avec leurs partenaires végétaux, en interaction constante avec de multiples autres composantes de leur environnement, est donc un élément majeur de la biologie des plantes. Certains auteurs ont même été jusqu'à dire que les plantes, dans leur état naturel, ont des mycorhizes plutôt que des racines (BEG (*European Bank of Glomeromycota*) *committee* (1993), www.i-beg.eu). La compréhension croissante que nous avons des mécanismes de cette symbiose ne doit pas occulter le fait que, jusqu'à présent, la majorité de ces résultats a été obtenue sur un faible nombre d'espèces fongiques, en interaction avec un petit nombre d'espèces végétales. En particulier, la souche modèle *R. irregularis* DAOM 197198, premier CMA dont le génome ait été intégralement séquencé, reste probablement la plus utilisée de nos jours dans les laboratoires de recherche. Ainsi, notre compréhension de la biologie des mycorhizes reste bien souvent limitée à quelques cas particuliers, et toute généralisation de ces concepts devra s'appuyer sur des études mettant en jeu d'autres espèces fongiques. En effet, l'utilisation d'inoculants ne contenant qu'une ou deux espèces ou souches de CMA reste prépondérante aujourd'hui. Cependant il ne fait aucun doute que les potentialités réelles de cette symbiose ne pourront être exploitées qu'avec le développement de produits combinant plusieurs espèces fongiques aux caractéristiques complémentaires, ainsi que leurs populations bactériennes associées. L'existence de banques de souches de CMA (BEG, GINCO, INVAM...), et le développement de technologies permettant leur culture en conditions contrôlées facilitera à l'avenir la généralisation de nos connaissances aux différents genres et espèces de Gloméromycètes, prélude au développement de cette future « Ingénierie écologique des CMA et de leurs microorganismes associés ».

8. Références bibliographiques

- Ait Lahmidi N., Courty P.-E., Brulé D., Chatagnier O., Arnould C., Doidy J., Berta G., Lingua G., Wipf D., Bonneau L., 2016. Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 354-363.
- Antonescu C.N., McGraw T.E., Klip A., 2014. Reciprocal regulation of endocytosis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), a016964–a016964.
- Belmondo S., Fiorilli V., Pérez-Tienda J., Ferrol N., Marmeisse R., Lanfranco L., 2014. A dipeptide transporter from the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* is upregulated in the intraradical phase. *Frontiers in Plant Science*, 5, 436.
- Bitterlich M., Krügel U., Boldt-Burisch K., Franken P., Kühn C., 2014. The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *The Plant Journal*, 78(5), 877–889.
- Breuillin-Sessoms F., Floss D.S., Gomez S.K., Pumplun N., Ding Y., Levesque-Tremblay V., Noar R.D., Daniels D.A., Bravo A., Eaglesham J.B., Benedito V.A., Udvardi M.K., Harrison M.J., 2015. Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2;3. *The Plant Cell*, 27(4), 1352–1366.
- Briskin D., 1994. Membranes and transport systems in plants: An overview. *Weed Science*, 42(2), 255-262.
- Calabrese S., Pérez-Tienda J., Ellerbeck M., Arnould C., Chatagnier O., Boller T., Schübler A., Brachmann A., Wipf D., Ferrol N., Courty P.-E., 2016. GintAMT3 – A low-affinity ammonium transporter of the arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00679>.
- Casieri L., Ait Lahmidi N., Doidy J., Veneault-Fourrey C., Migeon A., Bonneau L., Courty P. E., Garcia K., Charbonnier M., Delteil A., Brun A., Zimmermann S., Plassard C., Wipf D., 2013. Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza*, 23(8), 597–625.

- Doidy J., Grace E., Kühn C., Simon-Plas F., Casieri L., Wipf D., 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science*, 17(7), 413-422.
- Egamberdieva D., Abd Allah E.F., Teixeira da Silva J.A., 2016. Microbially assisted phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. In: *Plant Metal Interaction-Emerging Remediation Techniques* (P. Ahmad, ed.), Elsevier Inc., 483-498.
- Frey-Klett P., Garbaye J., Tarkka M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *The New Phytologist*, 176(1), 22-36.
- Garcia K., Doidy J., Zimmermann S.D., Wipf D., Courty P.-E., 2016. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in Plant Science*, doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.010.
- Gaude N., Bortfeld S., Duensing N., Lohse M., Krajinski F., 2012. Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal*, 69(3), 510-528.
- Gianinazzi S., Golotte A., Binet M.N., van Tuinen D., Redecker D., Wipf D., 2010. Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.
- Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P., 2009a. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73-83.
- Guether M., Balestrini R., Hannah M., He J., Udvardi M.K., Bonfante P., 2009b. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, 182(1), 200-212.
- Harrison M. J., 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14(10), 2413-2429.
- Harrison M.J., van Buuren M., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 378(6557), 626-629.
- Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J., Shachar-Hill Y., 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 168(3), 687-696.
- Kobae Y., Hata S., 2010. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant and Cell Physiology*, 51(3), 341-353.
- Koegel S., Ait Lahmidi N., Arnould C., Chatagnier O., Walder F., Ineichen K., Boller T., Wipf D., Wiemken A., Courty P.-E., 2013. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: Two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 198(3), 853-865.
- Krügel U., Kuhn C., 2013. Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein-protein interactions. *Frontiers in Plant Science*, 4, 237.
- Léran S., Varala K., Boyer J. C., Chiurazzi M., Crawford N., Daniel-Vedele F., David L., Dickstein R., Fernandez E., Forde B., Gassmann W., Geiger D., Gojon A., Gong J. M., Halkier B. A., Harris J. M., Hedrich R., Limami A. M., Rentsch D., Seo M., Tsay Y. F., Zhang M., Coruzzi G., Lacombe B., 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Sciences*, 19(1), 5-9.
- Lugtenberg B., Kamilova F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541-556.
- Manck-Götzenberger J., Requena N., 2016. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Frontiers in Plant Science*, 7, 487.
- Pérez-Tienda J., Testillano P.S., Balestrini R., Fiorilli V., Azcón-Aguilar C., Ferrol N., 2011. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(11), 1044-1055.

- Pérez-Tienda J., Valderas A., Camañes G., García-Agustín P., Ferrol N., 2012. Kinetics of NH_4^+ uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*, 22(6), 485–491.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E., 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920–1921.
- Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T., 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: Comparing effects of five plant species. *Plant and Soil*, 238(2), 325–333.
- Smith S.E., Read D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, London, 800 p.
- Tian H., Drijber R.A., Li X., Miller D.N., Wienhold B.J., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi differ in their ability to regulate the expression of phosphate transporters in maize (*Zea mays* L.). *Mycorrhiza*, 23(6), 507–514.
- Tisserant E., Kohler A., Dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard A., Croll D., Da Silva C., Gomez SK., Koul R., Ferrol N., Fiorilli V., Formey D., Franken P., Helber N., Hijri M., Lanfranco L., Lindquist E., Liu Y., Malbreil M., Morin E., Poulain J., Shapiro H., van Tuinen D., Waschke A., Azcón-Aguilar C., Bécard G., Bonfante P., Harrison M.J., Küster H., Lammers P., Paszkowski U., Requena N., Rensing S.A., Roux C., Sanders I.R., Shachar-Hill Y., Tuskan G., Young J.P., Gianinazzi-Pearson V., Martin F., 2012. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist*, 193(3), 755–769.
- Volante A., Lingua G., Cesaro P., Cresta A., Puppo M., Ariati L., Berta G., 2005. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*, 16(1), 43–50.
- Walder F., Brulé D., Koegel S., Wiemken A., Boller T., Courty P.-E., 2015. Plant phosphorus acquisition in a common mycorrhizal network: regulation of phosphate transporter genes of the Pht1 family in sorghum and flax. *New Phytologist*, 205(4), 1632–1645.
- Walder F., Niemann H., Natarajan M., Lehmann M.F., Boller T., Wiemken A., 2012. Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology*, 159(2), 789–797.
- Zheng C., Ji B., Zhang J., Zhang F., Bever J.D., 2015. Shading decreases plant carbon preferential allocation towards the most beneficial mycorrhizal mutualist. *New Phytologist*, 205(1), 361–368.

Annexe 2 relative au chapitre III

Analyse de l'interactome des transporteurs de sucres chez *A. thaliana*

Tableau A2.1 : Tableau récapitulatif des trois familles de transporteurs de sucres retrouvées chez *A. thaliana*, avec leurs noms, leurs numéros d'accessions (TAIR) ainsi que la prédiction de leur localisation cellulaire, trouvés sur le site TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>). La colonne de droite indique pour chaque transporteur la présence (vert) ou l'absence (rouge) d'interactants trouvés sur la base de données MIND.

Sugar Transporters	Sugar Family	Accession number	TAIR predicted localisation	Interactants found in MIND
AtSUC1	SUC/SUT	AT1G71880	vacuolar membrane	
AtSUC2		AT1G22710	plasma membrane	
AtSUC3		AT2G02860	golgi membrane	
AtSUC4		AT1G09960	vacuolar membrane	
AtSUC5		AT1G71890	plasma membrane	
AtSUC6		AT5G43610	plasma membrane	
AtSUC7		AT1G66570	plasma membrane	
AtSUC8		AT2G14670	plasma membrane	
AtSUC9		AT5G06170	plasma membrane	
AtSWEET1	SWEET	AT1G21460	endoplasmic reticulum membrane	
AtSWEET2		AT3G14770	plasma membrane	
AtSWEET3		AT5G53190	plasma membrane	
AtSWEET4		AT3G28007	plasma membrane	
AtSWEET5		AT5G62850	plasma membrane	
AtSWEET6		AT1G66770	chloroplast membrane	
AtSWEET7		AT4G10850	plasma membrane	
AtSWEET8		AT5G40260	plasma membrane	
AtSWEET9		AT2G39060	golgi membrane	
AtSWEET10		AT5G50790	plasma membrane	
AtSWEET11		AT3G48740	plasma membrane	
AtSWEET12		AT5G23660	plasma membrane	
AtSWEET13		AT5G50800	plasma membrane	
AtSWEET14		AT4G25010	plasma membrane	
AtSWEET15		AT5G13170	golgi membrane	
AtSWEET16		AT3G16690	vacuolar membrane	
AtSWEET17		AT4G15920	vacuolar membrane	
AtSTP1	MST	AT1G11260	vacuolar membrane	
AtSTP2		AT1G07340	plasma membrane	
AtSTP3		AT5G61520	membrane	
AtSTP4		AT3G19930	plasma membrane	
AtSTP5		AT1G34580	plasma membrane	
AtSTP6		AT3G05960	membrane	
AtSTP7		AT4G19930	nucleus membrane	
AtSTP8		AT5G26250	membrane	
AtSTP9		AT1G50310	membrane	
AtSTP10		AT3G19940	plasma membrane	
AtSTP11		AT5G23270	membrane	
AtSTP12		AT4G21480	plasma membrane	
AtSTP13		AT5G26340	plasma membrane	
AtSTP14		AT1G77210	plasma membrane	
At5G59250	AT5G59250	chloroplast membrane		
AtVGT1	AT3G03090	vacuolar membrane		

AtVGT2	AT5G17010	chloroplast membrane	
AtPLT1	AT2G16120	membrane	
AtPLT2	AT2G16130	membrane	
AtPLT3	AT2G18480	plasma membrane	
AtPLT4	AT2G20780	plasma membrane	
AtPLT5	AT3G18830	plasma membrane	
AtPLT6	AT4G36670	plasma membrane	
AtINT1	AT2G43330	vacuolar membrane	
AtINT2	AT1G30220	plasma membrane	
AtINT3	AT2G35740	plasma membrane	
AtINT4	AT4G16480	plasma membrane	
AtTMT1	AT1G20840	vacuolar membrane	
AtTMT2	AT4G35300	vacuolar membrane	
AtTMT3	AT3G51490	vacuolar membrane	
AtGLT1	AT5G16150	chloroplast membrane	
At1G05030	AT1G05030	chloroplast membrane	
AtSGB1	AT1G79820	golgi membrane	
At1G67300	AT1G67300	chloroplast membrane	
AtESL1	AT1G08920	vacuolar membrane	
AtESL2	AT1G08900	membrane	
AtESL3	AT1G08890	chloroplast membrane	
AtERD6	AT1G08930	endoplasmic reticulum membrane	
At1G54730	AT1G54730	plasma membrane	
At1G75220	AT1G75220	vacuolar membrane	
At3G05150	AT3G05150	nucleus membrane	
At3G05400	AT3G05400	membrane	
At4G04750	AT4G04750	plasma membrane	
AtSFP1	AT5G27350	plasma membrane	
AtSFP2	AT5G27360	plasma membrane	
At1G19450	AT1G19450	vacuolar membrane	
At2G48020	AT2G48020	chloroplast membrane	
At3G05155	AT3G05155	plasma membrane	
At3G05160	AT3G05160	membrane	
At3G05165	AT3G05165	membrane	
At3G20460	AT3G20460	plasma membrane	
At4G04760	AT4G04760	plasma membrane	
At5G18840	AT5G18840	plasma membrane	

Tableau A2.2 : Liste des transporteurs de sucres pour lesquels des interactants ont été identifiés sur la base de données MIND, avec le nombre d'interactants retrouvés en fonction de chaque force testées et le total de ces derniers.

Sugar Transporters	Sugar Family	Accession number	TAIR predicted localisation	Number of interactants			Total	
				4+	3+	2+		
AtSUC1	SUT/SUC	AT1G71880	vacuolar membrane	0	0	1	1	
AtSUC2		AT1G22710	plasma membrane	13	4	14	31	
AtSUC4		AT1G09960	vacuolar membrane	3	2	25	30	
AtSUC9		AT5G06170	plasma membrane	1	1	2	4	
AtSWEET1	SWEET	AT1G21460	endoplasmic reticulum membrane	7	18	19	44	
AtSWEET2		AT3G14770	plasma membrane	2	18	9	29	
AtSWEET3		AT5G53190	plasma membrane	3	6	6	15	
AtSWEET5		AT5G62850	plasma membrane	27	29	56	112	
AtSWEET7		AT4G10850	plasma membrane	25	13	19	57	
AtSWEET9		AT2G39060	golgi membrane	19	14	8	41	
AtSWEET11		AT3G48740	plasma membrane	0	3	3	6	
AtSWEET12		AT5G23660	plasma membrane	1	14	1	16	
AtSWEET15		AT5G13170	golgi membrane	18	2	6	26	
AtSWEET16		AT3G16690	vacuolar membrane	6	12	14	32	
AtESL3		MST	AT1G08890	chloroplast membra	22	6	12	40
AtESL1			AT1G08920	vacuolar membrane	9	19	20	48
AtSTP1	AT1G11260		vacuolar membrane	1	0	2	3	
At1g54730	AT1G54730		plasma membrane	7	16	33	56	
At1g67300	AT1G67300		chloroplast membrane	0	0	1	1	
At1g75220	AT1G75220		vacuolar membrane	2	0	0	2	
AtSGB1	AT1G79820		golgi membrane	0	1	21	22	
AtINT1	AT2G43330		vacuolar membrane	17	12	14	43	
At3g05150	AT3G05150		nucleus membrane	22	5	13	40	
At3G05400	AT3G05400		membrane	1	3	5	9	
AtSTP6	AT3G05960		membrane	0	0	1	1	
AtSTP4	AT3G19930		plasma membrane	17	10	16	43	
At4g04750	AT4G04750		plasma membrane	26	5	5	36	
AtINT4	AT4G16480		plasma membrane	3	10	20	33	
AtGLT1	AT5G16150		chloroplast membrane	4	10	5	19	
AtVGT2	AT5G17010		chloroplast membrane	12	6	10	28	
AtSTP11	AT5G23270		membrane	0	1	3	4	
AtSFP1	AT5G27350		plasma membrane	29	3	12	44	
At3g05160	AT3G05160		membrane	0	1	2	3	
AtTMT1	AT1G20840		vacuolar membrane	0	0	1	1	

Tableau A2.3 : Différentes conditions de traitements trouvées dans la carte d'expression « organe » et « stade de développement » de la plante (utilisées dans la Figure III.3).

Tissue cluster	Tissues	Age
root	roots	7 days
	roots	17 days
	root	15 days
	root	8 days
	root	8 days
	root	21 days
	root	21 days
stem	hypocotyl	7 days
	1st node	21+ days
	stem, 2nd internode	21+ days
leaf	cotyledons	7 days
	leaves 1 + 2	7 days
	rosette leaf #4, 1 cm long	10 days
	rosette leaf #4, 1 cm long	10 days
	rosette leaf # 2	17 days
	rosette leaf # 4	17 days
	rosette leaf # 6	17 days
	rosette leaf # 8	17 days
	rosette leaf # 10	17 days
	rosette leaf # 12	17 days
	rosette leaf # 12	17 days
	leaf 7, petiole	17 days
	leaf 7, proximal half	17 days
	leaf 7, distal half	17 days
	leaf	15 days
	senescing leaves	35 days
cauline leaves	21+ days	
whole plant	seedling, green parts	7 days
	seedling, green parts	8 days
	seedling, green parts	8 days
	seedling, green parts	21 days
	seedling, green parts	21 days
	entire rosette after transition to flowering, but before bolting	21 days
	as above	22 days
	as above	23 days
	vegetative rosette	7 days
	vegetative rosette	14 days
	vegetative rosette	21 days
	apex	shoot apex, vegetative + young leaves
shoot apex, vegetative		7 days
shoot apex, transition (before bolting)		14 days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21 days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
shoot apex, inflorescence (after bolting)		21+ days
flowers	flowers	21+ days
	flowers	21+ days
	flowers	21+ days
	flower stage; multi-carpel gynoecium; enlarged meristem; increased organ number	21+ days
	flower ; shoot characteristics; most organs leaf-like	21+ days
	flower ; sepals replaced by leaf-like organs, petals mostly lacking, has secondary flowers	21+ days
	flower ; no sepals or petals	21+ days
	flower ; filamentous organs in whorls two and three	21+ days

	flower ; no petals or stamens	21+ days
	flower ; no stamens or carpels	21+ days
	flowers	21+ days
	flowers	28 days
seeds	siliques, mid globular to early heart embryos	8 wk
	siliques, early to late heart embryos	8 wk
	siliques, late heart to mid torpedo embryos	8 wk
	seeds, mid to late torpedo embryos	8 wk
	seeds, late torpedo to early walking-stick embryos	8 wk
	seeds, walking-stick to early curled cotyledons embryos	8 wk
	seeds, curled cotyledons to early green cotyledons embryos	8 wk
	seeds, green cotyledons embryos	8 wk

Tableau A2.4. : Différentes conditions de traitements retrouvées dans la carte d'expression « stress abiotiques » (utilisées dans la Figure III.4).

Tissue cluster	Tissues	Stress	Time	Treatment
control, aerial	seedling, green parts	untreated	0 h	Control: No treatment at all
		mock	0.25 h	Control: plants were treated like the real treated plants; that means: Get boxes out of the climate chamber. Open the magenta box and lift the raft as long as the real treatment lasts. Then put them back in the climate chamber. Harvested 0,25 h after start of experiment
		mock	0.5 h	As above. Harvested 0,5 h after start of experiment
		mock	1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
		mock	3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
		mock	4 h	As above. Harvested 4 h after start of experiment
		mock	6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
		mock	12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
control, root	root	untreated	0 h	Control: No treatment at all
		mock	0.25 h	As above. Harvested 0,25 h after start of experiment
		mock	0.5 h	As above. Harvested 0,5 h after start of experiment
		mock	1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
		mock	3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
		mock	4 h	As above. Harvested 4 h after start of experiment
		mock	6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
		mock	12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
osmotic, aerial	seedling, green parts	osmotic	0.5 h	Mannitol was added to a concentration of 300 mM in the media. The boxes were put back to the climate chamber. Harvested 0,5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
osmotic, root	root	osmotic	0.5 h	As above. Harvested 0.5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
salt, aerial	seedling, green parts	salt	0.5 h	NaCl was added to a concentration of 150 mM in the Media. The boxes were put back to the climate camber. Harvested 0,5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
salt, root	root	salt	0.5 h	As above. Harvested 0.5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
drought, aerial	seedling, green parts	drought	0.25 h	Plants were stressed by 15 min. dry air stream (clean bench) until 10% loss of fresh weight; then incubation in closed vessels back in the climate chamber. Harvested 0,25 h after start of experiment
			0.5 h	As above. Harvested 0,5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
	root	drought	0.25 h	As above. Harvested 0,25 h after start of experiment

drought, root			0.5 h	As above. Harvested 0,5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
oxidative, aerial	seedling, green parts	oxidative	0.5 h	Methyl viologen was added to a final concentration of 10 μ M in the media. The boxes were put back to the climate chamber. Harvested 0.5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment
oxidative, root	root	oxidative	0.5 h	As above. Harvested 0,5 h after start of experiment
			1 h	As above. Harvested 1 h after start of experiment
			3 h	As above. Harvested 3 h after start of experiment
			6 h	As above. Harvested 6 h after start of experiment
			12 h	As above. Harvested 12 h after start of experiment
			24 h	As above. Harvested 24 h after start of experiment

Tableau A2.5 : Différentes conditions de traitements retrouvées dans la carte d'expression « stress biotiques » (utilisées dans la Figure III.5).

Tissue cluster	Tissue	Time	Treatment	Legend
<i>Pseudomonas</i>	leaf	0 h	untreated, harvested after 0h	T1
		2 h	infiltrated with 10 mM MgCl ₂ harvested after 2h	T2
		6 h	As above, leaves harvested after 6h	T3
		24 h	As above, leaves harvested after 24h	T4
		2 h	infiltrated with 10 ⁸ cfu/ml <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 harvested after 2h	T5
		6 h	As above, leaves harvested after 6h	T6
		24 h	As above, leaves harvested after 24h	T7
		2 h	infiltrated with 10 ⁸ cfu/ml <i>P. syringae</i> pv. tomato avrRpm1 harvested after 2h	T8
		6 h	As above, leaves harvested after 6h	T9
		24 h	As above, leaves harvested after 24h	T10
		2 h	infiltrated with 10 ⁸ cfu/ml <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 hrcC- harvested after 2h	T11
		6 h	As above, leaves harvested after 6h	T12
		24 h	As above, leaves harvested after 24h	T13
		2 h	infiltrated with 10 ⁸ cfu/ml <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola harvested after 2h	T14
		6 h	As above, leaves harvested after 6h	T15
		24 h	As above, leaves harvested after 24h	T16
<i>Phytophthora</i>	leaf	6 h	plants were moved to growth chamber with 20°C day/18°C night. As many as possible 10 µl-drops per leaf of water. Leaves harvested after 6h	T17
		12 h	As above. Leaves harvested after 12h	T18
		24 h	As above. Leaves harvested after 24h	T19
		6 h	plants were moved to growth chamber with 20°C day/18°C night. As many as possible 10 µl-drops per leaf of a suspension of 10 ⁶ <i>P. infestans</i> spores/ml. Leaves harvested after 6h	T20
		12 h	As above. As many as possible 10 µl-drops per leaf of a suspension of 10 ⁶ <i>P. infestans</i> spores/ml. Leaves harvested after 12h	T21
		24 h	As above. As many as possible 10 µl-drops per leaf of a suspension of 10 ⁶ <i>P. infestans</i> spores/ml. Leaves harvested after 24h	T22
elicitors	leaf	1 h	infiltrated with water, leaves harvested after 1h	T23
		4 h	infiltrated with water, leaves harvested after 4h	T24
		1 h	infiltrated with 1mM CaCl ₂ + 2.5 mM MgCl ₂ , leaves harvested after 1h	T25
		4 h	infiltrated with 1mM CaCl ₂ + 2.5 mM MgCl ₂ , leaves harvested after 4h	T26
		1 h	infiltrated with 1µM GST, leaves harvested after 1h	T27
		4 h	infiltrated with 1µM GST, leaves harvested after 4h	T28
		1 h	infiltrated with 10 µM HrpZ, leaves harvested after 1h	T29
		4 h	infiltrated with 10 µM HrpZ, leaves harvested after 4h	T30
		1 h	infiltrated with 1 µM GST-NPP1, leaves harvested after 1h	T31
		4 h	infiltrated with 1 µM GST-NPP1, leaves harvested after 4h	T32
		1 h	infiltrated with 1 µM flg22, leaves harvested after 1h	T33
		4 h	infiltrated with 1 µM flg22, leaves harvested after 4h	T34
		1 h	infiltrated with 100 µg/ml LPS, leaves harvested after 1h	T35
		4 h	infiltrated with 100 µg/ml LPS, leaves harvested after 4h	T36

Tableau A2.6 : Liste des 296 protéines membranaires et/ou en périphérie de la membrane trouvées sur le réseau présenté en Figure III.7 en interaction avec les transporteurs de sucres. La localisation cellulaire, la fonction biologique (GoSlim) de chaque interactant se trouve également dans le tableau ci-dessous, avec le nombre d'interactions trouvé pour chaque famille de transporteurs (total de 920 interactions).

Interactant protéins	MIND prédictie localisation	Biological function	SUT	SWEET	MST
AT3G54300	cytosol	cell organization and biogenesis	0	1	0
AT3G63150	mitochondrion	cell organization and biogenesis	0	1	0
AT5G44930	extracellular	cell organization and biogenesis	0	1	0
AT5G52240	endoplasmic reticulum	cell organization and biogenesis	0	4	4
AT1G01070	plasma membrane	developmental processes	0	0	1
AT1G34210	plasma membrane	developmental processes	0	1	0
AT1G67890	nucleus	developmental processes	0	1	0
AT2G44080	plasma membrane	developmental processes	0	1	0
AT3G30180	endoplasmic reticulum	developmental processes	0	1	0
AT3G46740	plastid	developmental processes	0	0	1
AT3G57650	endoplasmic reticulum	developmental processes	0	1	3
AT3G59900	plasma membrane	developmental processes	0	0	1
AT4G03560	plasma membrane	developmental processes	0	1	1
AT4G27630	plasma membrane	developmental processes	0	1	0
AT4G28580	mitochondrion	developmental processes	0	0	1
AT5G37890	unknown	developmental processes	0	0	1
AT5G59030	plasma membrane	developmental processes	0	1	0
AT1G05580	plasma membrane	other biological processes	0	1	1
AT1G16150	plasma membrane	other biological processes	0	0	1
AT1G21880	extracellular	other biological processes	0	0	1
AT1G66160	nucleus	other biological processes	1	0	0
AT2G30490	endoplasmic reticulum	other biological processes	1	1	0
AT2G36305	plasma membrane	other biological processes	0	1	1
AT3G26940	unknown	other biological processes	0	1	0
AT4G30850	cytosol	other biological processes	2	7	10
AT4G37680	plasma membrane	other biological processes	0	5	10
AT5G06100	nucleus	other biological processes	0	2	3
AT5G20270	vacuole	other biological processes	0	1	2
AT5G37500	plasma membrane	other biological processes	0	0	1
AT5G57940	plasma membrane	other biological processes	0	0	1
AT1G09960	vacuole	other cellular processes	0	0	1
AT1G11050	plasma membrane	other cellular processes	0	0	1
AT1G14700	extracellular	other cellular processes	0	5	6
AT1G20490	peroxisome	other cellular processes	0	0	2
AT1G34640	extracellular	other cellular processes	1	4	10
AT1G47220	nucleus	other cellular processes	0	0	1
AT1G63110	plasma membrane	other cellular processes	0	2	8
AT2G17020	nucleus	other cellular processes	1	0	0
AT2G28990	plasma membrane	other cellular processes	0	0	1
AT2G31280	nucleus	other cellular processes	0	1	0
AT2G40830	nucleus	other cellular processes	1	0	0

AT3G42640	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT3G54180	cytosol	other cellular processes	1	0	0
AT3G54260	extracellular	other cellular processes	0	0	2
AT3G56100	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT3G60820	cytosol	other cellular processes	0	0	2
AT3G66654	mitochondrion	other cellular processes	0	8	10
AT4G04540	plasma membrane	other cellular processes	0	0	1
AT4G14690	plastid	other cellular processes	0	1	1
AT4G16444	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT4G17895	nucleus	other cellular processes	0	1	0
AT4G21380	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT4G21390	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT4G25360	extracellular	other cellular processes	1	4	6
AT4G36830	plasma membrane	other cellular processes	0	1	0
AT5G07340	endoplasmic reticulum	other cellular processes	0	1	0
AT5G18580	nucleus	other cellular processes	1	0	0
AT5G23050	unknown	other cellular processes	1	0	0
AT5G24970	mitochondrion	other cellular processes	1	0	0
AT5G42200	plasma membrane	other cellular processes	1	0	0
AT5G42980	cytosol	other cellular processes	0	3	8
AT1G16260	plasma membrane	other metabolic processes	1	0	0
AT1G17280	cytosol	other metabolic processes	1	9	11
AT1G31420	plasma membrane	other metabolic processes	0	0	1
AT1G45145	cytosol	other metabolic processes	0	0	3
AT1G59730	cytosol	other metabolic processes	0	1	8
AT1G64900	endoplasmic reticulum	other metabolic processes	0	1	0
AT1G78970	cytosol	other metabolic processes	1	0	0
AT2G35520	plasma membrane	other metabolic processes	1	0	0
AT2G40890	endoplasmic reticulum	other metabolic processes	0	1	0
AT2G41490	plasma membrane	other metabolic processes	0	0	1
AT2G45560	endoplasmic reticulum	other metabolic processes	1	0	0
AT2G48150	cytosol	other metabolic processes	0	1	0
AT3G03210	plasma membrane	other metabolic processes	1	4	6
AT3G17000	cytosol	other metabolic processes	0	5	7
AT3G18930	nucleus	other metabolic processes	1	0	0
AT3G26830	endoplasmic reticulum	other metabolic processes	0	1	0
AT3G42950	unknown	other metabolic processes	0	1	0
AT3G61880	endoplasmic reticulum	other metabolic processes	0	1	0
AT4G04570	plasma membrane	other metabolic processes	0	4	4
AT4G04850	plastid	other metabolic processes	0	0	1
AT4G38690	cytosol	other metabolic processes	0	2	2
AT5G11870	plasma membrane	other metabolic processes	0	1	0
AT5G59650	plasma membrane	other metabolic processes	0	7	6
AT5G61570	extracellular	other metabolic processes	0	1	0
AT5G63030	cytosol	other metabolic processes	0	7	11
AT5G64210	mitochondrion	other metabolic processes	0	1	0

AT5G66080	plasma membrane	other metabolic processes	0	0	2
AT5G67130	unknown	other metabolic processes	1	0	0
AT1G13270	plastid	protein metabolism	0	1	0
AT1G25510	extracellular	protein metabolism	0	1	0
AT2G42350	nucleus	protein metabolism	1	0	0
AT4G04510	plasma membrane	protein metabolism	0	1	0
AT4G10150	nucleus	protein metabolism	1	0	0
AT4G20790	plasma membrane	protein metabolism	0	8	7
AT4G29330	endoplasmic reticulum	protein metabolism	0	0	1
AT5G43710	endoplasmic reticulum	protein metabolism	0	0	1
AT5G58150	plasma membrane	protein metabolism	0	0	1
AT5G63710	plasma membrane	protein metabolism	0	0	1
AT1G19320	extracellular	response to abiotic or biotic stimulus	0	1	0
AT1G31812	cytosol	response to abiotic or biotic stimulus	0	2	3
AT2G17860	extracellular	response to abiotic or biotic stimulus	0	0	1
AT2G29100	plasma membrane	response to abiotic or biotic stimulus	0	0	2
AT3G11660	plasma membrane	response to abiotic or biotic stimulus	1	0	0
AT3G19260	endoplasmic reticulum	response to abiotic or biotic stimulus	0	0	1
AT3G23000	cytosol	response to abiotic or biotic stimulus	0	1	0
AT4G34220	vacuole	response to abiotic or biotic stimulus	0	1	0
AT4G37370	endoplasmic reticulum	response to abiotic or biotic stimulus	0	3	1
AT5G49630	vacuole	response to abiotic or biotic stimulus	0	1	0
AT5G54720	cytosol	response to abiotic or biotic stimulus	0	1	0
AT5G57685	plasma membrane	response to abiotic or biotic stimulus	0	0	1
AT1G04120	vacuole	response to stress	0	1	0
AT1G19570	cytosol	response to stress	0	1	1
AT1G35720	cytosol	response to stress	0	1	0
AT1G57870	nucleus	response to stress	0	1	0
AT1G65690	plasma membrane	response to stress	1	8	6
AT1G79340	cytosol	response to stress	0	1	0
AT3G17020	cytosol	response to stress	0	2	0
AT3G17210	cytosol	response to stress	0	1	0
AT3G17510	cytosol	response to stress	0	1	0
AT3G21630	plasma membrane	response to stress	0	0	1
AT3G51610	unknown	response to stress	0	0	1
AT4G12000	plasma membrane	response to stress	0	0	1
AT4G12030	plastid	response to stress	0	1	0
AT5G06320	plasma membrane	response to stress	1	5	8
AT5G10860	mitochondrion	response to stress	1	0	0
AT5G47910	plasma membrane	response to stress	0	1	0
AT5G51060	plasma membrane	response to stress	0	1	2
AT5G63770	plasma membrane	response to stress	2	2	2
AT1G21240	plasma membrane	signal transduction	0	7	12
AT1G61950	plasma membrane	signal transduction	0	1	0
AT2G17700	nucleus	signal transduction	0	1	0
AT3G48040	plasma membrane	signal transduction	0	2	2

AT3G48260	nucleus	signal transduction	0	2	3
AT4G04695	cytosol	signal transduction	0	1	0
AT4G34440	nucleus	signal transduction	0	1	1
AT5G01820	cytosol	signal transduction	1	0	0
AT5G05670	cytosol	signal transduction	0	1	0
AT5G23580	plasma membrane	signal transduction	0	1	0
AT5G52210	plasma membrane	signal transduction	0	0	1
AT5G59940	nucleus	signal transduction	0	0	1
AT5G64813	nucleus	signal transduction	0	0	1
AT1G01620	plasma membrane	transport	1	1	1
AT1G04440	cytosol	transport	0	1	0
AT1G08770	plasma membrane	transport	0	2	0
AT1G10090	plasma membrane	transport	0	1	0
AT1G11450	plasma membrane	transport	0	1	0
AT1G21870	golgi	transport	0	1	0
AT1G25380	mitochondrion	transport	0	0	1
AT1G29060	cytosol	transport	2	8	9
AT1G44100	plasma membrane	transport	1	0	0
AT1G47240	plasma membrane	transport	0	1	0
AT1G48440	extracellular	transport	0	1	0
AT1G52190	plasma membrane	transport	0	0	1
AT1G70760	plastid	transport	0	1	1
AT2G01660	plasma membrane	transport	0	1	0
AT2G28315	vacuole	transport	0	1	2
AT2G33110	endoplasmic reticulum	transport	1	0	0
AT2G40540	plasma membrane	transport	0	1	0
AT2G47600	plasma membrane	transport	0	1	1
AT3G05160	plasma membrane	transport	1	0	1
AT3G07680	extracellular	transport	0	1	0
AT3G10640	nucleus	transport	0	5	12
AT3G12180	plasma membrane	transport	0	8	10
AT3G17440	cytosol	transport	0	1	0
AT3G18480	golgi	transport	0	0	1
AT3G19930	plasma membrane	transport	0	0	1
AT3G28050	plasma membrane	transport	0	0	1
AT3G28100	plasma membrane	transport	1	0	0
AT3G28130	plasma membrane	transport	0	1	0
AT3G47960	plasma membrane	transport	0	0	1
AT3G49310	plasma membrane	transport	0	1	0
AT3G49420	plasma membrane	transport	0	0	1
AT3G56440	cytosol	transport	0	1	0
AT3G59360	plasma membrane	transport	0	1	0
AT4G00430	plasma membrane	transport	0	0	2
AT4G14455	golgi	transport	1	6	10
AT4G14815	extracellular	transport	0	0	1
AT4G16620	plasma membrane	transport	0	1	0

AT4G18205	plasma membrane	transport	0	1	1
AT4G19960	plasma membrane	transport	0	1	0
AT4G23010	plasma membrane	transport	0	0	1
AT4G23400	plasma membrane	transport	0	1	1
AT4G35860	cytosol	transport	0	0	1
AT4G39890	golgi	transport	0	1	0
AT5G03345	plasma membrane	transport	0	1	2
AT5G09400	vacuole	transport	0	1	0
AT5G09470	mitochondrion	transport	0	1	0
AT5G12860	plastid	transport	0	0	1
AT5G18290	endoplasmic reticulum	transport	0	1	0
AT5G26980	mitochondrion	transport	0	1	0
AT5G45130	plasma membrane	transport	1	0	0
AT5G49990	plasma membrane	transport	0	0	1
AT5G52860	plasma membrane	transport	0	1	0
AT1G05640	cytosol	unknown	0	0	1
AT1G07860	plasma membrane	unknown	1	3	5
AT1G08500	extracellular	unknown	0	1	0
AT1G11940	mitochondrion	unknown	0	0	3
AT1G12310	cytosol	unknown	0	1	0
AT1G12450	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT1G13770	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT1G14020	extracellular	unknown	0	1	1
AT1G16170	plasma membrane	unknown	0	1	1
AT1G22750	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT1G27290	extracellular	unknown	0	3	9
AT1G30320	nucleus	unknown	0	1	0
AT1G31300	plastid	unknown	1	0	0
AT1G45010	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT1G47640	extracellular	unknown	1	7	10
AT1G49470	unknown	unknown	0	1	0
AT1G63120	plasma membrane	unknown	0	4	8
AT1G65720	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT1G66300	cytosol	unknown	0	0	1
AT1G68680	plastid	unknown	0	0	1
AT1G71140	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT1G74370	plasma membrane	unknown	1	0	0
AT1G76185	plasma membrane	unknown	0	0	2
AT1G76830	cytosol	unknown	0	0	1
AT1G77350	extracellular	unknown	0	1	1
AT1G78850	extracellular	unknown	0	1	0
AT2G07771	unknown	unknown	0	1	0
AT2G14255	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT2G16030	extracellular	unknown	0	3	1
AT2G18780	cytosol	unknown	1	0	0
AT2G21160	endoplasmic reticulum	unknown	0	1	3

AT2G22180	nucleus	unknown	0	2	0
AT2G22425	endoplasmic reticulum	unknown	0	7	9
AT2G23780	nucleus	unknown	1	0	0
AT2G24170	plasma membrane	unknown	1	0	0
AT2G24250	nucleus	unknown	0	0	2
AT2G24940	cytosol	unknown	0	0	1
AT2G26180	nucleus	unknown	1	9	12
AT2G27290	plastid	unknown	0	2	1
AT2G29020	plasma membrane	unknown	1	0	0
AT2G32380	plasma membrane	unknown	0	2	0
AT2G36760	extracellular	unknown	0	0	1
AT2G41705	plasma membrane	unknown	0	7	9
AT2G42770	peroxisome	unknown	0	1	0
AT3G03330	extracellular	unknown	0	0	1
AT3G06360	extracellular	unknown	0	1	0
AT3G06435	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT3G08930	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT3G12350	cytosol	unknown	1	0	0
AT3G13175	extracellular	unknown	2	7	10
AT3G13430	nucleus	unknown	0	0	1
AT3G18250	extracellular	unknown	0	1	0
AT3G18800	plasma membrane	unknown	2	6	11
AT3G21580	plastid	unknown	0	1	1
AT3G21690	vacuole	unknown	1	0	0
AT3G25805	mitochondrion	unknown	0	5	8
AT3G26370	peroxisome	unknown	0	0	1
AT3G28360	unknown	unknown	0	0	1
AT3G43660	unknown	unknown	0	1	0
AT3G48890	extracellular	unknown	0	3	4
AT3G50190	plastid	unknown	0	0	1
AT3G52070	plastid	unknown	0	0	1
AT3G54910	nucleus	unknown	0	1	0
AT3G57880	cytosol	unknown	0	1	0
AT3G62400	mitochondrion	unknown	0	0	1
AT4G00893	unknown	unknown	0	1	0
AT4G01410	plasma membrane	unknown	0	1	2
AT4G02010	plasma membrane	unknown	1	0	1
AT4G02725	plastid	unknown	0	1	0
AT4G03820	plasma membrane	unknown	1	0	0
AT4G05370	extracellular	unknown	0	2	6
AT4G09870	cytosol	unknown	1	0	0
AT4G10640	nucleus	unknown	0	1	0
AT4G12590	plasma membrane	unknown	0	0	1
AT4G14905	plastid	unknown	0	1	0
AT4G17430	extracellular	unknown	0	1	0
AT4G20390	extracellular	unknown	1	1	0

AT4G30460	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT4G30500	plasma membrane	unknown	0	4	5
AT4G30845	plastid	unknown	0	1	0
AT4G32900	mitochondrion	unknown	1	0	0
AT5G03545	extracellular	unknown	0	1	0
AT5G03960	mitochondrion	unknown	0	1	0
AT5G07490	cytosol	unknown	1	2	0
AT5G08139	nucleus	unknown	1	0	0
AT5G08540	plastid	unknown	1	0	0
AT5G11680	extracellular	unknown	0	0	1
AT5G11890	plastid	unknown	2	7	7
AT5G14690	nucleus	unknown	0	1	0
AT5G15500	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT5G19570	plasma membrane	unknown	1	0	0
AT5G21920	plastid	unknown	0	1	2
AT5G25940	extracellular	unknown	0	0	1
AT5G35460	plasma membrane	unknown	0	1	4
AT5G44940	nucleus	unknown	0	0	1
AT5G45095	plasma membrane	unknown	0	1	0
AT5G47180	nucleus	unknown	0	0	5
AT5G49540	plasma membrane	unknown	1	9	9
AT5G50090	nucleus	unknown	0	1	1
AT5G50830	unknown	unknown	0	1	0
AT5G52420	plasma membrane	unknown	0	3	6
AT5G67140	plasma membrane	unknown	0	1	0

Tableau A2.7 : Liste des gènes surexprimés dans la condition « stress biotiques » présentés dans la Figure III.9 codant les protéines trouvées sur le réseau Figure III.7 (transporteurs de sucres et/ou interactants).

Accession number	Name of proteins
At1g04440	Casein kinase like 13, CKL13
At1g07860	Serine/Threonine-kinase RLCKVII protein
At1g08770	PRA1.E, prenylated rab acceptor 1
At1g10090	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)
At1g11050	Protein kinase superfamily protein
At1g16150	Wall-Associated kinase -LIKE 4, WAKL4
At1g16170	Ephrin-A3 protein
At1g17280	Ubiquitin-conjugating enzyme 34
AT1G20840	AtTMT1, tonoplast monosaccharide transporter1
At1g21240	Wall-Associated kinase 3
At1G22710	AtSUC2, Sucrose transporter 1, SUT1
At1g22750	Transmembrane protein
At1g27290	Transmembrane protein
At1g29060	Target SNARE coiled-coil domain protein
At1g31300	TRAM, LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein
At1g31420	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At1g31812	ACBP, ACBP6, acyl-coa-binding protein, acyl-coa-binding protein 6
At1g35720	ANN1, annexin 1
At1g44100	AAP5, amino acid permease 5
At1g47240	AtNRAMP2, NRAMP metal ion transporter 2,
At1g49470	Transmembrane epididymal protein (DUF716)
At1g52190	Nitrate transporter 1.11, AtNPF1.2, NRT1.11
At1g57870	Shaggy-like kinase 42
At1g61950	Calcium-dependent protein kinase 19, CPK19
At1g63120	AtRBL2, RBL2, RHOMBOID-LIKE 2
At1g64900	Cytochrome p450, family 89, subfamily a, polypeptide 2, cyp89a2
At1g65720	Transmembrane protein
At1g67890	PAS domain-containing protein tyrosine kinase family protein
At1G71880	AtSUC1, Sucrose-proton symporter 1
At1g74370	RING/U-box superfamily protein
At1g75220	AtERDL6, ERD6-LIKE 6, ERDL6
At1g78970	Lupeol synthase 1
At1g79340	AtMC4, AtMCP2D, Metacaspase 2d, metacaspase 4
At2g17860	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
At2g23780	RING/U-box superfamily protein
At2g24170	Endomembrane protein 70 protein family
At2g24940	AtMAPR2, MAPR2, membrane-associated progesterone binding protein 2
At2g29100	Glutamate receptor 2.9
At2g36760	UDP-glucosyl transferase 73C2, UGT73C2
At2g40830	RING-H2 finger C1A
At2g40890	Cytochrome p450, cyp98a3, family 98, polypeptide 3
At2g41490	GPT, UDP-glcnac-adolichol phosphate glcnac-1-p-transferase
At2G43330	AtINT1, inositol transporter 1,
At2g44080	ARGOS-LIKE, ARL
At2g45560	Cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 1
At2g47600	Unkonwn
At3g03210	Altered xyloglucan 9, AXY9
At3g06360	AtAGP27, AGP27, arabinogalactan protein 27,
At3g10640	SNF7 family protein
At3g11660	NDR1/HIN1-LIKE 1, NHL1
At3g12350	F-box family protein
At3g13430	RING/U-box superfamily protein
At3G14770	AtSWEET2
At3g17000	UBC32, Ubiquitin-conjugating enzyme 32

At3g17020	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
At3g17210	heat stable protein 1
At3g17510	CBL-interacting protein kinase 1, CIPK1
At3g19260	LAG1 homolog 2, LOH2, longevity assurance gene1 homolog 2
At3g19930	AtSTP4, sugar transporter 4
At3g21630	AtCERK1, AtLYK1, CERK1, chitin elicitor receptor kinase 1, LysM RLK1
At3g21690	MATE efflux family protein
At3g23000	AtSR2, ATSRPK1, CBL-interacting protein kinase 7, CIPK7, PKS7,SNRK3.10
At3g26830	CYP71B15, PAD3, phytoalexin deficient 3
At3g26940	CDG1, constitutive differential growth 1
At3g30180	BR6OX2, brassinosteroid-6-oxidase 2, CYP85A2
At3g43660	putative vacuolar iron transporter, AtVTL4
At3g48890	Membrane-associated progesterone binding protein 3, AtMAPR3, AtMP2
At3g49310	Major facilitator superfamily protein
At3g52070	RNA/RNP complex-1-interacting phosphatase
At3g54300	Vesicle-associated membrane protein 727
At3g56440	Yeast autophagy 18 D-like protein
At3g59360	UDP-galactose transporter 6, AtUTR6
At3g62400	Cytochrome C oxidase subunit
At3g63150	Calcium binding GTP-ase, AtCBG, MIRO-RELATED GTP-ASE 2, MIRO2
At4g03560	Calcium channel 1, AtCCH1, fatty acid oxygenation upregulated 2
At4g03820	Transmembrane protein, putative (DUF3537)
At4g04510	Cysteine-rich RLK (receptor-like protein kinase) 38
At4g05370	Unkonwn
At4g12000	SNARE associated Golgi protein family
At4g12030	Bile acid transporter 5
At4g19960	K ⁺ uptake permease 9
At4g20790	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At4g21380	Receptor kinase 3
At4g21390	S-locus lectin protein kinase family protein
At4g23010	UDP-galactose transporter 2, UTR2
At4g23400	PIP1;5, PIP1D, plasma membrane intrinsic protein 1;5, pcr55
At4g25360	TBL18, trichome birefringence-like 18
At4g35860	AtGB2, GTP-binding 2
At4g37370	Cytochrome P450, subfamily d, polypeptide 81, CYP81D8
At4g39890	AtRABH1C, RAB GTPase homolog H1C, RABH1C
At5G06170	AtSUC9, sucrose-proton symporter 9
At5g09470	DIC3, dicarboxylate carrier 3
At5g11680	Classical AGP protein
At5g23050	Acyl-activating enzyme 17
At5g25940	Early nodulin-like protein
At5g35460	Membrane protein
At5g42980	AtH3, AtTRX3, AtTRXH3, thioredoxin h-type 3
At5g45130	Ras small GTP-binding family protein
At5g47180	Plant VAMP (vesicle-associated membrane protein)
At5g47910	AtRBOHD, respiratory burst oxidase homologue D
At5g49630	AAP6, amino acid permease 6
At5g52210	AtARLB1, AtGB1, GB1, GTP-BINDING PROTEIN 1
At5g57940	AtCNGC5, CNGC5, cyclic nucleotide gated channel 5
At5g59030	Copper transporter 1, COPT1
At5g61570	Protein kinase superfamily protein
At5g63710	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At5g63770	AtDGK2, DGK2, diacylglycerol kinase 2
At5g64813	Ras-related small GTP-binding family protein

Tableau A2.8 : Liste des 12 protéines interagissant avec AtRBOHD (Figure III.12) avec leurs fonctions biologiques prédites selon les données de la base MIND.

Nom de la protéine	N° d'accèsion	Fonction biologique prédite
Rab5 (Ras-related protein 5)	At5g49540	Trafic membranaire
PRA1.E (Prenylated Rab Acceptor 1.E)	At1g08770	Trafic membranaire
Annexine 1 (ANN1)	At1g35720	Trafic membranaire et canal perméable Ca ²⁺
UXT1 (UDP-xylose transporter 1)	At2g28315)	Transport d'UDP-xylose
GONST5 (Golgi Nucleotide Sugar Transporter 5)	At1g21870	Transport de mannose-GDP au niveau du Golgi
UTR2 (UDP-galactose transporter 2)	At4g23010	Transport putatif d'UDP-galactose et UDP-glucose an niveau du Golgi
PIP1;5 (Plasma membrane Intrinsic Protein 1;5)	At4g23400	Canal à eau, Aquaporine
Méthyltransférase (S-adenosyl-L-méthionine-dependent methyltransferases)	At2g16030	Activité enzymatique
TH7 (Thioredoxin H-type 7)	At1g59730	Activité enzymatique
PLC-like (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase-like)	At4g38690	Activité enzymatique
IQD6, IQ-domain 6 (or putative SF16 protein)	At2g26180	Protéine se liant aux calmodulines
NHL3 (NDR1/HIN1-like 3, Late Embryogenesis Abundant hydroxyprolinerich glycoprotein)	At5g06320	Réponses aux stress abiotiques (froid et sécheresse) et biotiques

Tableau A2.9 : Liste détaillée des transporteurs de sucres interagissant directement avec les 12 protéines interactantes à AtrbohD (Figure III.12). Le code couleur représente la force d'interaction entre les transporteurs de sucres et les différentes protéines interactantes à rbohD, à savoir la force 4+ en rouge, la force 3+ en bleu et la force 2+ en vert.

RBOHD											
PRA1E	Annexine1	GONST5	Méthyltransférase	UXT1	TH7	PIP1;5	IQD6	PLC	Rab5	UTR2	NLH3
SWEET7	SWEET7	SWEETS	SWEET1	SWEETS	SWEET7	SWEETS	SUC2	SWEETS9	SUC2	At4g04750	SUC2
SWEETS9			SWEETS5	At3g05150	Ar3g05150	At1g54730	SWEET1	SWEET15	SWEET1		SWEET2
			SWEETS9	At1g54730	At4g04750		SWEET2		SWEET2		SWEET3
			Ar3g05150		SFP1		SWEET3		SWEET3		SWEETS5
					STP4		SWEETS5		SWEET5		SWEET7
					INT1		SWEET7		SWEET7		SWEET16
					GLT1		SWEET9		SWEET9		VGT2
					ESL1		SWEET12		SWEET12		INT1
					ESL3		SWEET15		SWEET15		INT4
							SWEET16		SWEET16		ESL1
							STP4		STP4		ESL3
							INT1		VGT2		At1g54730
							INT4		INT1		Ar3g05150
							SGB1		INT4		At4g04750
							GLT1		SGB1		
							ESL1		GLT1		
							ESL3		ESL1		
							SFP1		At1g54730		
							Ar3g05150				
							At4g04750				
							VGT2				
							At1g54730				

Annexe 3 relative au chapitre I, version publiée de l'article

« Differential signaling and sugar exchanges in response to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules in tobacco cells »



Differential Signaling and Sugar Exchanges in Response to Avirulent Pathogen- and Symbiont-Derived Molecules in Tobacco Cells

Carole Pfister*, Stéphane Bourque, Odile Chatagnier, Annick Chiltz, Jérôme Fromentin, Diederik Van Tuinen, Daniel Wipf and Nathalie Leborgne-Castel

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Adi Avni,
Tel Aviv University, Israel

Reviewed by:

Sorina Claudia Popescu,
Mississippi State University,
United States
Maya Bar,
Agricultural Research Organization,
Volcani Center, Israel

*Correspondence:

Carole Pfister
carolejulie.pfister@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 August 2017

Accepted: 30 October 2017

Published: 20 November 2017

Citation:

Pfister C, Bourque S, Chatagnier O, Chiltz A, Fromentin J, Van Tuinen D, Wipf D and Leborgne-Castel N (2017) Differential Signaling and Sugar Exchanges in Response to Avirulent Pathogen- and Symbiont-Derived Molecules in Tobacco Cells. *Front. Microbiol.* 8:2228. doi: 10.3389/fmicb.2017.02228

Plants interact with microbes whose ultimate aim is to exploit plant carbohydrates for their reproduction. Plant-microbe interactions (PMIs) are classified according to the nature of their trophic exchanges: while mutualistic microbes trade nutrients with plants, pathogens unilaterally divert carbohydrates. The early responses following microbe recognition and the subsequent control of plant sugar distribution are still poorly understood. To further decipher PMI functionality, we used tobacco cells treated with microbial molecules mimicking pathogenic or mutualistic PMIs, namely cryptogein, a defense elicitor, and chitotetrasaccharide (CO4), which is secreted by mycorrhizal fungi. CO4 was perceived by tobacco cells and triggered widespread transient signaling components such as a sharp cytosolic Ca²⁺ elevation, NtrbohD-dependent H₂O₂ production, and MAP kinase activation. These CO4-induced events differed from those induced by cryptogein, i.e., sustained events leading to cell death. Furthermore, cryptogein treatment inhibited glucose and sucrose uptake but not fructose uptake, and promoted the expression of *NtSUT* and *NtSWEET* sugar transporters, whereas CO4 had no effect on sugar uptake and only a slight effect on *NtSWEET2B* expression. Our results suggest that microbial molecules induce different signaling responses that reflect microbial lifestyle and the subsequent outcome of the interaction.

Keywords: chitotetrasaccharide, cryptogein, plant-microbe interactions, calcium, ROS, MAPKs, sugar transport, *Nicotiana tabacum*

INTRODUCTION

Throughout their life cycle, plants are exposed to environmental fluctuations that affect their development and functioning. They also have to cope with a range of microbes (e.g., bacteria, fungi, oomycetes) that can be pathogenic or beneficial to plant development. In both pathogenic and mutualistic interactions, plants perceive microbial signals or microbe-associated molecular patterns [carbohydrates, lipids, (glyco)peptides, (glyco)proteins] and develop strategies based on a molecular dialog that involves several specific pattern recognition receptors (Jones and Dangl, 2006; Boller and Felix, 2009). This perception is transduced into signaling events that lead to appropriate responses aimed at controlling the outcome of plant-microbe interactions (PMIs). At first, all microbes (whether pathogenic or beneficial) are initially perceived as invaders and activate similar early signaling pathway events related to plant immunity (Zipfel and Oldroyd, 2017).

In the case of beneficial microbes, this response is subsequently attenuated or modified to allow for symbiosis to establish (Zamioudis and Pieterse, 2012). Plants control microbe populations in and around roots through sugar exudation by initiating a molecular cross-talk with heterotrophic microbes. Root sugar exudates serve as a signal for mutualistic interactions, but unfortunately also attract pathogenic microbes (Bais et al., 2006). Sugars represent the main source of energy used by the cellular machinery for growth and development. In plants, sucrose is the main compound transported from photosynthetically active source leaves to sink tissues (young leaves, flowers, fruit, roots, seeds...) via the phloem (Van Bel, 2003). Alternatively, sucrose or its by-products can be transferred to microbial sinks. Thus, plant colonization or infection by microbes modifies sugar allocation at the whole plant level and increases carbon sink strength (Biemelt and Sonnewald, 2006; Doidy et al., 2012a). Photoassimilate transport requires specific membrane transporters in both plant and fungal partners. Plant sugar transporters are divided into three families. The sucrose transporter (SUT) (Sauer, 2007; Lemoine, 2000) and the monosaccharide transporter (MST) families (Büttner and Sauer, 2000; Büttner, 2007) both belong to the Major Facilitator Superfamily and mainly co-transport sugars with protons. SUTs are involved in the long-distance transport of sucrose from source leaves to microbial sinks (Doidy et al., 2012a). In colonized root cells, sucrose is exported into the apoplast via SUTs and then hydrolyzed into glucose and fructose by plant cell wall or microbial invertases; microbial invertases are only involved in the case of pathogenic interactions (Roitsch and González, 2004). The third sugar transporter family, “Sugars Will Eventually be Exported Transporter” (SWEET), is involved in cellular sugar efflux (Chen et al., 2010). SWEETs play a role in biotrophic exchanges during the development of plant beneficial or pathogenic interactions (Chen et al., 2010, 2015; Yu et al., 2011; Chong et al., 2014; Chandran, 2015; Manck-Götzenberger and Requena, 2016). The capacity of plants to control apoplastic sugar uptake is thus a key determinant for the outcome of these interactions. However, the way microbes manipulate plant carbohydrate transporters at biotrophic interfaces and finally control the outcome of PMIs is still unclear.

To decipher PMI functionality with respect to sugar partitioning regulation, we compared microbial compounds from microbes with opposite trophic strategies. The first of them was cryptogein, a proteinaceous plant defense elicitor secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. It induces a hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR) against various pathogenic microbes in *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*), a non-legume plant (Bonnet et al., 1996). The cryptogein-induced signaling events that lead to gene reprogramming and cell death have been extensively studied (Garcia-Brugger et al., 2006). Within the framework of our study, it is interesting to note that cryptogein blocks glucose uptake in tobacco cells in suspension, with a subsequent decrease in O₂ consumption (Bourque et al., 2002). This energy deficiency promotes cell death as a defense mechanism. However, the impact of cryptogein on the uptake of other sugars or the expression of genes encoding sugar transporters has never been studied.

Our second microbial compound was a mycorrhizal-factor (myc-factor). Myc-factors include lipochitooligosaccharides (LCOs; Maillet et al., 2011) and short chains of non-acylated chitin chitooligosaccharides (COs; Genre et al., 2013) which are involved in the initial stages of arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in plants. The nuclear calcium oscillations induced by these molecules in root epidermal cells of legumes and non-legumes (Genre et al., 2013; Sun et al., 2015) can mimic the oscillations induced by AM fungi (AMF) *in planta* (Kosuta et al., 2008; Chabaud et al., 2011; Genre et al., 2013). LCO and short-CO perception by plant cells induces the common symbiotic signaling pathway (CSSP) involved in the establishment of mycorrhizal and rhizobium-legume symbiosis (Gough and Cullimore, 2011; Oldroyd, 2013). LCOs are less effective in promoting Ca²⁺ responses, so we chose COs to induce the early signaling cascade of a beneficial fungal partner. Among short COs, we selected chitotetrasaccharide (CO4) because it is more active in terms of Ca²⁺ spiking in root cells (Genre et al., 2013). We aimed to determine whether the signaling events induced by microbial molecules from organisms with different lifestyles (pathogenic vs. mycorrhizal) impacted plant sugar partitioning and in turn sugar exchanges between plants and microbes. Evidence that microbes manipulate the host transport system to increase sugar efflux and that host plants attempt in return to restrict apoplastic sugar availability to halt microbe proliferation is still scarce (Ruan, 2014). In addition, the effect of CO4 as a signaling molecule has never been tested on undifferentiated cells cultured in suspension.

In the present paper, we investigate whether putative differences exist in early responses and sugar exchanges in cells submitted to avirulent pathogen- and symbiont- derived molecules. We report for the first time that undifferentiated cells from a non-legume plant respond to a myc-factor. Hence cell suspensions could represent an efficient tool to decipher the signaling pathways induced by these molecules. We also show that in *N. tabacum* cell suspensions, CO4 and cryptogein trigger the same signaling components [(cytosolic calcium, reactive oxygen species (ROS), mitogen-activated protein kinases (MAPKs)], and expression of sugar transporters yet with specific time courses and intensity levels. These findings suggest that defense and mutualistic responses are finely differentiated in the earliest steps after perception.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Preparation

Nicotiana tabacum cv. Xanthi cells wild type (wt) and gp15 cells, which express antisense *NtrbohD* under the constitutive *CaMV35S* promoter (Simon-Plas et al., 2002), were cultivated as previously described by Bourque et al. (2011). Briefly, cells were grown in Chandler's medium (Chandler et al., 1972) on a rotary shaker at 150 rpm at 25°C under continuous light (30–40 μmol.m⁻² s⁻¹). They were sub-cultured to fresh medium [15:100, (v/v)] weekly. For all experiments, 7 day-old cells were diluted to one half in Chandler's medium and cultured overnight. Before treatments, they were filtrated, washed, and resuspended

in I₂ buffer (2 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 5.8) at a rate of 0.15 g fresh weight.mL⁻¹ of I₂ buffer, and equilibrated for 2 h on a rotary shaker under light (150 rpm, 25°C).

Nicotiana tabacum cells expressing cytosolic apoaequorin (Manzoor et al., 2012) were sub-cultured following the same procedure as Xanthi wt cells. Cells were collected during their exponential growth phase, washed by filtration in I₁₀ buffer (10 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 5.8), and resuspended at a rate of 0.15 g fresh weight.mL⁻¹ of I₁₀ buffer. Cell equilibration and *in vivo* reconstitution of aequorin were performed by adding 1 μM of coelenterazine (stock solution in ethanol and storage at -20°C) for at least 3 h in the dark (150 rpm at 25°C) before starting the tests.

Cell Culture Treatments

All basic salts and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (United States), except coelenterazine that was supplied by Calbiochem (Germany).

Cryptogein was purified according to Bonnet et al. (1996) and stored at -20°C in water as a 50 μM stock solution. Tobacco cells were treated with a final concentration of 50 nM cryptogein. Synthetic CO₄ was kindly provided by Guillaume Bécard (LRSV, Castanet-Tolosan, France) and Fabienne Maillet (LIPM, Castanet-Tolosan, France). Stock solutions of CO₄ were prepared in water at 10⁻³ M and stored at -20°C. Xanthi cells were treated with a final concentration of 100 nM CO₄. Diphenyl iodonium (DPI) was prepared in DMSO and added at a final concentration of 5 μM 5 min prior to CO₄ treatment. An equal volume of 0.05% (v/v) of DMSO was added to the control cell suspensions.

Cytosolic Calcium Measurements

After *in vivo* reconstitution of aequorin, luminescence emission was measured using a luminometer (Lumat LB9507, Berthold Technologies, Germany). For this purpose, as described by (Lecourieux et al., 2005; Manzoor et al., 2012), relative luminescence units (RLU) were continuously recorded every second for 60 min. At the end, residual functional aequorin was quantified by adding 300 μL of lysis buffer (10 mM CaCl₂, 2% Nonidet-P40, 10% ethanol v/v), and the resulting increase of luminescence was monitored until it reached the basal level. Luminescence data were transformed into Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]) by using Allen's equation (Allen et al., 1977): $[Ca^{2+}] = \{(L_0/L_{max})^{1/3} + 118(L_0/L_{max})^{1/3} - 1\} / \{7 \times 10^6 - [7 \times 10^6 (L_0/L_{max})^{1/3}]\}$, where L₀ is luminescence intensity (RLU) per second, and L_{max} is the total amount of luminescence in 250 μL of cells.

Quantification of H₂O₂ Production

H₂O₂ production was determined by chemiluminescence as described previously by Simon-Plas et al. (1997) with a few modifications. After a 2-h equilibration period in I₂ buffer, the cell luminescence background of the assay was measured. Then, cells were treated with 100 nM CO₄ or 50 nM cryptogein, and 250 μL of cell suspensions were collected

and transferred into vials in a luminometer and automatically supplemented with 50 μL of a 0.3 mM luminol solution and 300 μL of I₅₀ buffer (50 mM MES, 175 mM mannitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM K₂SO₄, pH 6.5) for RLU measurements for 60 min. At the end, a calibration curve with known amounts of H₂O₂ was drawn: the luminescence of untreated cells was recorded to convert RLU into H₂O₂. Results were expressed in nanomoles of H₂O₂ equivalents per gram of cells.

Protein Extraction

Five mL of cell suspension were sampled 0, 5, 10, 30, and 60 min after cryptogein or CO₄ treatment. Cells were harvested by filtration on GF/A fiberglass filters (Whatman International Ltd., United Kingdom), frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar. Then 250 mg of cell powder were supplemented with 400 μL of protein extraction buffer (50 mM HEPES pH 7.5; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 50 mM β-glycerophosphate; 1 mM Na₃VO₄; 2 mM DTT; 10 mM NaF and 1 mM PMSF). The extracts were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 23,000 × g for 20 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C or supplemented with Laemmli buffer (Laemmli, 1970). Protein concentrations were quantified according to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a reference for protein concentrations.

In-Gel Kinase Activity Assays

Ca²⁺-dependent or independent protein kinase activity was analyzed by in-gel kinase activity assays as previously described by Kameshita and Fujisawa (1989), with a few modifications. Twenty μg of protein extracts were analyzed by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) embedded with two different PK substrates: 0.14 mg.mL⁻¹ histone H1 (H1IS) or 0.25 mg.mL⁻¹ myelin basic protein (MBP). After electrophoresis, SDS was removed by performing two 30-min washes with buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 20% isopropanol v/v), and then two more 30-min washes with buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 5 mM β-mercaptoethanol). Then, the proteins contained in the gel were denatured by two 30-min washing steps in buffer C (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 6 M guanidine; 5 mM β-mercaptoethanol) before being renatured in five successive washes, including one at 4°C with buffer D (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 0.04% Tween 40 v/v; 5 mM β-mercaptoethanol) for 16 h. The gels were equilibrated for 1 h at room temperature with phosphorylation buffer E (40 mM HEPES pH 7.5; 20 mM MgCl₂; 2 mM DTT) with 0.5 mM Ca²⁺ or in the absence of Ca²⁺ (0.1 mM EGTA) followed by 1 h in buffer E supplemented with 15 μM ATP and 15 μCi [γ-³²P]-ATP (PerkinElmer, United States). The phosphorylation reaction was stopped by different gel washes with buffer F (5% TCA w/v; 1% potassium pyrophosphate w/v). Gels were dried 1 h at 80°C (GelDryer, Bio-Rad, United States), and PK activity was revealed by exposure to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics Inc, United States). Autoradiography (Amersham Hyperfilm ECL, United Kingdom) was also carried out.

Immunoblot Analysis

Ten μg of each protein extract were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (HybondC, Amersham, United Kingdom) by semi-dry electroblotting transfer (Trans-Blot SD, Bio-Rad, United States) for 40 min at 15V, using transfer solution [48 mM Tris; 39 mM glycine; 0.0375% SDS (m/v), 20% methanol (v/v)]. A membrane-blocking step was performed for 1 h in TBS-T buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20 (v/v)] supplemented with 2% BSA (m/v) on a rotary shaker before being incubated 1 h at room temperature, with primary polyclonal phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204) antibody (1/5000, Cell Signaling Technology, United States) or primary polyclonal ERK1/2 (total) antibody (1/1000, ab196883 Abcam plc., United Kingdom). Then, three washes were performed with TBS-T for 10 min, and the membranes were incubated 1 h at room temperature with an appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1/10000, Bio-Rad, United States). Immunoreactive proteins were revealed by electro-chemiluminescence (ECL, LumiGLO, Cell Signaling Technology, United States).

Uptake of Radiolabeled Sugars by Tobacco Cells

Radiolabeled sugar uptake was monitored as previously described by Bourque et al. (2002). Sugar uptake was individually measured after the addition of 2 mM of ^{14}C -D-glucose, ^{14}C -D-sucrose or ^{14}C -D-fructose (0.055 MBq.g $^{-1}$ fresh weight (FW) cells, PerkinElmer, United States) 5 min before CO₄ or cryptogeiin treatment. After various processing times (0, 15, 30, 60 min), duplicates of 2 mL of cell suspensions were taken and filtered *via* a vacuum pump on GF/A fiberglass filters (Whatman International Ltd., United Kingdom). The cells were washed twice: 1 min with 10 mL of I₂ buffer, and then 20 s with 5 mL of I₂ buffer. Cell pellets were harvested, weighed, and placed at 80°C for 16 h. Dry weights were determined, and dried cells were mixed with 10 mL of scintillation liquid (Ultima Gold Ready-Safe Cocktail, PerkinElmer, United States) in scintillation vials to evaluate the radioactivity of each sample using a liquid scintillation counter (Beckman Coulter LS6500 Liquid Scintillation Counter, United States). Sugar uptake measurements were expressed in μmol of glucose/sucrose/fructose *per* gram of cell FW as a function of time.

Cell Death Measurements

Cell death was determined by simultaneously staining cells with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) dyes, as described previously (Jones and Senft, 1985). Xanthi cells were incubated at room temperature with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FDA and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PI for 5 min. The ratio of dead (red-stained) to viable (green-stained) cells was measured with an epifluorescence microscope (Photomicroscope Axiophot, Zeiss, Germany) using rhodamine (BP546 \pm 12/FT580/LP590 nm) and fluorescein (BP450-490/FT510/LP520 nm) filters, respectively. The experiment was repeated three times with at least 500 cells counted for each assay.

In Silico Analysis

Putative *NtSUTs* and *NtSWEETs* were screened from the Solanaceae database¹ using BLAST algorithms (BLASTN, BLASTP and BLASTX²) with previously published plant *SUT* and *SWEET* sequences as subjects. Microarray data from tobacco cells generated in our laboratory (Agilent 44K chip containing 43,759 probes of tobacco cDNA; unpublished results, K. Bouhidel) led to the identification of 2 putative *NtSWEETs*, named *NtSWEET2A* and *NtSWEET2B*. The accession numbers of the isolated sequences are the following: *NtSUT1-1* (MF140390), *NtSUT1-2* (AF149981.1, published as *NtSUT3*, Lemoine et al., 1999), partial *NtSUT2* (MF140391), *NtSUT4* (AB539539.1, Okubo-Kurihara et al., 2011), *NtSWEET2A* (identified as *N. tabacum* bidirectional sugar transporter SWEET2a-like in the original tobacco genome annotation XM_016629722.1), and *NtSWEET2B* (identified as bidirectional sugar transporter SWEET2-like in the original tobacco genome annotation XM_016634622.1).

RNA Extraction and RT-PCR Analyses

Five mL of cell suspension were collected 0, 30 min, 2 and 4 h after cryptogeiin or CO₄ treatment. The biological material was harvested, frozen and ground in the same way as for protein extraction. Total RNAs were extracted and purified using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA solutions were treated with DNase (Ambion, United States) for 30 min at 37°C, following the manufacturer's instructions. Purity and concentrations of RNA fractions were estimated using Nanodrop1000 (ThermoFisher Scientific, United States). Reverse transcription was performed on 1 μg of RNA using the ImpromIITM Reverse Transcriptase kit (Promega, United States), as described by the manufacturer.

Quantitative PCR was carried out on reverse-transcribed RNAs from at least three independent biological replicates and two technical replicates. Quantitative PCR reactions were performed using a ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, United States) apparatus and ViiATM 7 v1.2 software, using GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, United States). Relative expression levels were normalized against the average of the two housekeeping genes *NtL25* and *NtEF1 α* (Schmidt and Delaney, 2010) and against untreated cells for each time-point measurement using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The qPCR primers displayed high amplification efficiency (85–100%); they are listed in Supplementary Table 3.

Statistical Analyses

Cell death data were statistically analyzed for differences between treatments using R software (a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, T RCore - Online³) using Student's *T*-test. Differences were considered as significant with a *p*-value < 0,001. Gene expression data were analyzed for differences between treatments by ANOVA followed by Tukey's range test. Different letters indicate distinct statistical groups with a *p*-value < 0.05.

¹<http://solgenomics.net/>

²<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

³<http://www.R-project.org,2016>

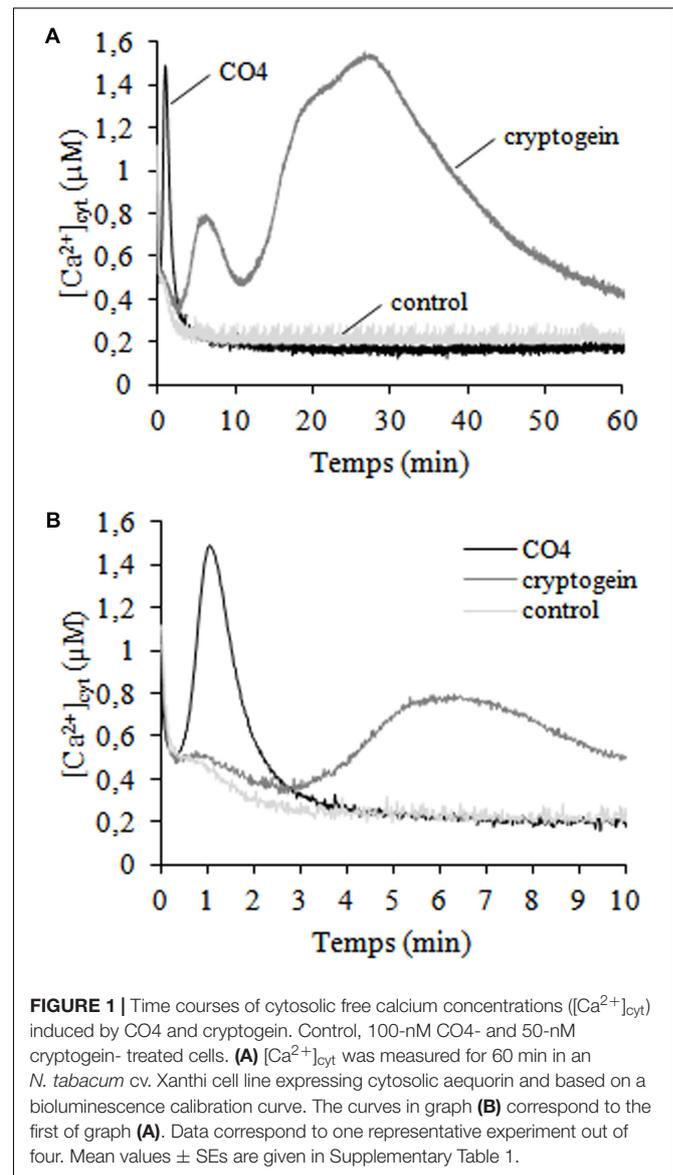
RESULTS

CO₄ Induces a Rapid and Transient Cytosolic [Ca²⁺]_{cyt} Elevation in Tobacco Cells

Calcium ions (Ca²⁺) are secondary ubiquitous intracellular messengers that play key roles in signal transduction in response to biotic and abiotic stresses. We investigated the cytosolic free calcium concentrations ([Ca²⁺]_{cyt}) dose-response of *N. tabacum* cv. Xanthi cells expressing cytosolic aequorin (Manzoor et al., 2012) and submitted to CO₄ treatment (Supplementary Figure 1). CO₄ 100 nM induced the highest cytosolic [Ca²⁺]_{cyt} rise, so we chose this concentration for the other experiments. A very sharp, rapid and transient increase in [Ca²⁺]_{cyt} was recorded within the first minute of CO₄ treatment (Figures 1A,B). Then [Ca²⁺]_{cyt} returned to the same basal level as control cells after 5 min of CO₄ treatment. These CO₄-induced [Ca²⁺]_{cyt} variations markedly differed from the bi-phasic variations induced by cryptogein (Figures 1A,B). After a 3-min lag phase, cryptogein induced a first transient [Ca²⁺]_{cyt} increase that peaked after *ca.* 5 min, followed by a second and sustained elevation after 25 min of treatment. The mean [Ca²⁺]_{cyt} peak values obtained with 100 nM CO₄ and 50 nM cryptogein treatments and the corresponding peak times are reported in Supplementary Table 1. This result is in agreement with previous data published by Manzoor et al. (2012). Our findings indicate that undifferentiated tobacco cells perceive signals from CO₄ used as an AMF inducer and cryptogein used as a plant defense inducer, and then may transduce specific responses to these signals.

CO₄ Promotes Rapid H₂O₂ Production Mediated by Plasma Membrane Oxidase NtrbohD

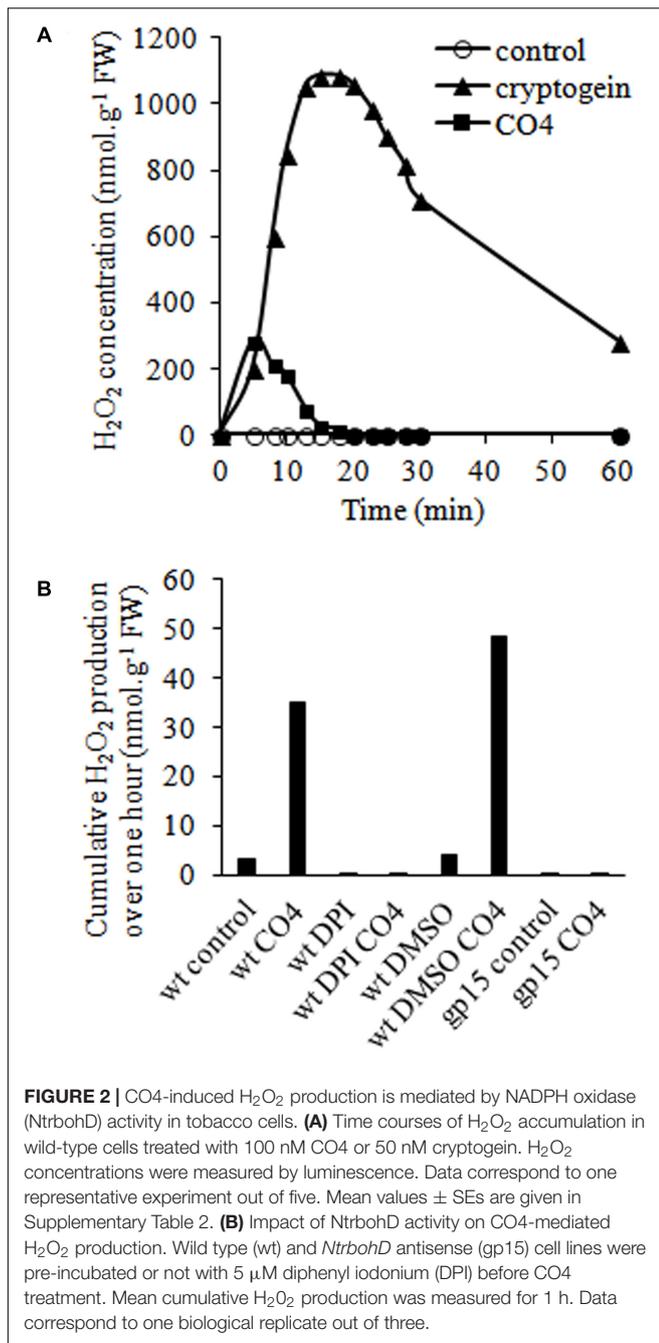
Reactive oxygen species production is a well-known signaling event triggered by microbial molecules (Fester and Hause, 2005; Torres, 2006), so we investigated H₂O₂ production in tobacco cells following CO₄ treatment. A rapid and transient increase of the H₂O₂ concentration occurred after 5–10 min, with a maximum of 285 nmoles of H₂O₂·g⁻¹ of FW, followed by a rapid decrease (Figure 2A). In the same conditions, cryptogein treatment induced a higher increase of the H₂O₂ concentration after around 20 min, with a maximum of 1 μmole of H₂O₂·g⁻¹ of FW cells, as previously described by Simon-Plas et al. (1997). The mean H₂O₂ production peak values obtained with 100 nM CO₄ and 50 nM cryptogein treatments and the corresponding peak times are reported in Supplementary Table 2. In order to investigate the origin of H₂O₂ produced in response to CO₄, we used DPI to inhibit ROS production mediated by flavoenzymes such as NADPH oxidases (Pugin et al., 1997). DPI suppressed H₂O₂ production in response to CO₄ (Figure 2B), suggesting the involvement of NADPH oxidases (also named rboh for respiratory burst oxidase homologs). To support this hypothesis, we examined CO₄-induced H₂O₂ production in the gp15 cell line, which is impaired in *NtrbohD* expression by an antisense



strategy. This cell line was previously used to confirm that the major enzymatic source of H₂O₂ in cryptogein signaling is the NtrbohD isoform (Simon-Plas et al., 2002). Likewise, no H₂O₂ production occurred after eliciting gp15 cells with CO₄ (Figure 2B), confirming that NtrbohD activity is also involved in CO₄-induced H₂O₂ production in tobacco cells. Similarly to our previous observations about Ca²⁺ (Figure 1), H₂O₂ production measurements showed that CO₄ and cryptogein induced specific profile of oxidative bursts, confirming that myc-factors and plant defense inducers regulate signaling components in specific manners.

Activation of MAP Kinases by CO₄ and Link with Cell Death

Protein phosphorylation/dephosphorylation is a major post-translational modification that plays a crucial role in the



regulation of physiological processes by intracellular signal transduction.

Using in-gel kinase assays and HIIIS in the presence of 0.5 mM Ca²⁺, we did not detect any Ca²⁺-dependent protein kinase (PK) specifically activated in response to CO₄. The activated Ca²⁺-dependent PK patterns were similar for CO₄-, cryptogein- and non- treated cells. However, in in-gel kinase assays with MBP in the presence of 0.1 mM EGTA, CO₄ activated a Ca²⁺-independent PK with an apparent molecular mass of 48 kDa (Figure 3A). Hence, fast and transient PK activity was detected in response to CO₄, with a peak after

5 min of treatment. In contrast, sustained activity of a PK with a similar molecular mass was observed from 10 min and up to 60 min in response to cryptogein (Figure 3A). This PK shared common characteristics with MAPKs. To confirm this hypothesis, we performed immuno-detection of both activated (i.e., phosphorylated) and total (activated and non-activated) MAPKs by using anti-human phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2; Thr202/Tyr204) and total MAPK antibodies, respectively (Figure 3B). Two bands corresponding to activated MAPKs with apparent molecular masses of 48 and 46 kDa were detected and confirmed the results obtained in in-gel kinase assays. These PKs could correspond to salicylic-acid-induced protein kinase (SIPK) and wound-induced protein kinase (WIPK), respectively, previously identified in tobacco (Zhang and Klessig, 1997, 1998; Lebrun-Garcia et al., 1998; Zhang et al., 1998, 2000). The use of the antibody raised against total MAPKs revealed bands of similar intensity levels in control, cryptogein-treated and CO₄-treated cells, indicating that these MAPKs are constitutively expressed. Therefore, we can conclude that activation of these two MAPKs was due to their phosphorylation in response to CO₄ and cryptogein treatments. Several authors hypothesized that MAPK activation was involved in HR-associated cell death (Zhang et al., 2000; Yang et al., 2001; Zhang and Liu, 2001; Menke et al., 2005), so we analyzed the ability of CO₄ to induce cell death after 24 h of treatment (Figure 3C). CO₄, which induced transient MAPK activity, only induced 10% of cell death, i.e., the same percentage as in untreated cells after 24 h. In the same conditions, cell death reached nearly 70% in response to cryptogein, which induced sustained MAPK activity. These results confirm that sustained MAPK activation is necessary to promote cell death, as previously reported by Dahan et al. (2009).

Effect of Microbial Molecules on Sugar Uptake

We analyzed the ability of microbial molecules to regulate cellular uptake of the three main plant soluble sugars, namely sucrose, glucose, and fructose. ¹⁴C-glucose uptake was totally repressed in cryptogein-treated cells (Figure 4A), as previously described by Bourque et al. (2002). In contrast, glucose uptake was not inhibited in response to CO₄ (Figure 4B). Results were similar for ¹⁴C-sucrose uptake: CO₄ did not modify the sustained sucrose uptake recorded in control cells (Figure 4D), but cryptogein strongly inhibited it (Figure 4C). These results indicate that sucrose transporter activity and glucose transporter activity are differently regulated in response to cryptogein and CO₄. Our observations regarding ¹⁴C-fructose uptake suggest different modes of regulation. Neither cryptogein treatment (Figure 4E) nor CO₄ treatment (Figure 4F) inhibited fructose uptake as compared to control cells, suggesting that the regulation of specific fructose transporters is not modified in response to microbial signals, or that the regulation of hexose transporters only affects their selectivity. Altogether, our results demonstrate that perception of AMF signals or plant defense inducers leads to adverse

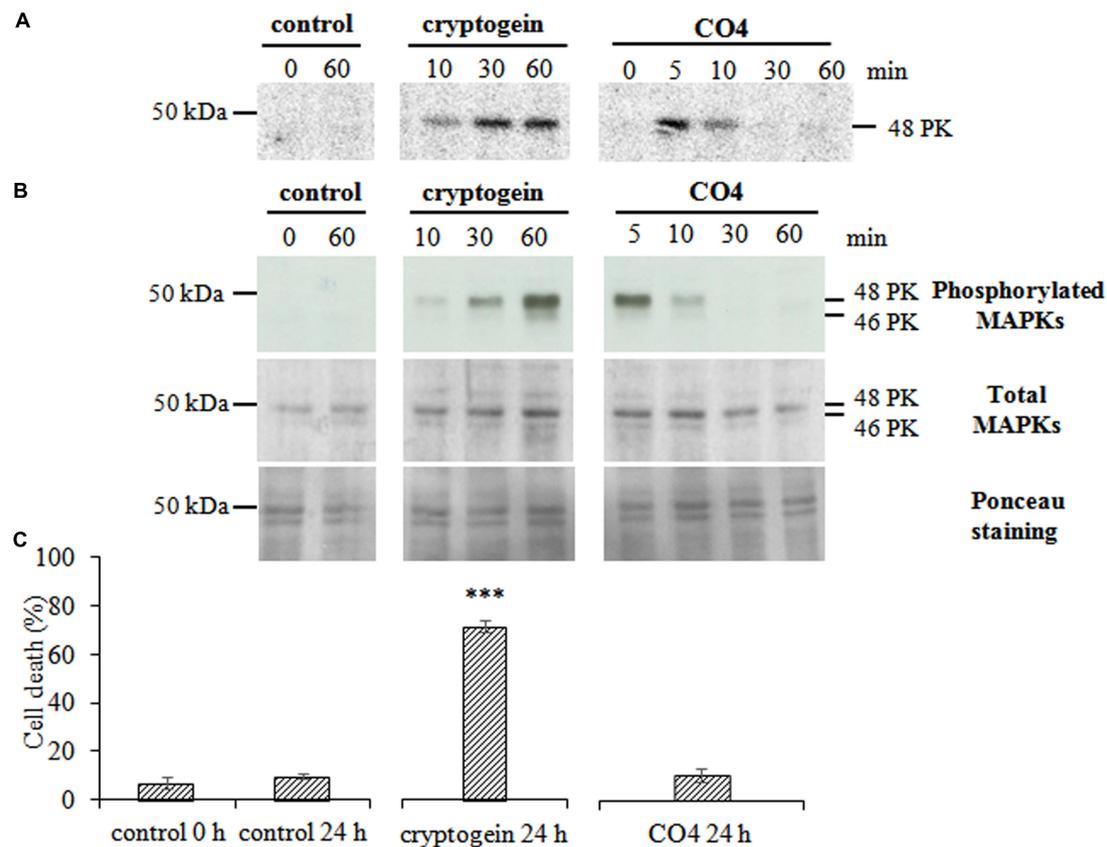


FIGURE 3 | CO4 induces a rapid and transient activation of MAPKs but does not induce cell death. Tobacco cells were left untreated (control) or treated with 50 nM cryptogein or 100 nM CO4, sampled at different time points, and then global protein extracts were prepared. **(A)** Protein kinase (PK) activity levels were analyzed by in-gel kinase assay using MBP as a substrate. The phosphorylation reaction was performed in the absence of Ca^{2+} in the medium. Twenty μg of total proteins were loaded *per* lane. The molecular mass (in kDa) is indicated on the left-hand side of the gels. The entire experiment was repeated independently three times. **(B)** Phosphorylated (active forms) and total MAPKs were immuno-detected using anti-human phospho-p44/42 and total MAPK antibodies, respectively. These data are representative of three independent experiments. **(C)** Cell death was measured by double staining using fluorescein diacetate and propidium iodide in tobacco cells treated or not with cryptogein or CO4 for 24 h. Data are the mean values \pm SEs of three biological replicates. Statistical analysis was performed using Student's *T*-test ($p^{***} < 0.001$, $n = 3$).

strategies in terms of sugar transport at the plant cell plasma membrane, which is related to the subsequent outcome of the interaction.

CO4 and Cryptogein Differentially Regulate *SUT* and *SWEET* Expression

We focused on the *SUT* (Zhang and Turgeon, 2009; Kühn and Grof, 2010; Doidy et al., 2012a; Lemoine et al., 2013; Bitterlich et al., 2014; Garcia et al., 2016) and *SWEET* (Zhang and Turgeon, 2009; Chen et al., 2010, 2012, 2015; Yu et al., 2011; Doidy et al., 2012a; Chong et al., 2014; Chandran, 2015; Manck-Götzenberger and Requena, 2016) transporter families because they are known to play a key role in sugar partitioning *in planta* and in sugar exchanges/competition in PMIs. We first identified all *SUT* members in the currently available version of the tobacco genome (Sol Genomics Network). Our *in silico* screening led to the identification of 4 putative tobacco *SUTs* (2 full-length and 2 partial sequences) belonging to the three dicotyledonous *SUT* clades

(Supplementary Figure 2). We built a *SUT* phylogenetic tree based on the amino acid sequence alignment of different plant *SUTs* (*Arabidopsis thaliana*, *M. truncatula*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, and *N. tabacum*) naming Nt*SUTs* according to their phylogenetic position. Nt*SUT*1-1 and Nt*SUT*1-2 belong to the *SUT*1 clade (type I; Peng et al., 2014), Nt*SUT*2 to the *SUT*2 clade (type II; Peng et al., 2014), and Nt*SUT*4 to the *SUT*4 clade (type III; Peng et al., 2014).

In the same database, we also identified 13 putative tobacco *SWEETs* (full length or at least with a minimum length of 235 amino acids) belonging to the four *SWEET* clades (Supplementary Figure 3). We renamed the 13 putative sequences according to their closest orthologs with *S. lycopersicum* (Supplementary Figure 3). Among these candidates, our previous data (Agilent 44K, unpublished results, K. Bouhidel) led to the identification of 2 putative Nt*SWEETs* belonging to *SWEET* clade 1 (Nt*SWEET*2A and Nt*SWEET*2B), that we further investigated.

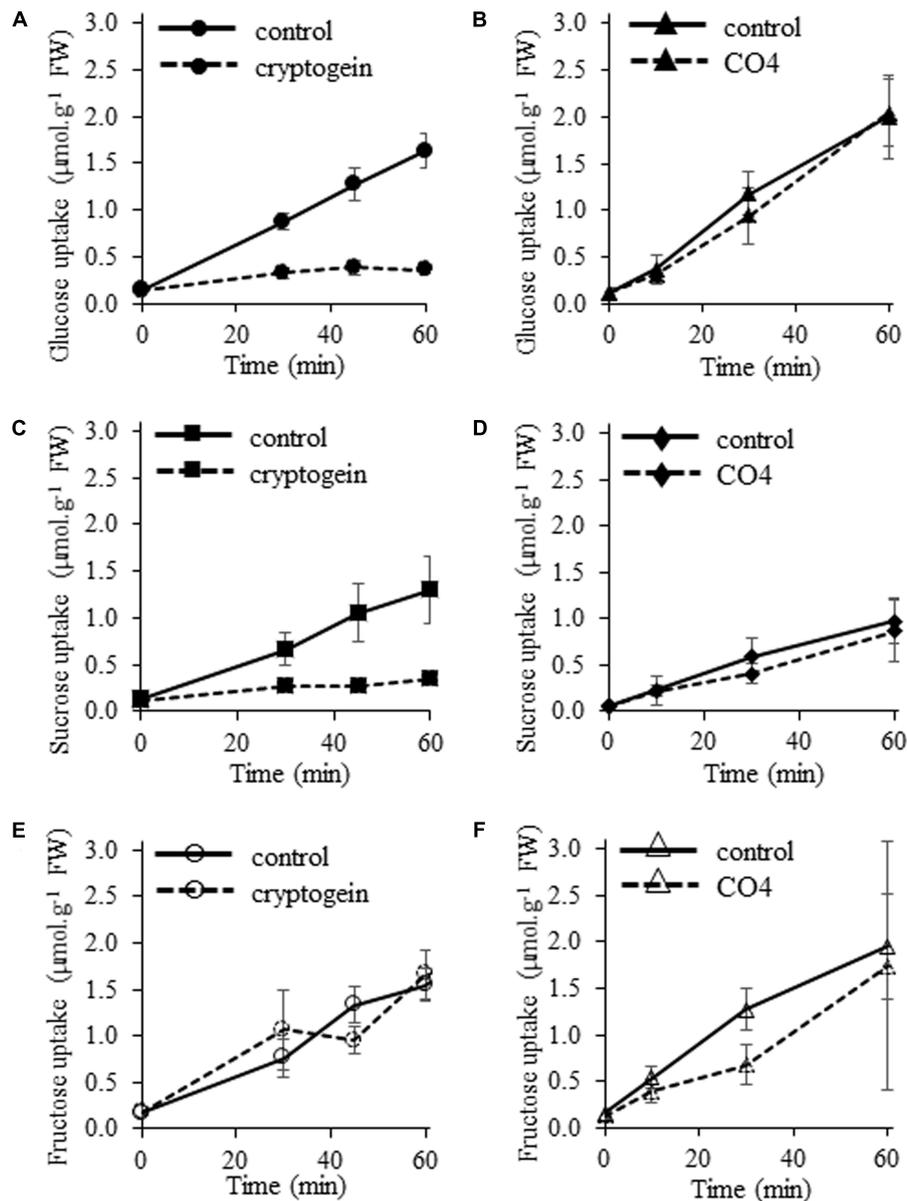


FIGURE 4 | Effects of cryptogein and CO4 on glucose, sucrose, and fructose uptake in tobacco cells. **(A,B)** Time course of ¹⁴C-glucose uptake. **(C,D)** Time course of ¹⁴C-sucrose uptake. **(E,F)** Time course of ¹⁴C-fructose uptake. For all experiments, cells were pre-incubated with 2 mM ¹⁴C-sugar (0.055 MBq.g⁻¹ FW cells), and then 50 nM cryptogein **(A,C,E)** or 100 nM CO4 **(B,D,F)** were added. Controls correspond to the time course of ¹⁴C-sugar uptake in the absence of cryptogein or CO4. Data represent the means ± SEs of at least three biological replicates.

We analyzed the transcript accumulation of the 6 selected candidates (4 *NtSUTs* and 2 *NtSWEETs*) in tobacco cells by quantitative reverse transcription PCR following 4 h of cryptogein or CO4 treatment. After 4 h of cryptogein treatment, *NtSUT1-1* expression remained unchanged (**Figure 5A**), whereas *NtSUT1-2* transcript levels substantially increased (150-fold change, **Figure 5B**). Transcript accumulation of *NtSUT2* (**Figure 5C**) and *NtSUT4* (**Figure 5D**) also significantly increased after 4 h of cryptogein treatment, with 6- and 2.5-fold changes, respectively. In the same conditions, the transcript levels of the

two *NtSWEETs* significantly increased 2.5-fold for both genes (**Figures 5E,F**). The changes observed after 4 h of cryptogein treatment occurred after 2 h of treatment for most of the genes we studied (**Figures 5B-D,F**). In contrast, gene expression of all *NtSUT* members remained unchanged in response to CO4 throughout the whole experiment (**Figures 5A-D**). In addition, the 4-h treatment with this symbiotic signal did not modify *NtSWEET2A* transcript levels (**Figure 5E**) and only caused *NtSWEET2B* transcripts to increase slightly but significantly (1.8-fold after 4 h, **Figure 5F**).

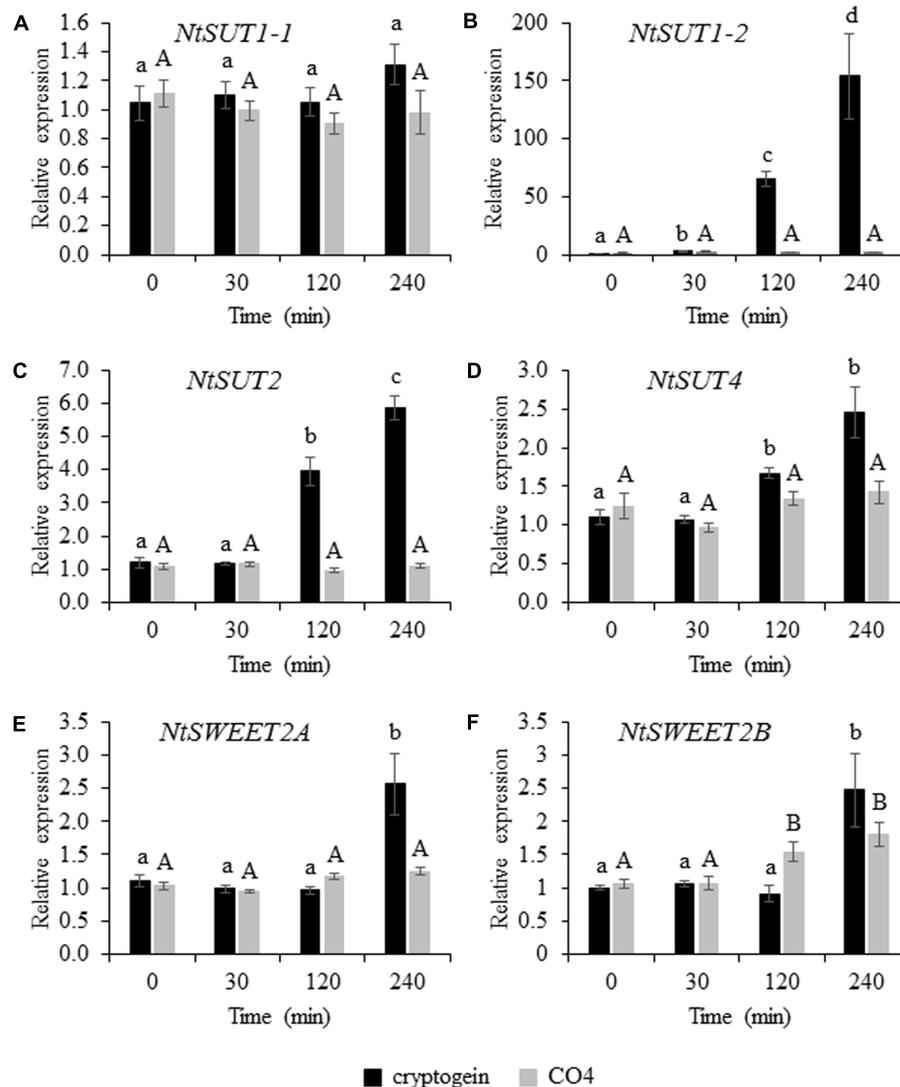


FIGURE 5 | Transcript level of *NtSUTs* and *NtSWEETs* in tobacco cells 0, 30, 120, and 240 min after cryptogein or CO4 treatment. Relative expression of *NtSUT1-1* (A), *NtSUT1-2* (B), *NtSUT2* (C) and *NtSUT4* (D), *NtSWEET2A* (E) and *NtSWEET2B* (F). Transcript levels were measured in tobacco cells treated with 50 nM cryptogein (black bars) or 100 nM CO4 (gray bars). *NtEF1 α* and *NtL25* were used as housekeeping genes, and expression data were further normalized to untreated cells for each time point measurement. These data represent the means \pm SEs of three independent experiments. Statistical analysis was carried out using ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Capital or lower-case letters correspond to statistical groups following CO4 or cryptogein treatment, respectively.

DISCUSSION

We compared the impact of two purified microbial molecules that mimicked pathogenic or mutualistic lifestyles on undifferentiated non-legume cells. We took advantage of this simplified system, which circumvents the hurdles linked to a multi-layered organ, to further unfold the early signaling events of PMI. Our data evidenced that CO4, a myc-factor known to induce the strongest myc responses in root cells (Genre et al., 2013), was recognized by tobacco cells. This recognition resulted in the induction of three signaling events: cytosolic Ca^{2+} production, H_2O_2 production, and MAP kinase phosphorylation.

Early Signaling Triggered by CO4 in Tobacco Cells

Calcium is a key secondary messenger in cell functional processes that transduces early intracellular signaling events in pathogenic and mutualistic PMIs (Vadassery and Oelmüller, 2009). CO4 triggered calcium concentration increase in its very early stages in cultured tobacco cells. Calcium spiking occurs in rhizodermal cells of legume and non-legume plants in contact with AMF or fungal spore/hyphal exudates (Kosuta et al., 2008; Chabaud et al., 2011; Genre et al., 2013; Sun et al., 2015). Calcium initiates the cross-talk between partners, and induces plant (Parniske, 2008) or fungal (Liu et al., 2013) genes, and is thus necessary for symbiosis to establish in the host plant (Oldroyd

and Downie, 2006). AMF spore/hyphal exudates contain a mixture of molecules that trigger cytosolic calcium elevations in cultured non-legume (tobacco and soybean) cells (Navazio et al., 2007; Francia et al., 2011). These works are in line with the present study, which more precisely demonstrates that one compound within this mixture, namely CO₄, is sufficient to trigger early calcium concentration increase in cells. ROS (H₂O₂) production, i.e., the so-called oxidative burst, is a powerful plant defense response against pathogenic microbes (Lamb and Dixon, 1997). But ROS are also generated during the early stages of plant root mycorrhization (Salzer et al., 1999; Fester and Hause, 2005; Kiirika et al., 2012; Belmondo et al., 2015). ROS production is related to induction of carotenoid biosynthesis (Strack et al., 2003), bio-protection of AM plants (Dumas-Gaudot et al., 2000), and lateral root development (Montiel et al., 2013). Our results show that CO₄ induced rapid, early H₂O₂ production in cultured tobacco cells. They contrast with the work of Navazio et al. (2007) who showed that *G. margarita* culture medium did not induce ROS production in cultured soybean cells. However, a detectable ROS accumulation was recorded in cultured soybean cells treated with homogenates of fungal spore cell walls (Navazio et al., 2007). The authors concluded that the diffusible fungal molecules, which are thought to be released in the medium, did not induce defense reactions in soybean cells. We may wonder whether this undetectable ROS production in soybean cells was due to the absence/low concentration of CO₄ (or of other diffusible molecules able to trigger ROS production) or to the presence of ROS antioxidants in *G. margarita* medium that suppressed the oxidative burst. We identified isoform D of Ntrboh as the source of CO₄-induced H₂O₂ production (resulting from dismutation of O₂^{•−}). RbohB has been described as a major source of ROS during AMF symbiosis (Puppo et al., 2013). In *Phaseolus vulgaris* (Pv), 6 to 9 *Pvrboh* genes were up-regulated during early interaction with the AMF *Rhizophagus irregularis* (Arthikala et al., 2013). *PvrbohB*-RNAi plants developed higher AMF colonization, while *PvrbohB*-overexpressing plants displayed reduced colonization, indicating that *PvrbohB* negatively controlled the late stage of AMF colonization in cortical cells (Arthikala et al., 2013). Conversely, in *Medicago truncatula* the MtrbohE isoform played a positive role in arbuscule development (Belmondo et al., 2015). Thus, different members of the rboh family could have distinct – sometimes conflicting – functions in AM symbiosis from the very early recognition of diffusible molecules in rhizodermal cells to arbuscule development in cortical cells. We can notice that *PvrbohB* shares 84.9% of amino acid identity with *PvrbohD* (Montiel et al., 2012), the NtrbohD homolog. Our data show that CO₄ treatment induces NtrbohD-dependent H₂O₂ production. This result could be seen in the light of the requirement of *PvrbohB* for pre-symbiotic early recognition of AMF by rhizodermal *P. vulgaris* cells.

CO₄ also induced a transient activation of two MAPKs with apparent molecular masses of 48 and 46 kDa that may correspond to SIPK and WIPK, respectively (Lebrun-Garcia et al., 1998). The MAPK cascade is a key element in the transduction of extracellular stimuli into intracellular

response mechanisms (Mishra et al., 2006; Pitzschke et al., 2009). Only few studies have described MAPK involvement in plant mutualistic interactions (Bartsev, 2004; Fernandez-Pascual, 2006; Francia et al., 2011). Induction of MAPK transcripts by *R. irregularis* and *Glomus versiforme* has been measured during pre-contact and appressorium stages on *M. truncatula* roots (Liu, 2003; Weidmann et al., 2004). At the protein level, rapid MAPK activation was triggered in lotus and tobacco cells challenged by *G. margarita* GSE exudates (Francia et al., 2011).

CO₄ and Cryptogein Promote Similar Signaling Events, but with Different Signatures

Our results indicate that the early, subtle, transient induction of [Ca²⁺]_{cyt} production, H₂O₂ production and MAPK activation in CO₄-challenged tobacco cells was not sufficient to promote tobacco cell death as cryptogein treatment did. The time course and amplitude of these signaling components are decoded by plant cells for them to adapt to different scenarios (Dodd et al., 2010). Interestingly, CO₄ and cryptogein induced specific [Ca²⁺]_{cyt} increases that differed in time courses as well as in peak intensities in tobacco cells. CO₄ induced a sharp and transient [Ca²⁺]_{cyt} peak, whereas cryptogein induced a longer and bi-phasic [Ca²⁺]_{cyt} elevation, as described by Manzoor et al. (2012). Various external biotic stimuli can quickly trigger specific and distinct spatio-temporal patterns of changes in cytosolic Ca²⁺ concentration, i.e., the so-called “Ca²⁺ signatures” leading to specific signaling pathways (McAinsh and Pittman, 2009). Our results are in agreement with Navazio et al. (2007) and Francia et al. (2011), who showed that AMF *G. margarita* exudates induced a transient [Ca²⁺]_{cyt} increase with a specific sharpened profile within a few minutes in cultured cells. CO₄ also induced rapid and transient H₂O₂ production within a few minutes, with a peak after 8 min of treatment. The H₂O₂ production and [Ca²⁺]_{cyt} production profiles were earlier in CO₄-treated cells in cryptogein-challenged cells. Plant rbohB contains EF-hand motifs for calcium binding (Torres and Dangel, 2005), so we expected a similar time course of CO₄-triggered calcium and ROS production in link with the “conventional” interconnection between Ca²⁺ and ROS (Mazars et al., 2010). CO₄ induced MAPK activation transiently and more rapidly than cryptogein, with a peak after 5 min, while cryptogein induced sustained MAPK activation. This profile is linked with cell death, as suggested by different authors. Constitutive SIPK activation promoted the induction of genes involved in HR cell death (Yang et al., 2001; Zhang and Liu, 2001). Nuclear activation of SIPK resulted in cryptogein-mediated tobacco cell death (Dahan et al., 2009). Moreover, one of the targets of SIPK is WRKY1, a transcription factor involved in HR (Menke et al., 2005). The higher second [Ca²⁺]_{cyt} elevation, which only occurred in cryptogein-treated cells, may be involved in sustained MAPK activation, defense gene expression, and cell death (Lecourieux et al., 2002).

Impact of Microbial Molecule Origin on Early Sugar Partitioning

Treatment of tobacco cells with CO₄ and cryptogein allowed us to characterize the early sugar partitioning events in opposite PMI types. Our tobacco cells perceived the two types of molecules, but the subsequent effects on sugar uptake differed. We showed for the first time that, as previously reported for glucose, sucrose uptake was negatively impacted by cryptogein treatment, whereas fructose uptake was not affected. To discuss our results in the context of competition for apoplastic sugars between plants and microbes, we can hypothesize that (i) microbes inhibit glucose and sucrose re-uptake by mimicking an avirulent pathogen attack so as to divert plant sugars, and/or (ii) plant cells inhibit glucose and sucrose re-uptake to confine pathogen development within the surrounding tissues, and thereby probably promote cell death, as proposed by Bourque et al. (2002). Unlike cryptogein treatment, CO₄ treatment did not modify sugar uptake by plant cells. Sugar transfer from the plant to the fungal symbiont is essential for mutualism to develop and lead to reciprocal nutrient exchanges between the two partners. Inhibition of sugar transfer would dramatically impact the outcome of mutualistic symbiosis. Therefore, it is no surprise that plants should maintain sugar flows and maintain sugars available in the apoplast in response to an AMF molecule, so that symbiosis may durably establish. Furthermore, no cell death occurred in CO₄-treated cells, in line with the biotrophic obligate lifestyle of AMF. Interestingly, fructose uptake remained unchanged in response to both cryptogein and CO₄. Fructose is a by-product of sucrose known as a secondary sugar; it is less competitive than glucose for microbial nutrition. Glucose is mostly used by beneficial microbes, but also diverted by pathogens (Sutton et al., 1999; Hall and Williams, 2000; Voegelé et al., 2001; Schüßler et al., 2006; Nehls et al., 2010). The lower selection pressure for fructose uptake may have led to a weaker regulation of fructose re-uptake. This idea is reinforced by the fact that so far only one fructose transporter has been reported in symbiotic or pathogenic fungi, namely BcFRT1 (*Botrytis cinerea* fructose transporter 1; Doehlemann et al., 2005).

CO₄ and Cryptogein Differentially Regulate Sugar Transporters

Plant glucose and sucrose uptake levels can be modified by PMIs such as cryptogein. To offset the ensuing stress, cells may adopt two strategies: (i) favor the synthesis of “other” sugar transporters (located at the plasma membrane and/or tonoplast), or (ii) favor less selective sugar transporters present at the plasma membrane. Additionally, sugar transport proteins may also be regulated at the post-translational level. For instance, phosphorylation of the AtSTP13 sugar transporter in *Arabidopsis* increased sugar re-uptake by plant cells, and this limited competition with bacterial transporters (Yamada et al., 2016). Our results suggest that at least the first strategy occurs in tobacco cells since cryptogein induced significant up-regulation of 3 *NtSUTs* and 2 *NtSWEETs*, while CO₄ only induced a slight but significant increase of *NtSWEET2B* transcripts. Although the expression of 6 transporters was analyzed in our original

cell system, it is also interesting to discuss their putative roles at the whole plant level. SUT1 transporters, which belong to the first clade of specific transporters of dicotyledonous plants, are sucrose/proton symporters. Some of them are mainly involved in phloem loading and long-distance transport (Kühn and Grof, 2010). We identified two members of the SUT1 clade, namely *NtSUT1-1* and *NtSUT1-2*. *NtSUT1-1* was not regulated after short (4 h) treatment with either microbial molecule, whereas *NtSUT1-2* was upregulated after cryptogein treatment, but not after CO₄ treatment. Phylogenetic grouping with particular protein orthologs (Supplementary Figure 2) suggests that *NtSUT1-1* is the main sucrose-loading transporter in the phloem, and could be less subject to transcriptional regulation as reported in several higher plants (Zhang and Turgeon, 2009; Doidy et al., 2012b). *NtSUT1-2* is more subject to regulation at both the spatial (e.g., pollen tube; Lemoine et al., 1999) and environmental (e.g., biotic stress as suggested by our results) scales. The main role of SUT2 members remains unknown *in planta*. Regarding our results and the previously proposed negative control of AMF development by SUT2 (Bitterlich et al., 2014), it is tempting to speculate a role for *NtSUT2* in the cost/benefit balance of PMIs and its subsequent outcome. CO₄ treatment had no effect on SUT2 expression, whereas cryptogein treatment strongly upregulated it. The plasma membrane localization of SUT1 and SUT2 members is clear *in planta*, but localization of SUT4 members is still controversial: they are thought to be localized in the tonoplast, in the plasma membrane, or both (Endler, 2006; Schneider et al., 2012; Chincinska et al., 2013). In cultured tobacco cells, Okubo-Kurihara et al. (2011) suggested that tonoplastic *NtSUT4* had a potential role in sucrose export from the vacuole lumen to the cytosol. Interestingly, Schulz et al. (2011) showed that SUT4 proton symporter was not only responsible for sucrose efflux from the vacuole but acted in coordination with TMT1/2, a proton-coupled antiporter (a member of the MST family) that can load glucose and sucrose into the vacuole with a high capacity. Regulation of *NtSUT4* by cryptogein, but not by CO₄, suggests an impact on the allocation of sucrose and hexose storage to deplete plant cell sucrose and thereby limit access to carbon sources to fight against a potential pathogen, as previously hypothesized.

Besides SUTs, SWEET transporters represent a novel and widespread type of sugar uniporters in plants. Four plant SWEET subclasses have been identified. Members of subclasses I, II, and IV are mainly monosaccharide transporters, while subclass III proteins are sucrose transporters (Chen et al., 2010, 2012). The physiological roles of SWEETs are multiple, yet they seem specifically involved in diverting nutritional resources from plants in their interactions with both pathogenic and beneficial microbes (Feng and Frommer, 2015). In the present study, the 2 *NtSWEETs* (A and B) belonging to subclass I were upregulated in response to cryptogein. The orthologous protein in *Arabidopsis* (*AtSWEET2*) encodes a tonoplast protein whose expression is induced in response to infection by the pathogenic oomycete *Pythium irregulare*, and *Atsweet2* mutants are more susceptible to the pathogen (Chen et al., 2015). Thus, *AtSWEET2* activity contributes to *Pythium* resistance by preventing sugar loss in the

rhizosphere. In our case, only *NtSWEET2B* was upregulated after CO₄ treatment. Interestingly, in potato, *SWEET2C* (the closest ortholog of *NtSWEET2B*) is up-regulated during mycorrhization (Manck-Götzenberger and Requena, 2016) and maintains a favorable sucrose gradient in arbuscule-containing cells by mobilizing hexoses in the vacuole. Regulation of *NtSWEET2B* in response to CO₄ may initiate the subsequent “sucrose highway.” To sum up, this supports the hypothesis that SWEET2 members may be specifically involved in rerouting nutritional resources from plants in their interactions with both pathogenic and beneficial microbes.

Our study should be placed within a broader contextual framework of PMIs, in which hosts and microbes may develop opposite strategies to acquire carbon molecules at the apoplastic interface (Truernit et al., 1996; Fotopoulos et al., 2003; Azevedo et al., 2005; Chen et al., 2010; Doidy et al., 2012a; Manck-Götzenberger and Requena, 2016; Wittek et al., 2017). The present paper reports for the first time that a myc-factor can be recognized by non-root cells, showing that undifferentiated cells, whatever their origin, are able to perceive the origin of a microbial molecule.

At first, our simplified system was useful to show that in a “mimetic” beneficial symbiotic relationship, signaling features differ from the features of a pathogenic interaction although the signaling cascade involves the same early components as in a pathogenic interaction. This supports the recent hypothesis of a possible overlap between defense and symbiotic responses (Chen et al., 2017).

In a second step, microbes may influence the host transport capacities, whereas plants may respond at later stages by inducing their own transport system most probably through *de novo* synthesis of sugar transporters. The present study contributes to deciphering the complex regulation of sugar exchanges by showing for the first time that two microbial molecules mobilizing the same early signaling events with specific time courses and intensity levels have different impacts on PMI set-up. A way to further unravel the black box of sugar movements across plant membranes during early microbial treatment would be to achieve the functional characterization and the spatio-temporal localization of these key transporters. In the course

of evolution, plant–microbe interactions have resulted from long exchanges. While mutualistic (friendly) microbes need to be recognized by plants to be accepted, pathogenic microbes (cheaters) try to mislead the plant so as to be “recognized” as mutualists. Our work illustrates that the “evolutionary battle” is huge and starts with the first signals exchanged by plants and microbes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CP performed the experiments and wrote the paper. SB designed the radiolabeled sugar uptake and in-gel kinase assays. OC, AC, and JF technically supported CP for some experiments. DVT and CP performed *in silico* analyses. DW and NL-C designed the work and wrote the paper. All authors reviewed and approved the final manuscript.

FUNDING

CP was supported by a grant from the French Research Ministry.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Prof. Guillaume Bécard (LRSV, Castanet-Tolosan) and Fabienne Mailet (LIPM, Castanet-Tolosan) for providing CO₄ and helpful hints, Cécile Blanchard for technical help for in-gel kinase experiments, Karim Bouhidel for the Agilent 44K chip data and discussions, Pierre-Emmanuel Courty for discussions, and Joan Doidy for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmich.2017.02228/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Allen, D., Blinks, J. R., and Prendergast, F. (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration—a calcium-independent component. *Science* 195, 996–998. doi: 10.1126/science.841325
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., et al. (2013). *PvRbohB* negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 54, 1391–1402. doi: 10.1093/pcp/pct089
- Azevedo, H., Conde, C., and Tavares, R. M. (2005). The non-host pathogen *Botrytis cinerea* enhances glucose transport in *Pinus pinaster* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 290–298. doi: 10.1093/pcp/pci248
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Bartsev, A. V. (2004). NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* 134, 871–879. doi: 10.1104/pp.103.031740
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., and Lanfranco, L. (2015). The *Medicago truncatula* *MtRbohE* gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta* 243, 251–262. doi: 10.1007/s00425-015-2407-0
- Biemelt, S., and Sonnewald, U. (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163, 307–318. doi: 10.1016/j.jplph.2005.10.011
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., and Kühn, C. (2014). The sucrose transporter S1SUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J.* 78, 877–889. doi: 10.1111/tbj.12515
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346

- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.-P., and Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 181–192. doi: 10.1104/pp.110.2.365
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., et al. (2011). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol.* 192, 127–139. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03788.x
- Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S., and Pugin, A. (2002). The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. *Plant Physiol.* 130, 2177–2187. doi: 10.1104/pp.009449
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Büttner, M. (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 581, 2318–2324. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.016
- Büttner, M., and Sauer, N. (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 263–274. doi: 10.1016/s1360-1385(00)01681-2
- Chabaud, M., Genre, A., Sieberer, B. J., Faccio, A., Fournier, J., Novero, M., et al. (2011). Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *New Phytol.* 189, 347–355. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03464.x
- Chandler, M. T., de Marsac, N. T., and de Kouchkovsky, Y. (1972). Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Can. J. Bot.* 50, 2265–2270. doi: 10.1139/b72-294
- Chandran, D. (2015). Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance: role of sweet in pathogen nutrition and stress tolerance. *IUBMB Life* 67, 461–471. doi: 10.1002/iub.1394
- Chen, H.-Y., Huh, J.-H., Yu, Y.-C., Ho, L.-H., Chen, L.-Q., Tholl, D., et al. (2015). The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *Plant J.* 83, 1046–1058. doi: 10.1111/tpj.12948
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., et al. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532. doi: 10.1038/nature09606
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., et al. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211. doi: 10.1126/science.1213351
- Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., et al. (2017). Interplay of pathogen-induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula*. *Front. Microbiol.* 8:973. doi: 10.3389/fmicb.2017.00973
- Chincinska, I., Gier, K., Krügel, U., Liesche, J., He, H., Grimm, B., et al. (2013). Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Front. Plant Sci.* 4:26. doi: 10.3389/fpls.2013.00026
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., and Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 65, 6589–6601. doi: 10.1093/jxb/eru375
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., et al. (2009). Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* 418, 191–200. doi: 10.1042/bj20081465
- Dodd, A. N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 593–620. doi: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628
- Doehlemann, G., Molitor, F., and Hahn, M. (2005). Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 601–610. doi: 10.1016/j.fgb.2005.03.001
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., and Wipf, D. (2012a). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* 17, 413–422. doi: 10.1016/j.tplants.2012.03.009
- Doidy, J., van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., and Wipf, D. (2012b). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant* 5, 1346–1358. doi: 10.1093/mp/sss079
- Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Cordier, C., Gianinazzil, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2000). “Modulation of host defence systems,” in *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, eds Y. Kapulnik and D. D. Douds (Dordrecht: Springer), 173–200. doi: 10.1007/978-94-017-0776-3_9
- Endler, A. (2006). Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol.* 141, 196–207. doi: 10.1104/pp.106.079533
- Feng, L., and Frommer, W. B. (2015). Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends Biochem. Sci.* 40, 480–486. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.005
- Fernandez-Pascual, M. (2006). Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J. Exp. Bot.* 57, 2735–2742. doi: 10.1093/jxb/erl038
- Fester, T., and Hause, G. (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15, 373–379. doi: 10.1007/s00572-005-0363-4
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., et al. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atβfruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 132, 821–829. doi: 10.1104/pp.103.021428
- Francia, D., Chiltz, A., Lo Schiavo, F., Pugin, A., Bonfante, P., and Cardinale, F. (2011). AM fungal exudates activate MAP kinases in plant cells in dependence from cytosolic Ca²⁺ increase. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 963–969. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.04.008
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S. D., Wipf, D., and Courty, P.-E. (2016). Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends Plant Sci.* 21, 937–950. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.010
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., et al. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 711–724. doi: 10.1094/mpmi-19-0711
- Genre, A., Chabaud, M., Balzerque, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., et al. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198, 190–202. doi: 10.1111/nph.12146
- Gough, C., and Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 867–878. doi: 10.1094/mpmi-01-11-0019
- Hall, J. L., and Williams, L. E. (2000). Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions. *Funct. Plant Biol.* 27, 549. doi: 10.1071/pp99140
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Jones, K. H., and Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 77–79. doi: 10.1177/33.1.2578146
- Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1989). A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 183, 139–143. doi: 10.1016/0003-2697(89)90181-4
- Kiirika, L. M., Bergmann, H. F., Schikowsky, C., Wimmer, D., Korte, J., Schmitz, U., et al. (2012). Silencing of the Rac1 GTPase *MtROP9* in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection. *Plant Physiol.* 159, 501–516. doi: 10.1104/pp.112.193706
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R. J., Downie, J. A., et al. (2008). Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9823–9828. doi: 10.1073/pnas.0803499105
- Kühn, C., and Grof, C. P. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 287–297. doi: 10.1016/j.pbi.2010.02.001
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0

- Lamb, C., and Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48, 251–275. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.251
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 15, 773–781. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00269.x
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., et al. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38, 527–538. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.036
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14, 2627–2641. doi: 10.1105/tpc.005579
- Lemoine, R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 246–262. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00142-5
- Lemoine, R., Bürkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kühn, C., Regnacq, M., et al. (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett.* 454, 325–330. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00843-1
- Lemoine, R., Camera, S. L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., et al. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 4:272. doi: 10.3389/fpls.2013.00272
- Liu, J. (2003). Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 15, 2106–2123. doi: 10.1105/tpc.014183
- Liu, Y., Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Wipf, D., Zhao, B., and van Tuinen, D. (2013). Fungal genes related to calcium homeostasis and signalling are upregulated in symbiotic arbuscular mycorrhiza interactions. *Fungal Biol.* 117, 22–31. doi: 10.1016/j.funbio.2012.11.002
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., et al. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469, 58–63. doi: 10.1038/nature09622
- Manck-Götzenberger, J., and Requena, N. (2016). Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 7:487. doi: 10.3389/fpls.2016.00487
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., et al. (2012). Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium* 51, 434–444. doi: 10.1016/j.ceca.2012.02.006
- Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., and Bourque, S. (2010). Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Mol. Plant* 3, 706–718. doi: 10.1093/mp/ssq024
- McAinsh, M. R., and Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 181, 275–294. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x
- Menke, F. L. H., Kang, H.-G., Chen, Z., Park, J. M., Kumar, D., and Klessig, D. F. (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1027–1034. doi: 10.1094/mpmi-18-1027
- Mishra, N. S., Tuteja, R., and Tuteja, N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 452, 55–68. doi: 10.1016/j.abb.2006.05.001
- Montiel, J., Arthikala, M.-K., and Quinto, C. (2013). *Phaseolus vulgaris* RbohB functions in lateral root development. *Plant Signal. Behav.* 8:e22694. doi: 10.4161/psb.22694
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M.-K., Santana, O., et al. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol.* 53, 1751–1767. doi: 10.1093/pcp/pcr120
- Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., et al. (2007). A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiol.* 144, 673–681. doi: 10.1104/pp.106.086959
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., and Dietz, S. (2010). Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review: fungal carbohydrates in the ectomycorrhizal symbiosis. *Plant Biol.* 12, 292–301. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x
- Okubo-Kurihara, E., Higaki, T., Kurihara, Y., Kutsuna, N., Yamaguchi, J., and Hasezawa, S. (2011). Sucrose transporter NtSUT4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture. *J. Plant Res.* 124, 395–403. doi: 10.1007/s10265-010-0377-7
- Oldroyd, G. E., and Downie, J. A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 351–357. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.003
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 763–775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Peng, D., Gu, X., Xue, L.-J., Leebens-Mack, J. H., and Tsai, C.-J. (2014). Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Front. Plant Sci.* 5:615. doi: 10.3389/fpls.2014.00615
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 421–426. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.008
- Pugin, A., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., et al. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogin in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9, 2077–2091. doi: 10.1105/tpc.9.11.2077
- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., and Brouquisse, R. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume–*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2202–2219. doi: 10.1089/ars.2012.5136
- Roitsch, T., and González, M.-C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606–613. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.009
- Ruan, Y.-L. (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 33–67. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251
- Salzer, P., Corbière, H., and Boller, T. (1999). Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208, 319–325. doi: 10.1007/s004250050565
- Sauer, N. (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581, 2309–2317. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.048
- Schmidt, G. W., and Delaney, S. K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics* 283, 233–241. doi: 10.1007/s00438-010-0511-1
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Höll, J., Imlau, A., et al. (2012). Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters: SUC4-type sucrose transporters in the tonoplast. *Plant Biol.* 14, 325–336. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00506.x
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., et al. (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 68, 129–136. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04672.x
- Schüßler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., and Wipf, D. (2006). Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444, 933–936. doi: 10.1038/nature05364
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.-P. (2002). The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137–147. doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01342.x
- Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M.-L., Humbert, C., Montillet, J.-L., and Blein, J.-P. (1997). Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogin. *Plant Cell Environ.* 20, 1573–1579. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-45.x
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., and Walter, M. H. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* 29, 1955–1979. doi: 10.1023/a:1025695032113

- Sun, J., Miller, J. B., Granqvist, E., Wiley-Kalil, A., Gobbato, E., Maillet, F., et al. (2015). Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell* 27, 823–838. doi: 10.1105/tpc.114.131326
- Sutton, P. N., Henry, M. J., and Hall, J. L. (1999). Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* 208, 426–430. doi: 10.1007/s004250050578
- Torres, M. A. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378. doi: 10.1104/pp.106.079467
- Torres, M. A., and Dangel, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397–403. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.014
- Truernit, E., Schmid, J., Eppele, P., Illig, J., and Sauer, N. (1996). The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* 8, 2169–2182. doi: 10.1105/tpc.8.12.2169
- Vadassery, J., and Oelmüller, R. (2009). Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Plant Signal. Behav.* 4, 1024–1027. doi: 10.4161/psb.4.11.9800
- Van Bel, A. J. E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ.* 26, 125–149. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00963.x
- Voegele, R. T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8133–8138. doi: 10.1073/pnas.131186798
- Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 1385–1393. doi: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1385
- Witteck, A., Dreyer, I., Al-Rasheid, K. A. S., Sauer, N., Hedrich, R., and Geiger, D. (2017). The fungal UmSrt1 and maize ZmSUT1 sucrose transporters battle for plant sugar resources: competition of fungal and plant sugar transporters. *J. Integr. Plant Biol.* 6, 422–435. doi: 10.1111/jipb.12535
- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H., and Takano, Y. (2016). Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science* 354, 1427–1430. doi: 10.1126/science.aah5692
- Yang, K.-Y., Liu, Y., and Zhang, S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 741–746. doi: 10.1073/pnas.98.2.741
- Yu, Y., Streubel, J., Balzergue, S., Champion, A., Boch, J., Koebnik, R., et al. (2011). Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice Nodulin-3 *Os11N3* gene. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 1102–1113. doi: 10.1094/mpmi-11-10-0254
- Zamioudis, C., and Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 139–150. doi: 10.1094/mpmi-06-11-0179
- Zhang, C., and Turgeon, R. (2009). Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18849–18854. doi: 10.1073/pnas.0904189106
- Zhang, S., Du, H., and Klessig, D. F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10, 435–450. doi: 10.1105/tpc.10.3.435
- Zhang, S., and Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809–824. doi: 10.1105/tpc.9.5.809
- Zhang, S., and Klessig, D. F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7225–7230. doi: 10.1073/pnas.95.12.7225
- Zhang, S., and Liu, Y. (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 13, 1877–1889.
- Zhang, S., Liu, Y., and Klessig, D. F. (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J.* 23, 339–347. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00780.x
- Zipfel, C., and Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543, 328–336. doi: 10.1038/nature22009

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Pfister, Bourque, Chatagnier, Chiltz, Fromentin, Van Tuinen, Wipf and Leborgne-Castel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Titre : Réponses des cellules de *Nicotiana tabacum* à des molécules microbiennes : évènements de signalisation précoce, influence de la dynamique membranaire et flux de sucres

Mots-clefs : interactions plantes-microorganismes, cryptogéine, chitotétrasaccharide, transport de sucres, trafic membranaire, *Nicotiana tabacum*.

Résumé : Dans son environnement la plante est confrontée à une variété de microorganismes bénéfiques, neutres et pathogènes, qui sont fortement dépendants des ressources carbonées qu'elle libère dans le sol. Le transport de sucres, processus clé de la physiologie de la plante, est essentiel pour les interactions plantes-microorganismes et leur devenir. Au cours de l'évolution, les plantes ont acquis des mécanismes leur permettant de percevoir les signaux microbiens du milieu extérieur, et aboutissant à la transduction d'un signal spécifique puis à des réponses biologiques adaptées (défense *versus* mutualisme) à la stratégie du microorganisme. Ces réponses assurent la survie et le développement des plantes. Mes travaux de thèse, menés avec un système « d'interaction » simplifié, contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au déterminisme des interactions plantes-microorganismes. Ce système a permis d'étudier, sur des suspensions cellulaires de *N. tabacum*, les réponses cellulaires précoces déclenchées suite à la perception de molécules microbiennes provenant de microorganismes à stratégie pathogène avirulent ou à stratégie mutualiste. Nous avons mesuré des évènements de signalisation et des flux de sucres induits en réponse à ces molécules microbiennes. Nos résultats ont mis en évidence que les chitotétrasaccharides (CO4), sécrétés par les champignons mycorhiziens à arbuscules dans les stades pré-symbiotiques de l'interaction, mobilisent les mêmes évènements de signalisation précoce (H_2O_2 dépendant de la protéine rbohD, Ca^{2+} cytosolique, activation de MAPK) que la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense ; mais avec des réponses différentes en terme d'intensité et de cinétique. Les CO4 et la cryptogéine ont par ailleurs montré des impacts distincts sur les flux de sucres et l'expression de transporteurs impliqués. En complément nous avons montré un effet de la modification de la dynamique membranaire associée à la clathrine sur des évènements de signalisation déclenchés par la cryptogéine, ainsi que dans les flux entrants de sucres et l'expression de gènes de transporteurs de sucres. Enfin, l'analyse *in silico* de l'interactome de transporteurs de sucres chez la plante modèle *A. thaliana*, nous a permis d'apporter des connaissances supplémentaires quant aux évènements de régulations des transporteurs de sucres et l'identification de protéines régulatrices putatives en interaction avec ces derniers. L'ensemble de ces travaux ouvrent la voie à de nouvelles recherches visant à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place des interactions entre plantes et microorganismes.

Title: Responses of *Nicotiana tabacum* cells to microbial molecule treatments: early signaling events, influence of membrane dynamics, and sugar fluxes

Keywords: plant-microbe interactions, cryptogoin, chitotetrasaccharide, sugar transport, membrane trafficking, *Nicotiana tabacum*.

Abstract: In their natural environment plants are in close interaction with beneficial, neutral or pathogenic microbes, that are highly dependent on carbon resources exuded by plant roots. Sugar transport, which is a key process of plant physiology, is also essential to support the fate of plant-microbe interactions. During evolution, plants have acquired the ability to perceive microbial molecules, initiating specific signal transduction cascades and leading to adapted response for microbe lifestyles (avirulent, virulent or benefic). Plant survival will depend on the nature of the induced mechanisms. My PhD work, carried out on a simplified experimental system, contributes to the understanding of mechanisms underlying the determinism of plant-microorganism interactions. We used *Nicotiana tabacum* cells in suspension exposed to microbial molecules derived from mutualistic or avirulent microbes. Using such a simplified system, we analyzed elements of the early signaling cascade and sugar fluxes. We have shown that CO4, which is originating from AMF, initiate early signaling components (rbohD-dependent H_2O_2 , cytosolic Ca^{2+} , MAPK activation) as cryptogoin, a defense elicitor, but with distinct profile and amplitude. Those two molecules (CO4 and cryptogoin) are responsible of different effects on sugar fluxes and the expression of the underlying sugar transporter genes. In addition, we presented an impact of the alteration of clathrin-mediated process on early signaling events triggered by cryptogoin, as well as inward sugar fluxes and expression of sugar transporter genes. Finally, *in silico* analyses of sugar transporter interactome in *Arabidopsis thaliana* has provided some possible regulation mechanisms through the identification of new candidate proteins involved in sugar transporter regulation. These information open new perspectives towards a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in plant microorganism interactions.